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

Caracterização da Resposta Inflamatória induzida por
Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) e *Shigella flexneri*
em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2

Lucas Gonçalves Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2008

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

Caracterização da Resposta Inflamatória induzida por
Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) e *Shigella flexneri*
em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2

Lucas Gonçalves Ferreira

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2008

19.275

DEDALUS - Acervo - CQ

30100013889

Ficha Catalográfica

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

F383c Ferreira, Lucas Gonçalves
Caracterização da resposta inflamatória induzida por *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Shigella flexneri* em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2 / Lucas Gonçalves Ferreira. -- São Paulo, 2008.
78p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Martinez, Marina Baquerizo

1. Microorganismo patogênico : Medicina 2. Relação hospedeiro parasita 3. Diarréia I. T. II. Martinez, Marina Baquerizo, orientador.

616.01 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Lucas Gonçalves Ferreira

Caracterização da Resposta Inflamatória induzida por *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Shigella flexneri* em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez
orientador/presidente

Profa. Dra. Kioko Takei
1º. examinador

Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Jr.
2º. examinador

São Paulo, 05 de 09 de 2008.

***Dedico o presente trabalho
aos meus pais, JULIO e MARA,
pela compreensão, apoio e incentivo
em todos momentos da minha vida.***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Marina Baquerizo Martinez, pela orientação e por ter aberto as portas para meu crescimento intelectual em seu laboratório.

À minha companheira Alexandra, que sempre esteve ao meu lado, mesmo nos momentos mais difíceis e pela grande ajuda nas análises de FACS e na finalização deste trabalho.

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

À Carol, pelas inúmeras discussões e experimentos que realizamos juntos.

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

Ao Profº Sandro Rogério de Almeida, pelo espaço de trabalho cedido para o cultivo celular.

À Profª Ana Campa e à Silvania, pelo auxílio no ensaio de RPA.

À Profª Elza, pela amizade e carinho.

Aos companheiros de laboratório, Carla, Harummyy, José Antônio, Andyara, Renatinha, Fernanda, Silvinha, Juliana, Milton, Isabel pela amizade e agradáveis dias que passamos juntos durante esse período.

Ao Jonh, Patrícia, Nilton, Mariama, pela amizade.

Ao grupo do laboratório de micologia, Gisele, Glorinha, Karen, Eliver, Carla, Dani, que estavam sempre dispostos a ajudar

À Pro^{fa} Karina Bortoluci e ao Prof^o Gustavo Amarente-Mendes pelas discussões, sugestões e por terem cedido reagentes para os ensaios de NO e morte celular.

Aos amigos do ICB-Imunologia, Lucas, Juciane, Érica, Juliana, Carina, Matheus, Rafinha, Ângela.

Aos componentes da Banca de Qualificação, Sandro Rogério de Almeida e Rosa Maria; que muito contribuíram para a finalização dessa dissertação.

Às secretárias Ana, Sueli, Dora e Edna.

Às meninas da limpeza Dorlei, Claudinha, Carmem e Rose

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

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

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

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

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

RESUMO

Escherichia coli enteroinvasora (EIEC) e *Shigella* sp causam disenteria bacilar que é caracterizada pela invasão e destruição da mucosa do cólon humano. Amostras de EIEC possuem características bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes às espécies de *Shigella*, porém a doença causada por EIEC se apresenta numa forma mais branda e autolimitante. As células do epitélio intestinal participam ativamente da imunidade da mucosa, expressando e secretando uma série de mediadores inflamatórios como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e óxido nítrico. Para melhor entendimento da patogênese de EIEC, estudamos a resposta inflamatória modulada por este microrganismo em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2, comparando-a com *Shigella flexneri*. Células Caco-2 foram infectadas com EIEC ou *S. flexneri* por diferentes intervalos de tempo, para posterior análise da capacidade de invasão e disseminação bacterianas (UFC, *PLAQUE ASSAY*), indução de morte celular (FACS), análise relativa de genes envolvidos no reconhecimento bacteriano e na resposta inflamatória (RT-PCR, RPA), dosagem de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (ELISA) e óxido nítrico (GRIESS). Neste trabalho foi possível observar que: (i) a capacidade de disseminação e (ii) a indução da morte celular em células Caco-2 foi significativamente maior na infecção por *S. flexneri* do que EIEC; (iii) há diferenças em relação à expressão relativa de genes das células Caco-2 envolvidos no reconhecimento das duas cepas bacterianas. Foi evidenciado o papel essencial dos receptores intracelulares no reconhecimento bacteriano das células Caco-2, sendo a expressão relativa do mRNA do receptor intracelular Nod1 foi maior para EIEC quando comparado com *S. flexneri*; (iv) há diferenças significativas na cinética de produção de NO pelas células Caco-2 infectadas, em que EIEC induziu mais precocemente a produção de NO quando comparado com *S. flexneri*. Estes dados sinalizam que as células epiteliais intestinais reconhecem e respondem de forma diferente frente a essas duas espécies bacterianas, apresentando uma resposta inflamatória mais eficiente no controle da infecção induzida por EIEC.

ABSTRACT

Escherichia coli enteroinvasive (EIEC) and *Shigella* sp cause bacillary dysentery which is characterized by the invasion and destruction of the human colon mucosa. Samples of EIEC have characteristics biochemical, genetic and pathogenic similar to those of *Shigella* species, however the disease caused by EIEC is more lenient. The cells of the intestinal epithelium actively participate in the mucosal immunity by expression and production of several inflammatory mediators such as cytokines, chemokines, adhesion molecules and nitric oxide. For better understanding of the EIEC pathogenesis, we studied the inflammatory response modulated by this microorganism in intestinal epithelial cells Caco-2, comparing it with *Shigella flexneri*. Caco-2 cells were infected with EIEC or *S. flexneri* during different intervals of time and analyzed the invasiveness and spread bacteria capacity (CFU, PLAQUE ASSAY), induction of cell death (FACS), analysis of genes involved in the recognition of bacterial and inflammatory response (RT-PCR, RPA), production of pro-inflammatory cytokines and chemokines (ELISA) and nitric oxide (NO) (GRIESS). In this work was possible to observe that: (i) the ability to spread and (ii) the induction of cell death in Caco-2 cells was significantly higher in *S. flexneri* infection than EIEC, (iii) there are differences regarding the relative expression of genes of Caco-2 cells involved in the recognition of two bacterial strains. It was highlighted the essential role of intracellular receptors in recognition of bacterial by Caco-2 cells, and the expression of mRNA of the intracellular receptor Nod1 was higher for EIEC when compared with *S. flexneri*, (iv) there are significant differences in the kinetics of NO production by Caco-2 infected cells, EIEC induced a early NO production when compared with *S. flexneri*. These data indicate that the intestinal epithelial cells recognize and respond in a different way to these bacterial species and induce an inflammatory response more efficient in control of the infection induced by EIEC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da patogênese da infecção por *Shigella*.

Figura 2: Representação esquemática do reconhecimento de PGN pelos receptores Nod1 e Nod2.

Figura 3: Ensaio de invasão bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 nos intervalos de tempo de 90 e 120 minutos. Após esses períodos, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 30 minutos, e por fim, lisadas e semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias encontradas no interior das células epiteliais intestinais Caco-2 após infecção pelas duas bactérias. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 4: Ensaio de disseminação bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 e previamente incubadas, por 2 horas, com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, em diferentes intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas pós-infecção. Por fim, as células foram lisadas e semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias encontradas no interior das células Caco-2 após infecção e disseminação das duas bactérias. Em 4 horas ou mais de pós-infecção, o número de *S. flexneri* encontrado no interior das células Caco-2 foi significativamente maior do que o de EIEC. ** ($p < 0,01$) em relação às duas bactérias (*S. flexneri* X EIEC) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 5: Ensaio de morte de células Caco-2 induzida pela disseminação bacteriana. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 e previamente incubadas, por 2 horas, com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina nos intervalos de 3 e 6 horas pós-infecção (disseminação). Em seguida, as células Caco-2 foram avaliadas por citometria de fluxo. (A) Gráfico representativo da morte induzida por apoptose nas células infectadas por *S. flexneri* e EIEC em relação às células Caco-2 não-infectadas. (B) Gráfico representativo da morte induzida por necrose nas células infectadas por *S. flexneri* e EIEC em relação às células não-infectadas. (C) Gráfico representativo da morte induzida por apoptose e necrose nas células infectadas por *S. flexneri* e EIEC em relação às células não-infectadas. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) em relação às duas bactérias (*S. flexneri* X EIEC) para um

mesmo tempo analisado. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes

Figura 6: Ensaio de formação de placas de lise nas células Caco-2 infectadas por *S. flexneri* e EIEC. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^4 e 10^5 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 e incubadas, por 2 horas, com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 30 minutos, para adição de meio contendo ágar-ágar e incubadas por intervalos de tempo de 36, 48 e 72 horas pós-infecção (A). Para quantificação do tamanho dos halos de lise em milímetros, utilizamos o software Adobe Photoshop CS2 (B). Os resultados são representativos da média $\pm$ DP de 20 halos formados pela lise celular em cada período analisado. *** ($p < 0,001$) em relação às duas bactérias (*Shigella* X EIEC) para um mesmo intervalo de tempo analisado.

Figura 7: Ensaio de transcrição relativa dos genes *nod1*, *nod2*, *TLR2* e *TLR4* das células Caco-2 após infecção por *S. flexneri* e EIEC nos intervalos de 3 e 6 horas pós-infecção. Gel de agarose com os produtos de PCR dos genes *nod1*, *TLR4* e *gapdh* (A). Gráfico esquemático da expressão relativa dos genes de interesse após análise densitométrica das bandas do gel (B). Observa-se que EIEC induz maior expressão de *nod1* nos dois tempos analisados. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) em relação às células Caco-2 não infectadas para um mesmo intervalo de tempo analisado. ## ($p < 0,01$) em relação às duas bactérias (EIEC X *S. flexneri*) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

Figura 8: Ensaio de proteção da ribonuclease após 3 horas de pós-infecção das células Caco-2 com *S. flexneri* ou EIEC. O mRNA das células Caco-2 infectadas com *S. flexneri* ou EIEC foi analisado pela técnica de RPA para visualização da expressão relativa de mediadores químicos relacionados à resposta inflamatória. Gel de poliácridamida da separação eletroforética dos mRNA específicos; 1- Sonda Controle, 2/5 - Caco-2 não-infectada, 3/6 Caco-2 infectada com *Shigella* 4/7- Caco-2 infectada com EIEC, 8- RNA controle (A). Gráfico esquemático da expressão relativa dos genes alvos após análise densitométrica das bandas do gel de poliácridamida (B). Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Figura 9: Ensaio de proteção da ribonuclease após 3 horas de pós-infecção das células Caco-2 por *S. flexneri* ou EIEC. O mRNA das células Caco-2, infectadas com *Shigella* ou EIEC, foi analisado pela técnica de RPA para visualização da expressão relativa de mediadores relacionados à resposta inflamatória. Gel de poliácridamida da separação eletroforética dos mRNA específicos 1- Sonda Controle, 2/5 - Caco-2 não-infectada, 3/6 Caco-2 infectada com *S. Flexneri* 4/7- Caco-2 infectada com EIEC (A). Gráfico esquemático da expressão relativa dos genes alvos após análise densitométrica das bandas do gel de poliácridamida (B). * ($p < 0,05$) em relação às células Caco-2 não-infectadas no mesmo intervalo de tempo analisado. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Figura 10: Ensaio de determinação da produção da citocina TNF- α e das quimiocinas IL-8 e MCP-1 das células Caco-2 após infecção com *S. flexneri* ou EIEC nos intervalos de 3, 6 e 24 horas pós-infecção. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *S. flexneri* M90T ou EIEC FBC124-13 e previamente incubadas por 2 horas com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, nos diferentes intervalos de 3, 6 e 24 horas (período pós-infecção), para avaliação da presença de TNF- α (A), IL-8 (B) e MCP-1(C) no sobrenadante das culturas celulares. (p<0,05), ** (p<0,01) em relação às células Caco-2 não infectadas em um mesmo intervalo de tempo analisado. # (p<0,05) em relação às duas bactérias (*S. flexneri* X EIEC) em um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes.

Figura 11: Ensaio de determinação da produção de óxido nítrico (NO) das células Caco-2 após infecção com *S. flexneri* ou EIEC nos intervalos de 3, 6, 12 e 24 horas pós-infecção. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com *S. flexneri* M90T ou EIEC FBC124-13 e previamente incubadas por 2 horas em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, nos diferentes intervalos de 3, 6 e 24 horas (período pós-infecção), para avaliação da presença de nitrito nos sobrenadantes das culturas celulares pelo método de GRIESS. ** (p<0,01), *** (p<0,001) em relação às células Caco-2 não infectadas para um mesmo intervalo de tempo analisado. ## (p<0,01), ### (p<0,001) entre as duas bactérias (*Shigella* e EIEC) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste Two Way ANOVA. Os dados representam a média de dois experimentos independentes.

Figura 12: Representação esquemática da interação das células epiteliais intestinais com bactérias comensais e patogênicas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras bacterianas.

Tabela 2: Iniciadores utilizados na reação RT-PCR semi-quantitativo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. DISENTERIA BACILAR.....	1
1.2. INTERAÇÃO PATÓGENO-HOSPEDEIRO	6
<i>1.2.1. Reconhecimento do Patógeno</i>	<i>7</i>
<i>1.2.2. Resposta Inflamatória</i>	<i>13</i>
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. AMOSTRAS BACTERIANAS	20
3.2. CULTURA CELULAR.....	20
3.3. PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO	21
3.4. ENSAIO DE INVASÃO	22
3.5. ENSAIO DE DISSEMINAÇÃO	22
3.6. ENSAIO DE MORTE CELULAR	23
3.7. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE PLACAS DE LISE	24
3.8. EXTRAÇÃO DE RNA	25
3.9. SÍNTESE DE DNA COMPLEMENTAR.....	26
3.10. RT-PCR	26
3.11. RIBONUCLEASE PROTECTION ASSAY (RPA).....	27
<i>3.11.1. Síntese das sondas</i>	<i>28</i>
<i>3.11.2. Preparação do RNA e hibridização</i>	<i>29</i>
<i>3.11.3. Tratamento com RNase</i>	<i>30</i>
<i>3.11.4. Resolução em gel das sondas protegidas</i>	<i>31</i>
3.12. ELISA	32
3.13. DETECÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	33
3.14. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	34

4. RESULTADOS	35
4.1. INVASÃO BACTERIANA EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS CACO-2.....	35
4.2. DISSEMINAÇÃO BACTERIANA EM CÉLULAS EPITELIAIS INTESTINAIS CACO-2	36
4.3. ENSAIO DE MORTE CELULAR	38
4.4. ENSAIO DE FORMAÇÃO DE PLACAS DE LISE EM CÉLULAS CACO-2	40
4.5. ANÁLISE DA TRANSCRIÇÃO RELATIVA DOS RECEPTORES Nod1, Nod2, TLR2 E TLR4	43
4.6. ENSAIO DE PROTEÇÃO DA RIBONUCLEASE (RPA)	44
4.7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE TNF- α , IL-8 E MCP-1.....	47
4.8. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	49
 5. DISCUSSÃO	 52
 6. CONCLUSÕES.....	 67
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Disenteria bacilar

A disenteria bacilar tem sido considerada endêmica, sendo que 99% dos 160 milhões de casos anuais ocorrem em países em desenvolvimento, onde as condições sanitárias e sócio-econômicas favorecem o estabelecimento da doença. O número de mortes anuais, em consequência da disenteria bacilar, é de aproximadamente um milhão, sendo a maioria dos casos observado em crianças entre um e cinco anos (KOTLOFF, 1999).

A disenteria bacilar é uma doença inflamatória intestinal aguda, que tem como agentes principais *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC) e *Shigella* sp. Essas bactérias invadem o epitélio do cólon intestinal de humanos, causando uma intensa inflamação que caracteriza a doença (PARSOT, 2005). As manifestações clínicas comumente relatadas são: febre, mal-estar generalizado, cólicas abdominais e diarreia aquosa, seguida de disenteria constituída de muco, sangue e poucas fezes (DuPONT *et al.*, 1971).

A primeira descrição de EIEC foi realizada por EWING e GRAWATTI (1947). Uma amostra de *E.coli* foi isolada a partir de fezes de soldados americanos com diarreia, durante a segunda guerra mundial. Estudos posteriores, realizados por SERÈNY (1963), demonstraram que essa amostra provocava ceratoconjuntivite em cobaia e pertencia ao sorogrupo O124 (SERÈNY, 1963). No Brasil, a primeira amostra capaz de produzir ceratoconjuntivite em cobaia foi isolada de fezes de um paciente com enterite aguda, por TRABULSI e colaboradores, em 1965. Posteriormente, essa cepa foi identificada como pertencente ao sorogrupo O136 (TRABULSI *et al.*, 1965).

As cepas de EIEC possuem características bioquímicas, genéticas e patogênicas semelhantes às espécies de *Shigella*. Seu potencial invasor pode ser avaliado pela capacidade de causar ceratoconjuntivite em cobaias – teste de Serèny (SERÈNY, 1957). Contudo, devido à maior incidência da infecção por *Shigella*, a maioria dos estudos relacionados com a patogenicidade desses microrganismos foi realizada com cepas de *S. flexneri* e os resultados obtidos com tal bactéria podem ser aplicados às outras espécies de *Shigella* e a EIEC, pela similaridade que essas cepas bacterianas apresentam (PARSOT, 2005).

Uma das principais características da patogênese das infecções por *Shigella* e EIEC é a capacidade de invasão, ou seja, a capacidade de induzir a própria fagocitose por células que normalmente não desempenham tal função, como as células do epitélio intestinal (MAVRIS & SANSONETTI, 2004). O fator responsável por esse fenótipo invasivo é o plasmídio de virulência de 213 Kb (pInV), pois sua ausência impede que as bactérias penetrem nas células epiteliais (SANSONETTI *et al.*, 1982).

Um processo complexo está envolvido na invasão e sobrevivência de EIEC e *Shigella* no interior das células intestinais. No processo de invasão, que ocorre em várias etapas, estão presentes genes cromossômicos e plasmidiais. Para a entrada bacteriana na célula epitelial é necessária a presença de um fragmento de 31 Kb do plasmídio de virulência formado por 32 genes. Entre esses genes estão *ipaA*, *ipaB*, *ipaC*, *ipaD* (antígenos plasmidiais de invasão) e a maioria dos genes do locus *mxi-spa* (antígenos de transporte e apresentação das Ipas na superfície da membrana celular). Os genes *mxi-spa* são também necessários para a secreção das Ipas e outras proteínas efetoras no interior de células hospedeiras. O contato da bactéria com a superfície celular do hospedeiro induz à secreção das IpaA (78 kDa), das

IpaB (62 kDa), IpaC (43 kDa) e IpaD (38 kDa), essenciais na internalização da bactéria e escape do fagossomo na célula do hospedeiro, conduzidas pelo aparato de secreção do tipo III (SSTT) (MÉNARD *et al.*, 1993; COSSART & SANSONETTI, 2004).

O gene plasmidial *icsA* (*intra- and intercellular spread*) codifica uma proteína de membrana externa de 120 kDa, que atua em um dos pólos da bactéria e é responsável pela indução da polimerização da actina nesse local, formando, desse modo, uma cauda de actina que dará motilidade à bactéria no citoplasma da célula. Essa proteína de membrana externa também é responsável pela indução de protrusões necessárias para a disseminação bacteriana (BERNARDINI *et al.*, 1989; RATHMAN *et al.*, 2000). Outro gene plasmidial envolvido na disseminação intercelular é o *icsB*. Supõe-se que, durante a passagem de uma célula infectada para outra adjacente, a proteína codificada por esse gene tenha um papel na lise das duas membranas celulares que envolvem a bactéria (RATHMAN *et al.*, 2000).

Em ensaios envolvendo monocamadas celulares foi demonstrado que *S. flexneri* invade células epiteliais apenas por seu pólo basolateral, sendo incapaz de fazê-lo pelo pólo apical. Para promover a infecção, portanto, a bactéria necessita de outra rota de invasão. Experimentos utilizando alça ligada de coelho mostraram que as cepas de *S. flexneri* translocam através das células M (*microfold cells*), sendo esta então sua via de entrada no epitélio intestinal (PARSOT & SANSONETTI, 1996; COSSART & SANSONETTI, 2004). As células M apresentam a capacidade de capturar antígenos solúveis, células apoptóticas do epitélio intestinal ou bactérias do compartimento luminal e transportá-los para o sub-epitélio (Placas de Peyer), onde esses antígenos são reconhecidos por macrófagos e células dendríticas residentes (NEWBERRY, 2005).

Penetrando pelas células M, a bactéria encontra macrófagos residentes na lâmina própria e a fagocitose por esses macrófagos é o primeiro passo para a produção da resposta inflamatória contra as cepas bacterianas. Contudo, a *Shigella* escapa do fagossoma para o citoplasma do macrófago, e a ligação da IpaB (produzida por *Shigella*) com a Caspase-1 (protease presente no citoplasma dos macrófagos) desempenha um duplo papel: a morte dos macrófagos por apoptose, demonstrada *in vitro* (ZYCHLINSKI *et al.*, 1992) e *in vivo* (ZYCHLINSKI *et al.*, 1996); e a clivagem das citocinas pró-IL-1 e pró-IL-18 em suas formas ativas (HILBI *et al.*, 1998; GUICHON *et al.*, 2001).

Após o escape dos macrófagos, a bactéria penetra na célula intestinal, pelo lado basolateral, e se dissemina para as células adjacentes, causando uma intensa resposta inflamatória no local, caracterizada principalmente pela secreção da quimiocina IL-8 que, juntamente com IL-1, atua no recrutamento de células do sistema imune inato, principalmente leucócitos polimorfonucleares (PMN). A migração dessas células para o local da infecção causa desestabilização do epitélio intestinal, permitindo, assim, a passagem de um maior número de microrganismos que irão invadir os enterócitos pela superfície basolateral, levando à destruição tecidual (**Figura 1**) (PARSOT & SANSONETTI, 1995; DONNENBERG, 2000; COSSART & SANSONETTI, 2004).

Figura 1: Representação esquemática da patogênese da infecção por *Shigella* (COSSART & SANSONETTI, 2004).

Apesar das diversas similaridades bioquímicas, genéticas e patogênicas entre as cepas de *Shigella* e EIEC, para que ocorra um processo infeccioso é necessário um inóculo de 10 a 100 microrganismos para *Shigella*, enquanto para EIEC o inóculo é de 10^6 (DuPONT *et al.*, 1971). Estudos realizados pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Tit. Marina Baquerizo Martinez observaram que as cepas de EIEC também apresentam tolerância ao pH ácido (2,5), similar aos resultados encontrados anteriormente para as espécies de *Shigella* (GORDEN & SMALL, 1993). Esses dados foram confirmados com a cepa invasora de EIEC, que após 2 horas em pH ácido (2,5) perdeu a capacidade de causar ceratoconjuntivite em cobaia (teste de Serény negativo). Contudo, após 6 horas em pH neutro, seu potencial invasor foi retomado (AZEVEDO, 1998), justificando assim a capacidade de EIEC sobreviver em condições ácidas encontradas no estômago e iniciar sua colonização no intestino humano.

Esses dados sugerem que a grande diferença no inóculo necessário para causar a doença (disenteria bacilar) parece estar relacionada com o reconhecimento e posterior resposta inflamatória do hospedeiro frente às duas cepas bacterianas.

1.2. Interação patógeno-hospedeiro

Durante uma infecção, uma complexa sequência de eventos é iniciada após a invasão de microrganismos patogênicos no hospedeiro (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). A mucosa intestinal é a rota de entrada das bactérias enteropatogênicas (como EIEC e *Shigella*) e as células epiteliais intestinais funcionam como barreira mecânica, protegendo o indivíduo do meio externo, além de participarem ativamente da imunidade da mucosa, formando a primeira linha de defesa do intestino (PÉDRON *et al.*, 2003).

Sabe-se que é na mucosa do cólon intestinal que ocorre o início da interação dessas bactérias com o hospedeiro. Esse fato desencadeia uma cascata de sinalização que leva à expressão de moléculas de adesão e conseqüente influxo celular (HUANG *et al.*, 1996), apresentação de antígenos para células T (MAYER *et al.*, 1987), expressão de genes pró-inflamatórios e secreção de uma série de mediadores inflamatórios (ECKMANN *et al.*, 1993; JUNG *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1997; PÉDRON *et al.*, 2003). Por fim, essa interação também induz a ativação de mecanismos microbicidas como óxido nítrico (WHITHOUT *et al.*, 1998; RESTA-LENERT & BARRET, 2002).

Apesar de todos os mecanismos desenvolvidos pelo sistema imune com a finalidade de combater uma infecção, os microrganismos patogênicos têm desenvolvido uma série de estratégias para invadir o hospedeiro, evitar ou resistir à

resposta imune e colonizar sítios específicos do organismo humano no intuito de estabelecer e manter a infecção (SANSONETTI & DI SANTO, 2007).

Essas estratégias são comumente relacionadas a fatores de virulência das bactérias patogênicas, como moléculas de adesão, sistemas de invasão, enzimas e toxinas. Alguns desses fatores de virulência mimetizam proteínas de células eucarióticas, as quais podem induzir ou inibir as vias de sinalização das células infectadas do hospedeiro. Esse fato pode ocasionar uma série de conseqüências, entre elas a reorganização do citoesqueleto celular, a inibição ou indução da resposta imune, possibilitando, assim, a invasão bacteriana na célula do hospedeiro e o estabelecimento de nichos específicos para sua colonização. Todos esses eventos facilitam a alta adaptação do patógeno e sua colonização no hospedeiro (SCHMIDT & HENSEL, 2004; FINLAY & MCFADDEN, 2006; ARBIBE *et al.*, 2007).

Dessa forma, podemos dizer que a interação entre EIEC e células epiteliais intestinais pode ser considerada um papel crucial na patogênese da infecção no hospedeiro, controlando ou não a infecção.

1.2.1. Reconhecimento do Patógeno

O reconhecimento de patógenos consiste em uma séria dificuldade para a imunidade inata, devido à enorme variabilidade e alta taxa de mutação característica dos microrganismos. Em contrapartida, o sistema imune inato desenvolveu receptores, que têm como alvos estruturas moleculares comuns a grandes grupos de patógenos, ou que são produzidos por patógenos e não pelo hospedeiro. Essas estruturas são denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (MEDZHITOV & JANEWAY, 1997; MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Os PAMPs são reconhecidos pelos receptores denominados receptores de reconhecimento de

padrões (PRRs). Membros de várias famílias de proteínas funcionam como PRRs e são expressos em células responsáveis pela primeira linha de defesa do organismo, como as células epiteliais e também as células apresentadoras de antígeno, como os macrófagos e células dendríticas (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000).

Vários tipos de PRR são conhecidos, como os receptores do tipo Lectina, que se ligam a carboidratos freqüentemente presentes na superfície de microrganismos (como manose e β -glucanos) (MCGREAL, 2005). Receptores tipo “scavenger” e domínios ricos em repetições de leucina (LRR) estão envolvidos no reconhecimento, tanto de lipoproteínas, como de eritrócitos e células apoptóticas, além de uma variedade de patógenos (GREAVES, 2005).

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

O envolvimento dos receptores TLR na imunidade inata foi inicialmente descrito em *Drosophila* e, posteriormente, foram identificados homólogos em humanos (MEDZHITOV & JANEWAY, 2000). Os TLR são moléculas transmembrânicas que contêm um domínio externo à membrana com seqüências ricas em leucina (LRR), particulares para cada TLR, e uma cauda intracelular que mostra grande homologia com o domínio intracelular do receptor para a IL-1 (IL-1R), chamada domínio Toll/IL-1R (TIR) (GAY & KEITH, 1991). A ativação do TLR por seus ligantes induz o recrutamento de proteínas adaptadoras específicas, como o Myd88 e IRAK, que transduzem o sinal, ativando quinases e fatores de transcrição. Dá-se, dessa maneira, a produção de diferentes moléculas efetoras, citocinas pró-inflamatórias, entre outros mediadores, responsáveis pelas diferentes respostas.

A família dos receptores do tipo Toll compreende, até o momento, onze proteínas identificadas em mamíferos (11 receptores identificados em camundongos

e 10 receptores em humanos) (NETEA *et al.*, 2004). Entre seus diversos ligantes, os mais caracterizados são peptidoglicanos (PGN) e lipoproteínas bacterianas (ligantes de TLR2); flagelina, componente do flagelo microbiano (ligante de TLR5); seqüências de DNA não metilados, ricas em CpG, presentes em bactérias e vírus (ligante de TLR9); RNA dupla-fita, comuns em vírus (ligante de TLR3); LPS presentes na parede de bactérias gram-negativas (ligante de TLR4), entre outros (BEUTLER, 2004).

Os receptores do tipo Nod (NLR) têm como característica peculiar sua localização citosólica e compreendem proteínas Nod1 e Nod2 (*Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1* ou *2*), Naip (*neuronal apoptosis inhibitor protein*), Apaf (*apoptotic protease activating factor*), Ipaf (*ICE- protease activating factor*), entre outras (INOHARA *et al.*, 2005). Essas proteínas são formadas essencialmente por três domínios, um domínio N-terminal variável, um domínio central do tipo Nod e uma porção C-terminal com LRR (*leucine-rich repeat*). O reconhecimento de padrões se dá pela cauda LRR, e induz uma cascata de ativação que culmina na ativação do fator de transcrição NF- κ B ou da protease caspase-1, dependendo do tipo de receptor recrutado (THIRUMALA-DEVI *et al.*, 2007).

Análises genéticas e bioquímicas têm revelado que as proteínas NLR participam do reconhecimento da imunidade inata de maneira independente dos TLR, embora esses dois tipos de receptores possam cooperar para otimizar a resposta contra produtos microbianos (TANABE, 2004).

A expressão dos receptores do tipo TLRs e NLRs varia de acordo com o tipo celular e sua localização no organismo. Estudos em células epiteliais intestinais mostraram que ocorre uma irresponsividade via TLR (CARIO *et al.*, 2000; ABREU *et al.*, 2001; GEWIRTZ *et al.*, 2001; MELMED *et al.*, 2003; LOTZ *et al.*, 2006). Esses

dados podem justificar a irresponsividade de células epiteliais intestinais às bactérias comensais presentes na microbiota intestinal.

O trato gastrointestinal é constituído por uma população heterogênea de bactérias comensais com aproximadamente 10^{12} bactérias (BERG, 1996). As bactérias comensais residem principalmente no lúmen intestinal e é estimado que existam cerca de 500 espécies diferentes no intestino. No entanto, devido à dificuldade de cultura *in vitro*, apenas 30-40% dessas espécies bacterianas foram caracterizadas (MAGALHAES *et al.*, 2007). Essa extensa colonização do trato gastrointestinal é benéfica para o hospedeiro, pois a microbiota sintetiza vitaminas, influencia no desenvolvimento e maturação do sistema imune da mucosa intestinal, além de exercer importante função protetora, competindo por nutrientes e receptores com bactérias patogênicas.

A interação entre a microbiota intestinal e o sistema imune do hospedeiro é complexa e resulta em um estado de “inflamação fisiológica”, caracterizado por tolerância às bactérias comensais (SANSONETTI & DI SANTO, 2007).

Em contrapartida, bactérias patogênicas como EIEC e *Shigella*, além de secretarem moléculas efetoras através do sistema de secreção do tipo III (SANSONETTI, 2006), apresentam PAMPs, como os componentes de sua parede celular (LPS e PGN), que são detectados por receptores específicos (PRR) expressos em células epiteliais da mucosa intestinal (HARRIS *et al.*, 2006).

Há muito tempo o LPS é descrito como um potente estímulo para a ativação de macrófagos e monócitos, porém somente em 1999 esse componente da parede de bactérias gram-negativas foi descrito como ligante do TLR4 (JANEWAY MEDZIHOTOV, 1999). As enterobactérias apresentam o LPS como um dos principais PAMPs e o responsável pela ativação de NF- κ B, descrito como o mecanismo

regulador central da resposta imune inata de células epiteliais intestinais infectadas por bactérias enteroinvasivas (ELEWAUT *et al.*, 1999). A ativação de NF- κ B, após infecção por microrganismo, resulta na indução de um amplo repertório de genes, muitos dos quais contribuem para o estabelecimento da resposta imune inata e inflamatória (SCHOTTELIUS & DINTER, 2006).

PHILPOTT e colaboradores (2000) demonstraram que a ativação de NF- κ B e sua posterior translocação para o núcleo celular foram induzidas apenas pela *Shigella* selvagem e não pela bactéria com fenótipo não-invasivo. O fato sugere a existência de um receptor intracelular responsável pelo reconhecimento e ativação da resposta imune via NF- κ B (PHILPOTT *et al.*, 2000). No ano seguinte, o mesmo grupo confirmou a existência do receptor intracelular Nod1, responsável pela indução na ativação de NF- κ B e c-Jun N-terminal quinase (JNK), que possivelmente estaria envolvido no reconhecimento do LPS bacteriano no citoplasma celular (GIRARDIN *et al.*, 2001).

Posteriormente, GIRARDIN e colaboradores (2003) mostraram que esse receptor não é responsável pelo reconhecimento do LPS, mas sim pelo reconhecimento de fragmentos de peptidoglicano (PGN) gerados a partir da atividade de carboxi-peptidases e hidrolases, e constantemente liberados pelas bactérias (BONECA *et al.*, 2005). Mais especificamente, demonstraram que o Nod1 detecta frações constituídas por muropeptídeos (iE-DAP), fragmentos naturalmente liberados por PGN de bactérias gram-negativas, resultando em ativação de NF- κ B (GIRARDIN *et al.*, 2003a).

GIRARDIN ainda mostra o papel do Nod2 no reconhecimento de PGN, mas uma fração distinta da reconhecida pelo Nod1, denominada muramíl dipeptídeo (MDP) e presente em bactérias gram-negativas e gram-positivas (GIRARDIN *et al.*,

2003b). Contudo, há muito tempo o MDP é conhecido como o menor fragmento do PGN capaz de gerar uma potente estimulação imune (CHEDID, 1983).

Assim como ocorre na sinalização via TLR, a resposta via NLR também necessita de moléculas adaptadoras específicas. A estimulação de Nod1 ou Nod2, por ligantes (iE-DAP e MDP, respectivamente), induz o recrutamento da molécula adaptadora RICK/RIP2 e a interação entre eles ocorre via CARD-CARD (KUFER *et al.*, 2005). A oligomerização de RIP2 resulta na ativação do complexo I κ B quinase, com posterior translocação do NF- κ B para o núcleo. A transfecção de plasmídeos que expressam Nod1 ou Nod2 não induziram NF- κ B em fibroblastos embrionários de camundongos deficientes em RIP2. Isso aponta para o papel fundamental da molécula RIP2 na sinalização via Nod1/Nod2 (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

Alguns estudos anteriores sugeriam que a molécula RIP2 também estava envolvida na sinalização via TLR (CHIN *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2005). Porém, PARK e colaboradores (2007) confirmaram que RIP2 induz a resposta imune inata apenas através de Nod1/Nod2 e não por TLRs. A justificativa é que as preparações dos componentes das moléculas estimulatórias de Nod1 e Nod2 tinham também a presença de alguns contaminantes que também atuavam via TLR (PARK *et al.*, 2007).

A **Figura 2** ilustra as vias de ativação induzida por PGN de bactérias gram-negativas que são reconhecidas por Nod1 ou Nod2 e PGN de bactérias gram-positivas que são reconhecidas apenas por Nod2.

Figura 2: Representação esquemática do reconhecimento de PGN pelos receptores Nod1 e Nod2 (STROBER et al., 2006).

Uma vez que no microambiente intestinal a sinalização via TLR parece ser regulada negativamente para evitar a inflamação induzida por bactérias comensais, os receptores NLR parecem desempenhar um papel essencial no reconhecimento de patógenos específicos com fenótipo invasivo, como EIEC e *Shigella*, e, conseqüentemente, na ativação da resposta inflamatória.

1.2.2. Resposta Inflamatória

O reconhecimento bacteriano pelas células do hospedeiro induz uma resposta inflamatória caracterizada pela secreção de uma série de mediadores solúveis. Contudo, a interação do hospedeiro com bactérias patogênicas como EIEC e *Shigella* é caracterizada pela invasão e destruição da camada epitelial da mucosa intestinal, com uma intensa reação inflamatória devido à ativação de células

epiteliais intestinais por produtos bacterianos e, ainda, à indução de apoptose de células fagocíticas, como os macrófagos e células dendríticas. Ambos os mecanismos levam produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as quais são mediadores de lesão tissular (PHALIPON & SANSONETTI, 2007).

A análise de biópsias do cólon intestinal mostra um infiltrado de células inflamatórias e na camada epitelial é observado edema tissular com áreas de destruição do epitélio intestinal (MARTINO *et al.*, 2005). Foi demonstrada a produção de um grande repertório de mediadores inflamatórios na mucosa intestinal de pacientes infectados com *S. flexneri* e *S. dysenteriae*. Na fase aguda da infecção, foi observado um aumento significativo das citocinas IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ , TGF- β , IL-10. A severidade da doença foi relacionada com o aumento significativo na produção de IL-1, TNF- α e IL-6 (RAQIB *et al.*, 1995).

Células epiteliais intestinais de linhagem humana têm sido bastante descritas como modelos para estudos sobre a interação do hospedeiro com enteropatógenos, uma vez que o intestino é o sítio anatômico alvo da infecção por essas bactérias.

A infecção induzida por enteropatógenos, como *Salmonella*, EIEC, *Shigella* ou *Yersinia* induz as células epiteliais intestinais a modularem positivamente a expressão de vários genes envolvidos na resposta imune. Os produtos bacterianos ativam a resposta inflamatória e, desse modo, provocam a produção de TNF- α , IL-8, MCP-1, COX-1, COX-2, prostaglandinas E2 e F2 α e óxido nítrico, o que altera as funções celulares epiteliais (JUNG *et al.*, 1995; ECKMANN *et al.*, 1997; ELEWAUT *et al.*, 1999; RESTA-LENERT *et al.*, 2002).

Na infecção por *Shigella*, as quimiocinas e as moléculas de adesão são responsáveis pelo recrutamento de células do sistema imune inato, como monócitos

e, principalmente, neutrófilos polimorfonucleares (PMN). HUANG e colaboradores mostraram, *in vitro* e *in vivo*, que células epiteliais intestinais da linhagem HT-29 e enterócitos humanos expressam a molécula de adesão ICAM-1 após infecção por EIEC, *Salmonella*, *Yersinia* ou quando estimulado por IFN- γ . A expressão de ICAM-1 proporciona a interação direta do leucócito com as células epiteliais do hospedeiro, impedindo a remoção desses leucócitos pelo aumento da secreção de fluidos na mucosa intestinal. (HUANG, 1996). A secreção da quimiocina IL-8 tem sido extensivamente relatada durante a infecção por enteropatógenos que, juntamente com ICAM-1, favorece o recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção.

Os neutrófilos são células citotóxicas que têm papel importante na eliminação bacteriana. Os patógenos fagocitados são eliminados pela ação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (BRINKMANN *et al.*, 2004). A elastase produzida pelos neutrófilos aprisiona a bactéria em estruturas filamentosas extracelulares ricas em moléculas antimicrobianas, denominadas “neutrophil extracellular traps” (NETs) (WEINNRAUCH *et al.*, 2002; BRINKMANN *et al.*, 2004). Como dito anteriormente, a migração dessas células para o local da infecção provoca desestabilização do epitélio intestinal e permite a passagem de um maior número de microrganismos que irão invadir os enterócitos através da superfície basolateral, causando a destruição tecidual (SANSONETTI, 2001). Essas células, portanto, não apenas contribuem para a ruptura da barreira intestinal, mas também participam na resolução da doença.

Um estudo envolvendo linhagens de células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2 e T84 mostrou que a invasão por *Salmonella dublin* induziu um aumento na expressão de mediadores pró-inflamatórias, como IL-8 e MCP-1, quimioatraentes para granulócitos e monócitos, respectivamente; TNF- α , potente ativador de

granulócitos e fagócitos, e GM-CSF, capaz de prolongar a sobrevivência dessas células (JUNG et al., 1995).

PÉDRON e colaboradores (2003) demonstraram que *Shigella flexneri* induz um padrão transcricional em células epiteliais intestinais Caco-2. Pela técnica de *microarray*, foi possível observar que após a invasão bacteriana, ocorre aumento na expressão de uma série de moléculas, como quimiocinas (IL-8, CXCL1, 2 e 3), TNF- α , moléculas de adesão ICAM-1, entre outras (PÉDRON et al., 2003).

YANG e colaboradores (1997) mostraram que células epiteliais intestinais expressam e secretam várias quimiocinas C-X-C e C-C, que atuam no recrutamento de populações específicas de leucócitos para o local da infecção, como neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos e, mais recentemente, foi também demonstrada a síntese de CCL20 que atua no recrutamento de células dendríticas. (PÉDRON et al., 2003). Após infecção por *Salmonella*, as células epiteliais intestinais expressam altos nível de quimiocinas C-X-C, como GRO- α , GRO- γ e IL-8 (YANG et al., 1997).

Além da ativação de fatores de transcrição e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, a infecção de células epiteliais intestinais por EIEC induz aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e conseqüente produção de óxido nítrico (NO) (WITTHOFT et al., 1998). O NO é gerado em uma reação na qual uma molécula de L-arginina é oxidada, produzindo uma molécula de L-citrulina e uma de NO. A enzima catalisadora dessa reação é a NO sintase (NOS), que existe em três isoformas: endotelial (eNOS ou NOS3), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS). A expressão de eNOS e nNOS é constitutiva, apresenta pouca produção de NO, e é responsável por funções fisiológicas. No entanto, a iNOS produz grandes quantidades de NO após estímulo de natureza inflamatória e infecciosa (FILHO & ZILBERSTEIN, 2000; RESTA-LENERT &

BARRET, 2002). O NO também pode interagir com uma variedade de substratos como DNA, proteínas, grupos prostéticos e tióis, e, dependendo da concentração em que se encontra, sua atividade pode variar (BOGDAN, 2001; SCHINDLER & BOGDAN, 2001).

A infecção por EIEC e *Shigella* representa um paradigma interessante dos mecanismos imunes do hospedeiro, os quais regulam a inflamação frente às estratégias bacterianas para a sobrevivência no hospedeiro e sua colonização.

Conforme dito anteriormente, apesar das semelhanças no mecanismo de invasão e nos sintomas da disenteria bacilar, a dose infectante de EIEC é muito maior do que a de *Shigella* (DuPONT et al., 1971). Além disso, a doença causada por EIEC parece apresentar-se numa forma mais branda e autolimitante.

Uma possibilidade para explicar essas diferenças seria a maior capacidade de invasão e disseminação por amostras de *Shigella*. Em testes de Serény, realizados em nosso laboratório, observamos que a ceratoconjuntivite desenvolve-se mais rapidamente em cobaias inoculadas com *Shigella* (2 dias) do que em cobaias inoculadas com EIEC (4 a 5 dias). No entanto, FORMAL e colaboradores demonstraram que não há diferenças importantes entre os plasmídios Inv das duas espécies (FORMAL et al., 1983). GIBOTTI e colaboradores (2004), por sua vez, revelaram ainda que os genes *ipaA*, *ipaB*, *ipaC* e *ipaD* não possuem alterações que possam explicar a diferença na patogenicidade entre EIEC e *Shigella*.

Nesse sentido, a partir de 2004, estudos sobre a interação EIEC-hospedeiro vêm sendo conduzidos pelo nosso grupo no laboratório da Prof^a. Tit. Marina Baquerizo Martinez. ALBUQUERQUE (2006), em estudos com macrófagos J774, mostrou que EIEC induziu níveis menores dos genes de virulência quando comparado a *Shigella*, podendo resultar em uma menor tradução protéica. Esses

resultados em relação aos genes de virulência foram corroborados por MORENO (2008), nos estudos sobre a infecção de células epiteliais intestinais Caco-2 com as duas cepas bacterianas (ALBUQUERQUE, 2006; MORENO, 2008).

Além disso, foi observado por AMHAZ (2007) que macrófagos J774, quando infectados com EIEC, apresentam uma maior produção de TNF- α e IL-10 se comparado com macrófagos infectados com *Shigella*. Isso pode estar relacionado com uma eliminação mais eficiente da bactéria. Corroborando com esses resultados, em ensaios *in vivo* foi observada uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção por *Shigella*, enquanto EIEC estimulou uma maior produção de IL-10 (AMHAZ, 2007). O mesmo perfil anti-inflamatório também foi percebido durante a infecção por EIEC em células dendríticas intestinais derivadas de camundongos C57BL/6 (MORENO, 2008).

Contudo, ainda não foram elucidadas diferenças significativas no reconhecimento bacteriano e na resposta imune induzida pela EIEC e pela *Shigella*. Como o curso da doença depende da relação patógeno-hospedeiro, a nossa proposta foi avaliar a resposta inflamatória induzida por EIEC e *Shigella flexneri* em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2, uma vez que a mucosa intestinal é a primeira linha de defesa do organismo contra essas bactérias.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Para melhor entendimento da patogênese da infecção por *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC), este trabalho teve como objetivo caracterizar a resposta inflamatória induzida por esse microrganismo em células epiteliais intestinais humanas da linhagem Caco-2 e compará-la com a resposta induzida pela *Shigella*.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar a capacidade de invasão e disseminação em células epiteliais intestinais Caco-2 após infecção com EIEC ou *S. flexneri*;
- Avaliar a morte das células epiteliais intestinais Caco-2 após infecção com EIEC ou *S. flexneri*;
- Avaliar o reconhecimento bacteriano efetivado pelos receptores da imunidade inata das células intestinais Caco-2 infectadas com EIEC ou *S. flexneri*;
- Avaliar a transcrição e produção de mediadores inflamatórios produzidos pelas células intestinais Caco-2 infectadas com EIEC ou *S. flexneri*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

Para os ensaios de infecção, utilizamos as cepas *Escherichia coli* enteroinvasora FBC124-13 e *Shigella flexneri* M90T (Tabela 1). Essas cepas foram previamente submetidas ao Teste de Serény, para confirmação de sua capacidade invasora (SERÉNY, 1957).

Tabela 1 - Amostras bacterianas

Cepa	Característica	Fonte
FBC124-13	Amostra selvagem de EIEC O124:H-, isolada de fezes diarréicas; possui o plasmídio plnv, teste de Sèreny positivo	Gibotti, A. <i>et al.</i> , 2004
M90T	<i>Shigella flexneri</i> , possui o plasmídio plnv, teste de Sèreny positivo	Dr Phillip Sansonetti, Instituto Pasteur, Paris, France

3.2. Cultura celular

Células epiteliais do intestino humano da linhagem Caco-2 foram cultivadas em Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Cultilab, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 25mM de glicose e solução antibiótica penicilina-streptomicina (100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina), em estufa a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂ (GAILLARD *et al.*, 1997). Os estoques celulares foram mantidos em meio D-MEM, suplementado com 45% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Reino Unido) e, posteriormente, armazenados a - 80°C.

Para os ensaios descritos a seguir, as células foram removidas das garrafas e cultivadas em placas de 6 e 24 poços (TPP, Suíça), até sua diferenciação e polarização (10-14 dias).

3.3. Padronização do inóculo bacteriano

Em todos os ensaios de infecção, as amostras de EIEC e *S. flexneri* foram semeadas em ágar Vermelho Congo e incubadas a 37°C por 48 horas. O ágar Vermelho Congo é composto por *Trypto-casein soya Agar* (TSA), com 0,02% de corante vermelho congo, como previamente descrito por PAYNE & FINKELSTEIN (1977). A coloração vermelha das colônias de EIEC e *S. flexneri* é o resultado da precipitação do corante pelas proteínas secretadas pelas bactérias com fenótipo invasivo, sendo utilizada para distinguir amostras invasoras (colônias VC⁺) e não-invasoras (colônias VC⁻). O fenótipo de precipitação do vermelho congo atua como marcador de virulência (MAURELLI *et al.*, 1984).

Após o período de incubação, mencionado acima, foram selecionadas colônias VC⁺ para semeadura em meio *Tryptic Soya Broth* (TSB), sob agitação a 220 rpm a 37°C (agitador TE-420, Tecnal), por aproximadamente 4 horas, para obtenção da fase *log* de crescimento. Após esse período, as bactérias foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em meio de cultura D-MEM. A absorbância foi quantificada em espectrofotômetro (*Spectronic 20*, Bausch & Lomb) e a turvação foi acertada para se obter uma concentração bacteriana de cerca de 10⁸ bactérias por mL.

3.4. Ensaio de invasão

Os ensaios de invasão foram conduzidos segundo GAILLARD e colaboradores (1997), porém com algumas modificações. Após a confluência e diferenciação celular em placas de 24 poços, as monocamadas celulares foram lavadas com solução salina tamponada (PBS) (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂PO₄ – Sigma, EUA), para remoção do antibiótico remanescente no meio de cultura e as células foram infectadas com cerca de 10⁷ bactérias por poço. As placas foram centrifugadas a 100 x g, por 5 minutos, para favorecer a penetração bacteriana nas células e incubadas em estufa a 37°C (*Jouan IG-150*), com atmosfera de 5% de CO₂ por diferentes intervalos de tempo de infecção (90 e 120 minutos). Após esses períodos, o meio de cultura foi removido, para a posterior adição de meio contendo 50 µg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA) e a cultura celular foi incubada por 30 minutos nas mesmas condições anteriores.

Em seguida, as células foram lavadas com PBS e lisadas com Triton X - 100 a 0,1%. Diluições seriadas foram realizadas, semeadas superficialmente em placas contendo ágar MacConkey e incubadas a 37 °C (estufa 002-CB, Fanem, Brasil), por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada espécie bacteriana.

3.5. Ensaio de disseminação

Após a confluência e diferenciação celular em placas de 24 poços, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS, para a adição de D-MEM sem antibiótico. As células foram infectadas com cerca de 10⁷ bactérias por poço, centrifugadas a 100 x g, por 5 minutos, e incubadas por 2 horas (período

denominado infecção). Depois desse período, o meio foi retirado e adicionou-se meio de cultura contendo gentamicina (50 µg/mL), para remover as bactérias extracelulares e evitar, assim, a reinfecção bacteriana. Após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas de incubação (período denominado pós-infecção), as células foram lavadas com PBS e lisadas com Triton X -100 a 0,1%. Diluições seriadas foram realizadas e semeadas superficialmente em placas contendo ágar MacConkey e incubados a 37°C, por 24 horas, para contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Esses ensaios também foram realizados em triplicata.

3.6. Ensaio de Morte Celular

Logo após o período de infecção (2 horas) e pós-infecção (3 e 6 horas), foi verificado a fragmentação do DNA celular, ou seja, a morte celular induzida por apoptose (AMARANTE-MENDES *et al.*, 1998) ou necrose (SUZUKI *et al.*, 1997). Após os diferentes intervalos de pós-infecção, as células foram recolhidas, lavadas com PBS e ressuspensas em dois tubos com alíquotas celulares iguais.

Em uma alíquota foi adicionado 300 µL de tampão *hypotonic fluorochrome solution* (HFS) (0,1% de citrato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 50 µg/ml de Iodeto de Propídio), por 30 minutos, em ambiente escuro. A membrana plasmática das células foi lisada pelo detergente, para que o Iodeto de Propídio (PI) pudesse se ligar ao DNA. Células com DNA íntegro emitiram alta fluorescência (indicando células vivas ou mortas por necrose), já núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos PI, e por isso emitem menor fluorescência sugestivo de morte por apoptose.

Na segunda alíquota foi adicionado apenas o PI (50µg/ml) diluído em PBS, por 5 minutos. As células com membrana íntegra, nas quais o PI não se incorpora,

emitiram baixa fluorescência (células vivas ou apoptóticas), já quando a membrana plasmática está rompida, o PI se incorpora, emitindo alta fluorescência e sugerindo, desse modo, necrose.

Após as marcações, 20 mil eventos foram captados em Citômetro de Fluxo (*FACScalibur*, Becton-Dickinson) e as amostras foram analisadas no programa *FlowJo version 7.2.4 for Windows*. Tanto a apoptose, quanto a necrose observada nas células infectadas, foram normalizadas com o dano celular observado nas células não-infectadas (controle negativo) de cada período analisado.

3.7. Ensaio de Formação de Placas de Lise

Estes ensaios foram realizados de acordo com Oaks e colaboradores (1985), no entanto foram feitas algumas adaptações. Após a confluência e diferenciação celular em placas de cultura de 6 poços, as monocamadas celulares foram lavadas com PBS para adição de meio sem antibiótico, infectadas com cerca de 10^4 e 10^5 bactérias por poço, por 2 horas (período de infecção), e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, o meio foi descartado para adição de meio contendo gentamicina (50 µg/mL) e as culturas foram incubadas por 30 minutos nas mesmas condições anteriores. O meio foi removido e foi adicionado meio contendo 1% de ágar-ágar e 5µg/mL de gentamicina. As células foram incubadas nas mesmas condições, nos intervalos de tempo de 24, 36 e 72 horas. No tempo mais tardio foi necessário que o inóculo fosse 10 vezes menor do que nos tempos anteriores, pois após 72 horas, a disseminação bacteriana é muito elevada, o que provoca a acidificação do meio e impossibilita a visualização dos halos de lise.

Para visualizar a formação das placas de lise, os poços foram corados com vermelho neutro (0,33%) durante 2 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. O

corante foi retirado e as placas incubadas por aproximadamente 60 minutos, até a secagem total dos poços.

As imagens foram fotografadas, para posterior quantificação do tamanho dos halos de lise. Com o objetivo de determinar com mais precisão o tamanho dos halos de lise, o programa *AdobePhotoshop CS2 for Windows* foi utilizado para medir as dimensões X e Y das placas de lise e, por fim, os gráficos foram plotados com a média desses valores.

3.8. Extração de RNA

Foi realizado ensaio similar **item 3.5** (2 horas de infecção), para extração do RNA total que foi utilizado nos ensaios de RT-PCR e *Ribonuclease Protection Assay* (RPA). Após diferentes tempos de pós-infecção, 3, 6 e 12 horas, o meio contendo gentamicina (50µg/ml) foi retirado e a extração do RNA total das células Caco-2 foi realizado utilizando o *Kit RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. A preparação foi tratada com DNase (*RNase-Free DNase set*) (Qiagen) e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% no tampão de corrida TBE 1x (Trisma-base 0,1M, ácido bórico 0,09M e EDTA 1mM) e analisadas após coloração com brometo de etídio (10 ug/ml) sob luz ultravioleta (UV), para observar a integridade do RNA.

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

3.9. Síntese de DNA complementar

O RNA foi diluído até uma concentração final de 10 ng/μL para síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o *Kit Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Brasil), de acordo com as recomendações do fabricante. Como iniciador utilizou-se oligo(Dt), que se hibridiza com a cauda poly(A), encontrada na maioria do RNA de células eucarióticas. O cDNA obtido foi utilizado no RT-PCR.

3.10. RT-PCR

O cDNA obtido foi amplificado por reação de PCR, para análise da transcrição dos genes avaliados. Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: 1,5 mM de MgCl₂, 150 μM de dNTPs, 0,4 μM de cada iniciador, 1,5 U de Taq DNApolimerase, tampão da enzima 1x concentrado (Fermentas), 1 μL de cDNA e água miliQ estéril em um volume final de 20 μL. As condições de PCR foram as seguintes: etapa inicial de desnaturação por 5 minutos, a 94°C; cerca de 30 ciclos com desnaturação por 45 segundos, a 94°C, anelamento por 45 segundos, na temperatura ideal de cada par de iniciadores e extensão por 1 minuto, a 72°C; etapa final de extensão por 7 minutos. Os iniciadores utilizados e seus respectivos tamanhos estão descritos na **tabela 2**.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% após separação eletroforética por 60 minutos em tampão de corrida TBE 1x. O gel foi corado em brometo de etídio (10 ug/ml), para observação das bandas sob luz ultravioleta (UV). As imagens foram digitalizadas pelo sistema *Photodocumentation*

System modelo: DP-001.FDC version 10 (Vilber Lourmat, França) e impressas pelo sistema de Vídeo Graphic UP-895CE (Sony).

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

Tabela 2 - Iniciadores utilizados na reação RT-PCR semi-quantitativo

Gene	Seqüências (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de hibridização
<i>nod1</i>	F- TCCAAAGCCAAACAGAACTC R- CAGCATCCAGATGAACGTG	180	59°C
<i>nod2</i>	F- GAAGTACATCCGCACCGAG R- GACACCATCCATGAGAAGACAG	172	60°C
<i>TLR4</i>	F- CTGCAATGGATCAAGGACCA R- TCCCACTCCAGGTAAGTGTT	432	60°C
<i>TLR2</i>	F- GGCCAGCAAATTACCTGTGTG R- CCAGGTAGGTCTTGGTGTTC	448	57°C
<i>gapdh</i>	F- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R- GAAGATGGTGATGGGATTTC	174	59°C

3.11. Ribonuclease Protection Assay (RPA)

O ensaio de RPA foi realizado de acordo com o fabricante (BD RiboQuant, EUA) e consiste basicamente na síntese de RNA mensageiro (mRNA) antisense marcado com UTP[$\alpha^{32}\text{P}$], os quais servem como sondas para detecção de mRNA de

genes específicos de interesse. Essa sonda é sintetizada em um sistema de transcrição *in vitro*, utilizando como moldes fragmentos das seqüências dos mRNA de interesse, cada qual com um tamanho distinto, e os quais são clonados em um plasmídeo contendo o sítio de ligação da T7 RNA *polimerase*. Dessa forma, cada produto da transcrição terá um tamanho característico diferente dos demais. O conjunto de sondas é hibridizado ao RNA total da amostra de interesse, sendo essa reação seguida da ação de uma RNase, que quebrará todos RNA de fita simples, mantendo intactos aqueles que estiverem ligados às seqüências complementares. Esses RNAs, protegidos da RNAase, são purificados e aplicados em gel desnaturante de poliacrilamida.

3.11.1. Síntese das sondas

Para a síntese das sondas, os seguintes reagentes foram adicionados nesta seqüência: 1 µL Rnasin (40U/ µL), 1 µL de uma mistura de nucleotídeos GACU (CTP, ATP, GTP (2,5mM) e UTP (61 µM)), 2 µL de DTT (Dietiltreitol 100mM), 4 µL de tampão de transcrição 5X, 1 µL da mistura de moldes de RNA de interesse, 10 µL de UTP[$\alpha^{32}\text{P}$] e 1 µL RNA polimerase T7 (20 U/ µL). Após suave agitação, com auxílio de uma pipeta, e uma rápida centrifugação (*Mini Spin Plus*, Eppendorf, EUA), a mistura foi incubada a 37°C, por 1 hora. A reação foi finalizada com a adição de 2 µL de Dnase/Rnase-free (1 U/µL), quando a mistura foi gentilmente homogeneizada e incubada a 37°C por 30 minutos.

Nesta seqüência foi adicionado 26 µL de EDTA 20mM, 25 µL de Fenol saturado com Tris-HCl, 25 uL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1) e 2 µL de RNA transportador (RNAt) de levedura (2 mg/mL), seguido de uma agitação vigorosa em vortex e de uma centrifugação por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase

aquosa superficial foi transferida para um novo tubo, ao qual adicionou-se 50 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1). Após homogeneização e centrifugação por 2 minutos em temperatura ambiente, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e foi adicionado 50 µL de acetato de amônia 4 M e 250 µL de etanol 100% gelado. A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 30 minutos a -70°C.

Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante cuidadosamente retirado. Ao precipitado foi adicionado 100 µL de etanol 90% gelado e submetido à nova centrifugação por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado permaneceu em temperatura ambiente de 5 a 10 minutos, para secagem. O precipitado foi ressuspensionado em 50 µL de tampão de hibridização, rapidamente centrifugado e uma alíquota de 1 µL foi retirada, em duplicata para quantificação da marcação em um Contador de Radiação beta.

3.11.2. Preparação do RNA e hibridização

Para os ensaios de hibridização, foram utilizados 8 µg do RNA total obtido de cada uma das amostras de interesse (de acordo com o **item 3.8**), as quais foram aliquotadas e concentradas para volume final de 2 µL, utilizando centrifuga a vácuo. Foi utilizado um tubo contendo RNAt de levedura como controle negativo da reação e como controle positivo foi utilizado 2 µg do RNA controle (BD RiboQuant).

As amostras de RNA foram precipitadas, secas e ressuspensionadas, com auxílio de um vortex, em 8 µL do tampão de hibridização. As sondas foram diluídas para concentração apropriada, conforme as indicações do fabricante. A cada amostra de RNA, foi adicionado 2 µL da sonda diluída e suavemente homogenizada com pipeta. Para evitar a evaporação, foi adicionado 50 µL de óleo mineral em cada

tubo. Os tubos contendo as amostras foram transferidos para um banho-seco pré-aquecido a 90°C e submetido a uma redução da temperatura até 56°C, por 12-16 horas.

3.11.3. Tratamento com RNase

Antes do tratamento com RNase, as amostras foram submetidas a uma redução gradativa da temperatura até 37°C, por 15 minutos. Após esse período, foi adicionado óleo mineral e 100 µL de uma solução de RNase [2,5 mL de tampão de RNase e 6 µL de RNase A + T1 (A: 80 ng/ µL; T1: 250 U/ µL), volume para 20 amostras]. Os tubos foram submetidos a uma centrifugação por 10 segundos e incubados por 45 minutos a 30°C.

Em um novo tubo foi adicionado 18 µL de uma solução fresca de proteinase K (390 µL de tampão de proteinase K, 30 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 30 µL de RNAt de levedura, para 20 amostras. Com a pipeta, a fase inferior da reação de RNase foi transferida para o tubo à solução de proteinase K, homogeneizada em vortex e centrifugada. A reação ocorreu a 37 °C, por 15 minutos. Nesse tubo foram adicionados 65 µL de fenol saturado em Tris e 65 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1) que, após homogenização vigorosa, foi submetido a centrifugação, por 5 minutos, à temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, ao qual foram adicionados 120 µL de acetato de amônia 4 M e 650 µL de etanol 100% gelado. Após homogeneização por inversão, a mistura foi incubada por 30 minutos a -70°C e centrifugada por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado lavado com 100 µL de etanol 90% gelado. Depois de uma nova centrifugação de 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado seco à temperatura ambiente. Antes de aplicar as

amostras no gel, o material foi ressuspendido em 5 μ L de tampão de amostra com auxílio de um vortex, e posteriormente as amostras foram mantidas no gelo até a aplicação no gel.

3.11.4. Resolução em gel das sondas protegidas

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida de aproximadamente 40 cm de altura e 0,4 mm de espessura. As placas de vidro utilizadas como molde foram devidamente limpas e siliconizadas antes da montagem do aparato para polimerização do gel. Para este ensaio, utilizou-se um gel de acrilamida com concentração final de 5%, ao qual foram adicionados os seguintes reagentes: 74,5 mL de solução de acrilamida (19:1 acrilamida/bis: 8,85 mL de acrilamida 40%, 9,31 mL de bisacrilamida 2%, 7,45 mL de TBE10x, 35,82g de uréia em volume final de água destilada para 74,5 mL, 450 μ L de persulfato de amônio 10%, 60 μ L de TEMED). A solução foi imediatamente aplicada no molde e, ao término da aplicação, um pente de 5mm de largura foi colocado para formação dos poços de aplicação. Após a polimerização foi realizada a pré-corrida em tampão TBE 0,5x por 85 w por 40 minutos.

Após esse período, as amostras e o marcador de peso molecular de sonda diluída em solução de hibridização na concentração de 1000-2000 cpm foram aplicadas e observadas as migrações no gel até que o corante azul de bromofenol atingisse por volta de 30 cm por 75 w. O aparato do gel foi desmontado, a placa menor removida e um papel filtro 3M foi colocado sobre o gel. Para secagem do gel, a montagem foi envolta em filme de plástico e transferida para o secador de gel (ByoSystems), onde permaneceu por 30 minutos a 80°C.

A identificação das bandas correspondentes aos RNAs protegidos foi possível através da plotagem das distâncias entre elas em papel gráfico semi-log, que fornece uma curva padrão de distância de migração versus log do comprimento de nucleotídeo, conforme as recomendações do fabricante (BD RiboQuant). É importante observar que o comprimento da sonda foi maior do que o dos fragmentos protegidos devido à presença de seqüências flanqueadas nas sondas derivadas dos plasmídeos. Após obtenção da imagem digital, os tamanhos dos fragmentos de mRNA foram submetidos à análise densitométrica da intensidade das bandas no programa *PhotoCaptMw version 10.01 for Windows*.

3.12. ELISA

Para avaliação da concentração das citocinas e quimiocinas foram realizados ensaios similares aos descritos no **item 3.5** (2 horas de infecção), por diferentes intervalos de tempo de pós-infecção, de 3, 6 e 24 horas para retirada do sobrenadante da cultura celular. A concentração de citocinas e quimiocinas no sobrenadante celular foi determinado por ELISA de captura (PeproTech, México), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com o anticorpo de captura diluído em PBS e incubadas *overnight*. Após lavagem com PBS acrescido de tween-20 a 0,05%, as placas foram incubadas por 1 hora, com PBS contendo 0,1% de BSA (Sigma, EUA), para promover o bloqueio dos sítios livres do plástico. A curva-padrão foi realizada utilizando citocinas recombinantes diluídas em PBS com 1% de BSA, e as amostras foram incubadas por 2 horas.

As placas foram lavadas com PBS acrescido de tween-20 a 0,05% e incubadas por 2 horas, com os anticorpos de detecção conjugados à biotina e

diluídos em PBS acrescido 0,1% BSA. Após esse período, as placas foram lavadas e incubadas com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 30 minutos. As placas foram novamente lavadas e foi adicionada o-fenilenodiamina (1 mg/mL), diluída em tampão citrato de sódio (0,1 M, pH 4,5) e incubadas por 10 a 30 minutos para posterior revelação. Para o bloqueio da reação, foi utilizado ácido sulfúrico 4N e a leitura das densidades ópticas foi realizada em leitor automático (comprimento de onda de 450 nm). As concentrações de cada citocina nas amostras foram calculadas mediante equação de regressão linear com base na curva-padrão. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.13. Detecção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico foi analisada pelo método de Griess (RESTA-LENERT & BARRETT, 2002). Foram realizados ensaios similares descritos no **item 3.5**, nos intervalos de pós-infecção de 3, 6, 12 e 24 horas para retirada do sobrenadante da cultura celular.

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

3.14. Análises Estatísticas

A Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two way* ANOVA (Teste Turkey). As diferenças entre os grupos serão consideradas significativos quando o valor de p for <0.05 .

4. RESULTADOS

4.1. Invasão bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2

No intuito de avaliar a capacidade invasora das cepas bacterianas de *S. flexneri* e EIEC em células Caco-2 e escolher o tempo ideal de infecção para os ensaios posteriores, foi realizada uma cinética de invasão nos intervalos de tempos de 90 e 120 minutos. Para isso, células Caco-2 foram mantidas em cultura até a formação de uma monocamada e sua diferenciação. Passado esse período, as bactérias foram adicionadas à cultura celular em uma proporção de 10:1. Após os intervalos de tempo mencionados acima, o sobrenadante das culturas foi removido, para adição de meio contendo gentamicina (50 ug/mL) e as culturas foram incubadas por 30 minutos, a fim de permitir a eliminação das bactérias extracelulares. Por fim, as células foram lisadas para posterior quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *S. flexneri* e EIEC.

Em ambos os intervalos de tempo avaliados, não houve diferença entre o número de bactérias viáveis de EIEC e de *S. flexneri* encontradas no interior das células Caco-2. As médias de UFC de EIEC e *S. flexneri* encontradas foram 8×10^3 e 9×10^3 após 90 minutos, 19×10^3 e 22×10^3 após 120 minutos, respectivamente. Os resultados indicam que essas bactérias apresentam uma semelhante capacidade de invasão em células Caco-2 (**Figura 3**). Até 120 minutos há uma similaridade na capacidade de invasão de ambas as bactérias estudadas. Dados da literatura demonstraram que após 2 horas de infecção por *S. flexneri* em células epiteliais intestinais de linhagem humana há um aumento na expressão de alguns mediadores inflamatórios e em moléculas de adesão, sugerindo que esse tempo é suficiente para ocasionar a resposta do hospedeiro (PÉDRON *et al.*, 2003). Dessa maneira, 2

horas de infecção foi o tempo escolhido para todos ensaios posteriores, sendo denominado período de infecção, e os intervalos posteriores de pós-infecção.

Figura 3: Ensaio de invasão bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 nos intervalos de tempo de 90 e 120 minutos. Após esses períodos, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 30 minutos, e por fim, lisadas e semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias encontradas no interior das células epiteliais intestinais Caco-2 após infecção pelas duas bactérias. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.2. Disseminação bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2

A próxima etapa consistiu em avaliar, de maneira comparativa, a capacidade de disseminação intracelular das cepas bacterianas em células epiteliais humanas da linhagem Caco-2. Para isso, células Caco-2 foram diferenciadas e submetidas ao período de infecção (2 horas) com *S. flexneri* ou EIEC, como descrito acima. Em seguida, as bactérias extracelulares foram removidas para adição de meio de cultura contendo gentamicina (50 ug/mL), de forma a evitar a reinfecção e possibilitar a avaliação da capacidade das bactérias em se proliferarem e disseminarem no interior das células Caco-2.

Inicialmente, foi realizada uma cinética nos intervalos de tempo 2, 4, 6, 8 e 10 horas pós-infecção, porém, a partir de 8 horas observamos um descolamento parcial das monocamadas celulares Caco-2, o qual impossibilitou a quantificação das bactérias intracelulares. Sendo assim, decidimos realizar uma cinética somente até 6 horas pós-infecção e com intervalos de uma hora.

Nas três primeiras horas pós-infecção com *S. flexneri* ou EIEC em células Caco-2, o número de UFC obtidas de ambas as bactérias foi relativamente constante. No entanto, 4 horas pós-infecção observamos uma maior disseminação da *S. flexneri* em relação a EIEC, já que foi encontrado aproximadamente duas vezes mais *S. flexneri* do que EIEC no interior das células Caco-2. Esse perfil foi ainda mais evidente 5 horas pós-infecção, quando observamos cerca de 2,5 vezes mais *Shigella* no interior das células Caco-2 do que EIEC. No intervalo de tempo de 6 horas, a quantidade de *S. flexneri* intracelular diminuiu e esse mesmo perfil foi observado na infecção por EIEC. Contudo, a partir de 4 horas pós-infecção, permaneceu a diferença significativa entre o número de UFC de *S. flexneri* e EIEC intracelular ($p < 0,01$) (**Figura 4**).

Esses resultados sugerem que a capacidade inicial de invadir a célula Caco-2 é semelhante entre *S. flexneri* e EIEC, porém, a capacidade de escape do fagossoma, proliferação intracelular e disseminação de EIEC é bastante inferior ao observado pela *S. flexneri*.

Figura 4: Ensaio de disseminação bacteriana em células epiteliais intestinais Caco-2. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 e previamente incubadas, por 2 horas, com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, em diferentes intervalos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas pós-infecção. Por fim, as células foram lisadas e semeadas superficialmente em placas de ágar MacConkey. Foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das bactérias encontradas no interior das células Caco-2 após infecção e disseminação das duas bactérias. Em 4 horas ou mais de pós-infecção, o número de *S. flexneri* encontrado no interior das células Caco-2 foi significativamente maior do que o de EIEC. ** ($p < 0,01$) em relação às duas bactérias (*S. flexneri* X EIEC) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.3. Ensaio de morte celular

Para determinar a indução de morte por apoptose ou necrose das células Caco-2 após infecção por *S. flexneri* e EIEC, nós realizamos citometria de fluxo nos períodos de pós-infecção de 3 e 6 horas. Como descrito nos *Materiais e Métodos*, a apoptose foi avaliada pela integridade do DNA após a incorporação de iodeto de propídeo (PI), diluído em tampão HSF, o qual lisa a membrana celular e permite a incorporação do PI. Para a avaliação da morte celular por necrose, utilizamos PI diluído em PBS. Nessas condições o PI se incorpora somente ao DNA das células que não mais possuem a membrana celular intacta. É importante ressaltar que tanto a apoptose quanto a necrose foram analisadas a partir de uma mesma amostra, permitindo assim a avaliação da morte total das células Caco-2 induzida por *S.*

flexneri e EIEC. Além disso, os resultados foram normalizados com a porcentagem de dano celular das células Caco-2 não infectadas em cada período avaliado.

A indução da morte por apoptose das células Caco-2 infectadas por *S. flexneri* foi significativamente maior do que a apoptose induzida por EIEC ($p < 0,01$) em ambos os intervalos de tempo. Após 3 horas pós-infecção, a *S. flexneri* induziu um aumento de 32% em relação ao controle no número relativo de células Caco-2 em apoptose, enquanto para EIEC foi observado um aumento de apenas 4%. O mesmo perfil foi observado após 6 horas pós-infecção, com valores ainda mais expressivos, sendo 65% para a *S. flexneri* e 13% para a EIEC (**Figura 5A**). A indução de necrose das células Caco-2 não foi significativamente diferente entre a infecção por *S. flexneri* e EIEC em ambos os tempos avaliados, ainda que a EIEC tenha induzido cerca de 5% (3 horas) e 10% (6 horas) mais necrose do que a *S. flexneri* (**Figura 5B**). A *S. flexneri* mostrou-se capaz de causar maiores danos às células Caco-2, uma vez que a somatória da morte por apoptose e por necrose foi aproximadamente 2 vezes maior do que a EIEC em ambos os tempos avaliados ($p < 0,05$). Como esperado, os danos celulares aumentaram conforme o passar do tempo de infecção (**Figura 5C**).

É importante ressaltar que a EIEC induziu mais a morte das células Caco-2 por necrose do que por apoptose, enquanto a *S. flexneri* foi capaz de induzir mais morte por apoptose.

Figura 5: Ensaio de morte de células Caco-2 induzida pela disseminação bacteriana. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 e previamente incubadas, por 2 horas, com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina nos intervalos de 3 e 6 horas pós-infecção (disseminação). Em seguida, as células Caco-2 foram avaliadas por citometria de fluxo. **(A)** Gráfico representativo da morte induzida por apoptose nas células infectadas por *S. flexneri* e EIEC em relação às células Caco-2 não-infectadas. **(B)** Gráfico representativo da morte induzida por necrose nas células infectadas por *S. flexneri* e EIEC em relação às células não-infectadas. **(C)** Gráfico representativo da morte induzida por apoptose e necrose nas células infectadas por *S. flexneri* e EIEC em relação às células não-infectadas. * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) em relação às duas bactérias (*S. flexneri* X EIEC) para um mesmo tempo analisado. Os resultados são representativos de dois experimentos independentes

4.4. Ensaio de formação de placas de lise em células Caco-2

Para confirmar a menor capacidade de disseminação da EIEC, a relação da queda no número de ambas as bactérias com a morte das células Caco-2 e, em especial, a intensa diminuição de UFC de *Shigella*, optamos por realizar o ensaio de formação de placas de lise (*plaque assay*) (OAKS *et al.*, 1985). Os halos de lise representam a internalização, o escape do fagossoma, a replicação no citoplasma

da célula Caco-2 e a subsequente disseminação da *S. flexneri* e EIEC para as células adjacentes, levando à formação de uma área de células mortas nos intervalos de tempo de 36, 48 e 72 horas pós-infecção (**Figura 6A**).

Em todos os intervalos de tempo avaliados, os halos de lise formados por *S. flexneri* foram significativamente maiores do que os provocados pela EIEC ($p < 0,001$). Surpreendentemente, a média dos diâmetros dos halos de lise induzidos por EIEC no tempo mais tardio (72 horas) foi bastante inferior ao formado por *S. flexneri* no tempo mais precoce (36 horas), confirmando a sua menor capacidade de disseminação nas células Caco-2. Além disso, o diâmetro dos halos de lise formados por ambas as bactérias se apresentaram maiores nos sucessivos intervalos de tempo. O menor número de halos de lise formados após 72 horas pós-infecção é devido ao inóculo ser 10 vezes menor do que nos tempos anteriores, pois após 72 horas pós-infecção, a disseminação bacteriana é muito elevada, o que provoca a acidificação do meio e impossibilita a visualização dos halos de lise (**Figura 6**).

Dessa maneira, a avaliação da formação de placas de lise confirmou a maior capacidade da *S. flexneri* em se disseminar na monocamada de células Caco-2 e, assim, provocar maiores danos celulares quando comparada com a EIEC.

Figura 6: Ensaio de formação de placas de lise nas células Caco-2 infectadas por *S. flexneri* e EIEC. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^4 e 10^5 bactérias de *Shigella flexneri* M90T e EIEC FBC124-13 e incubadas, por 2 horas, com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, por 30 minutos, para adição de meio contendo ágar-ágar e incubadas por intervalos de tempo de 36, 48 e 72 horas pós-infecção (A). Para quantificação do tamanho dos halos de lise em milímetros, utilizamos o software *Adobe Photoshop CS2* (B). Os resultados são representativos da média $\pm$ DP de 20 halos formados pela lise celular em cada período analisado. *** ($p < 0,001$) em relação às duas bactérias (*Shigella* X EIEC) para um mesmo intervalo de tempo analisado.

4.5. Análise da transcrição relativa dos receptores Nod1, Nod2, TLR2 e TLR4

No intuito de avaliar o papel dos receptores da imunidade inata envolvidos no reconhecimento bacteriano das células Caco-2, analisamos a transcrição relativa dos genes *nod1*, *nod2*, *TLR4* e *TLR2* por RT-PCR 3 e 6 horas pós-infecção com *S. flexneri* ou EIEC. Para tanto, utilizamos o mesmo número de amplificações para sincronismo na comparação da expressão relativa desses genes (30 ciclos para os genes de interesse e 18 ciclos para o gene controle *gapdh*).

Nos dois intervalos de tempo analisados, o nível da transcrição do gene *nod1* foi significativamente maior nas células Caco-2 infectadas por ambas cepas bacterianas, quando comparadas com as células não infectadas, sendo mais significativo na infecção por EIEC ($p < 0,01$) do que na infecção por *S. flexneri* ($p < 0,05$). De maneira interessante, a infecção com EIEC induziu uma maior transcrição relativa do gene *nod1* pelas células Caco-2, quando comparada com a infecção com *S. flexneri* ($p < 0,001$) nos dois intervalos de tempos analisados. Em relação à transcrição relativa do receptor TLR4 pelas células Caco-2, observamos que não houve uma modulação positiva após a infecção com as duas bactérias e esses níveis foram bem inferiores ao observado no gene *nod1* (**Figura 7A/B**). Além disso, nos dois intervalos de tempo analisados, não observamos a transcrição relativa dos genes *nod2* e *TLR2*, embora a transcrição desses dois genes tenha sido encontrada com quantidades maiores de ciclos na reação de PCR (dados não-mostrados).

Esses resultados indicam o papel essencial do receptor intracelular Nod1 no reconhecimento dessas bactérias pelas células Caco-2, sugerindo ainda que a EIEC seja mais eficientemente reconhecida pelas células Caco-2 do que a *S. flexneri*. Para melhor visualização da relação entre as intensidades de bandas dos genes

alvos e do controle interno, as densidades das bandas dos genes *nod1*, *nod2*, *TLR4*, *TLR2* e *gapdh* foram analisadas no software *PhotoCaptMw 10.01 for Windows* (Figura 7B).

Figura 7: Ensaio de transcrição relativa dos genes *nod1*, *nod2*, *TLR2* e *TLR4* das células Caco-2 após infecção por *S. flexneri* e EIEC nos intervalos de 3 e 6 horas pós-infecção. Gel de agarose com os produtos de PCR dos genes *nod1*, *TLR4* e *gapdh* (A). Gráfico esquemático da expressão relativa dos genes de interesse após análise densitométrica das bandas do gel (B). Observa-se que EIEC induz maior expressão de *nod1* nos dois tempos analisados. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) em relação às células Caco-2 não infectadas para um mesmo intervalo de tempo analisado. ## ($p < 0,01$) em relação às duas bactérias (EIEC X *S. flexneri*) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

4.6. Ensaio de Proteção da Ribonuclease (RPA)

Para avaliar a transcrição de genes envolvidos na resposta das células epiteliais Caco-2, infectadas por *S. flexneri* ou EIEC, decidimos utilizar a técnica RPA (BD RiboQuant), pois possibilita a análise de vários genes simultaneamente. Como descrito em *Materiais e Métodos*, as células Caco-2 foram submetidas ao período de infecção e pós-infecção com *S. flexneri* e EIEC. O RNA total foi extraído depois de 3 horas de pós-infecção bacteriana e foi utilizado uma sonda (*hCK-8 multi-probe template set*) para avaliação da transcrição das quimiocinas eotaxina, RANTES, MCP-4, MIP-1 β , MCP-2, MIP-1 α , MCP-1, MCP-3, I-309, HCC-1, L32 e GAPDH.

(Figura 8). Utilizamos também uma sonda customizada (*Custom Human Template Set*) para NF- κ B, caspase-3, PKC- α , ICAM-1, TLR4, c-jun, caspase-7, caspase1, L32 e GAPDH (Figura 9). Como controle interno estão os dois últimos genes, L32 e GAPDH, presentes nas duas sondas avaliadas.

Após 3 horas de pós-infecção, observamos que ambas cepas bacterianas não induziram a produção de níveis detectáveis de RNAm das quimiocinas eotaxina, RANTES, MCP-4, MIP-1 β , MCP-2, MIP-1 α , MCP-3, I-309. O RNAm para as quimiocinas relacionadas com a migração de monócitos MCP-1 e HCC-1 foi detectado em baixos níveis, além de não apresentar diferença significativa entre o RNAm de células Caco-2 infectadas e não infectadas (Figura 8A/B). Para melhor visualização da relação entre as intensidades de bandas dos genes alvos, as densidades das bandas foram analisadas no programa *PhotoCaptMw 10.01 for Windows* (Figura 8B).

Figura 8: Ensaio de proteção da ribonuclease após 3 horas de pós-infecção das células Caco-2 com *S. flexneri* ou EIEC. O mRNA das células Caco-2 infectadas com *S. flexneri* ou EIEC foi analisado pela técnica de RPA para visualização da expressão relativa de mediadores químicos relacionados à resposta inflamatória. Gel de poliácridamida da separação eletroforética dos mRNA específicos; 1- Sonda Controle, 2/5 - Caco-2 não infectada, 3/6 Caco-2 infectada com *Shigella* 4/7- Caco-2 infectada com EIEC, 8- RNA controle (A). Gráfico esquemático da expressão relativa dos genes alvos após análise densitométrica das bandas do gel de poliácridamida (B). Resultados representativos de dois experimentos independentes.

Com a segunda sonda foram avaliados os genes relacionados à resposta inflamatória das células Caco-2 após infecção com as bactérias *S. flexneri* ou EIEC. Observamos que após 3 horas de pós-infecção com ambas cepas bacterianas, as células Caco-2 apresentaram um padrão transcricional para uma resposta pró-inflamatória similar, incluindo um aumento de cerca de 1,5 vezes de RNAm do gene do fator transcricional NF-kB em relação às células não-infectadas ($p < 0,05$), bem como cerca de 2 vezes mais RNAm da molécula de adesão ICAM-1 ($p < 0,05$) e cerca de 2,2 vezes mais RNAm de c-Jun do que as células não-infectadas ($p < 0,05$).

Em contrapartida, a avaliação dos genes relacionados com apoptose celular caspase-1, caspase-3 e caspase-7 não revelou nenhuma síntese significativa de RNAm dessas proteínas pelas células infectadas em relação às células não infectadas durante o intervalo analisado. Também não foi observado uma diferença significativa na síntese de RNAm do receptor TLR4 nas células Caco-2 infectadas, em relação às células não infectadas (**Figura 9A/B**). Mais uma vez a densidade das bandas foi analisada no programa *PhotoCaptMw 10.01 for Windows* (**Figura 9B**).

Nossos resultados indicam que tanto a *S. flexneri* quanto a EIEC induziram um aumento na transcrição de NF-kB, c-Jun e ICAM-1 em um tempo precoce de pós-infecção. Contudo, no tempo avaliado nenhuma das bactérias induziu um aumento na transcrição de genes de quimiocinas, do receptor TLR4 ou genes relacionados com morte celular.

Figura 9: Ensaio de proteção da ribonuclease após 3 horas de pós-infecção das células Caco-2 por *S. flexneri* ou EIEC. O mRNA das células Caco-2, infectadas com *Shigella* ou EIEC, foi analisado pela técnica de RPA para visualização da expressão relativa de mediadores relacionados à resposta inflamatória. Gel de poliácridamida da separação eletroforética dos mRNA específicos 1- Sonda Controle, 2/5 - Caco-2 não-infectada, 3/6 Caco-2 infectada com *S. Flexneri* 4/7- Caco-2 infectada com EIEC (A). Gráfico esquemático da expressão relativa dos genes alvo após análise densitométrica das bandas do gel de poliácridamida (B). * ($p < 0,05$) em relação às células Caco-2 não-infectadas no mesmo intervalo de tempo analisado. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

4.7. Determinação da produção de TNF- α , IL-8 e MCP-1

Ainda na tentativa de avaliar o perfil pró-inflamatório induzido por *S. flexneri* ou EIEC nas células Caco-2, nós determinamos por ELISA a produção da citocina TNF- α e das quimiocinas IL-8 e MCP-1 após os períodos de pós-infecção de 3, 6 e 24 horas.

Após 3 e 6 horas de pós-infecção com ambas bactérias não houve uma produção significativa de TNF- α pelas células Caco-2, quando comparada com as células não infectadas (produção basal). No intervalo de 24 horas pós-infecção, a produção de TNF- α foi significativamente maior nas células infectadas com *S. flexneri* ($p < 0,01$) e EIEC ($p < 0,01$) em relação ao valor basal. Porém, não houve

diferença significativa na produção de TNF- α induzida pelas duas bactérias após a infecção em células Caco-2 (**Figura 10A**).

Após o período de 6 horas pós-infecção por *S. flexneri* ou EIEC foi induzida a produção de níveis significativos de IL-8 ($p < 0,05$) em relação aos níveis basais, contudo não foi observado uma diferença significativa entre a produção dessa quimiocina induzida pela *S. flexneri* e pela EIEC. Já no intervalo de 24 horas pós-infecção, foi observado uma diferença significativa na síntese de IL-8 pelas células Caco-2 infectadas com *S. flexneri* ($p < 0,01$) e EIEC ($p < 0,05$), em relação às células não infectadas. Além disso, as células Caco-2 infectadas com *S. flexneri* apresentaram uma produção de IL-8 cerca de 1,5 vezes maior do que as células infectadas com EIEC ($p < 0,05$) (**Figura 10B**). Em relação à quimiocina MCP-1 pelas células Caco-2, não foram observadas diferenças estatísticas entre as células infectadas ou não infectadas e também entre as duas bactérias (**Figura 10C**).

Dessa maneira, nossos resultados indicam que as duas bactérias induzem a produção de TNF- α e IL-8, sendo que a produção de IL-8 já aparece 6 horas pós-infecção, enquanto a produção de TNF- α foi observada somente após 24 horas. Além disso, os níveis de IL-8 induzidos pela *S. flexneri* após 24 horas foram superiores aos níveis induzidos pela infecção com EIEC.

Figura 10: Ensaio de determinação da produção da citocina TNF- α e das quimiocinas IL-8 e MCP-1 das células Caco-2 após infecção com *S. flexneri* ou EIEC nos intervalos de 3, 6 e 24 horas pós-infecção. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com 10^7 bactérias de *S. flexneri* M90T ou EIEC FBC124-13 e previamente incubadas por 2 horas com as bactérias em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, nos diferentes intervalos de 3, 6 e 24 horas (período pós-infecção), para avaliação da presença de TNF- α (A), IL-8 (B) e MCP-1(C) no sobrenadante das culturas celulares. (p<0,05), ** (p<0,01) em relação às células Caco-2 não infectadas em um mesmo intervalo de tempo analisado. # (p<0,05) em relação às duas bactérias (*S. flexneri* X EIEC) em um mesmo intervalo de tempo analisado. Os dados representam a média de 3 experimentos independentes.

4.8. Determinação da produção de óxido nítrico

A oxidação do óxido nítrico (NO) a nitrito (NO₂⁻) em meio de cultura permite a detecção da produção de NO e consequente avaliação da capacidade microbicida

celular. Dessa maneira, as células Caco-2 foram infectadas com *S. flexneri* ou EIEC nos intervalos de tempos 3, 6, 12 e 24 horas de pós-infecção e os sobrenadantes das culturas celulares foram removidos para posterior detecção de NO.

Observamos que a produção de NO pelas células Caco-2 infectadas com *S. flexneri* ou EIEC não apresentaram diferenças significativas após 3 horas de pós-infecção em relação à produção basal. Contudo, nos períodos posteriores nota-se uma diferença significativa entre as células infectadas e não infectadas, assim como entre as células infectadas com *S. flexneri* e EIEC. No intervalo de tempo de 6 horas, as células infectadas com EIEC produziram cerca de 6 vezes mais NO do que as células não infectadas e cerca de 2 vezes mais NO do que as células infectadas com *S. flexneri* ($p < 0,001$). Essa maior produção de NO induzida por EIEC em relação a *S. flexneri* também foi significativa no intervalo de tempo de 12 horas ($p < 0,01$). A *S. flexneri* induziu uma crescente produção de NO em relação ao tempo de infecção, ultrapassando os níveis de EIEC após 24 horas de pós-infecção ($p < 0,05$) (**Figura 11**).

É importante ressaltar que a EIEC mostrou uma tendência a induzir uma precoce produção de NO, até o tempo de 12 horas de pós-infecção, apresentando o pico máximo no intervalo de 6 horas. Já a *S. flexneri* parece induzir uma produção crescente e mais tardia de NO, com o pico em 24 horas pós-infecção, sendo neste período superior aos níveis induzidos pela EIEC.

Figura 11: Ensaio de determinação da produção de óxido nítrico (NO) das células Caco-2 após infecção com *S. flexneri* ou EIEC nos intervalos de 3, 6, 12 e 24 horas pós-infecção. As células epiteliais intestinais Caco-2 foram infectadas com *S. flexneri* M90T ou EIEC FBC124-13 e previamente incubadas por 2 horas em meio sem gentamicina (infecção). Após esse período, as células foram mantidas em meio contendo gentamicina, nos diferentes intervalos de 3, 6 e 24 horas (período pós-infecção), para avaliação da presença de nitrito nos sobrenadantes das culturas celulares pelo método de GRIESS. **($p < 0,01$), ***($p < 0,001$) em relação às células Caco-2 não infectadas para um mesmo intervalo de tempo analisado. ## ($p < 0,01$), ### ($p < 0,001$) entre as duas bactérias (*Shigella* e EIEC) para um mesmo intervalo de tempo analisado. Análise estatística realizada pelo teste Two Way ANOVA. Os dados representam a média de dois experimentos independentes.

5. DISCUSSÃO

A disenteria bacilar é caracterizada pela destruição do epitélio do cólon intestinal induzido pela resposta inflamatória após o reconhecimento bacteriano pelos receptores da imunidade inata (SANSONETTI, 2006b). Entre os microrganismos que causam essa síndrome, EIEC e *Shigella* foram descritos como importantes agentes etiológicos, acometendo cerca de 160 milhões de casos por ano (KOTTLOF *et al.*, 1999).

Recentemente, foi relatada a alta prevalência de EIEC em relação a *Shigella* isolada numa região no norte do Equador (VIEIRA *et al.*, 2007), no entanto essa bactéria tem sido pouco reportada como agente etiológico nas pesquisas sobre a diarreia. A justificativa é que as análises utilizadas nos estudos geralmente não conseguem distinguir entre os agentes EIEC e *Shigella*, devido à grande similaridade bioquímica e genética apresentada por essas bactérias (PARSOT, 2005). Consequentemente, os estudos ficaram praticamente restritos a amostras de *Shigella* e estudos que abordam EIEC e o hospedeiro são praticamente inexistentes.

Essa escassez de dados na literatura deixa sem resposta importantes questões sobre a resposta do hospedeiro na infecção por EIEC e, portanto, a proposta deste trabalho foi esclarecer alguns aspectos que podem explicar a menor patogenicidade da infecção por EIEC (doença mais branda), quando comparada a de *Shigella flexneri*.

Para o estudo da patogênese da disenteria bacilar, os modelos animais são precários. De fato, o modelo murino seria ideal para esclarecer os mecanismos da imunidade inata e adaptativa desenvolvidos durante a infecção por EIEC, contudo camundongos infectados não desenvolvem a doença caracterizada pela disenteria bacilar. A indução da inflamação no período inicial da infecção é crucial para o

estabelecimento do processo infeccioso (PERDOMO *et al.*, 1994a; PERDOMO *et al.*, 1994b). A hipótese para explicar a ausência da infecção em modelo murino é que os camundongos são carentes em algumas etapas da sinalização na inflamação aguda, como o reconhecimento dessas bactérias pelo sistema imune inato e/ou a falta de alguns mediadores inflamatórios essenciais para o curso da doença (PHALIPON & SANSONETTI, 2007).

Com isso, os estudos *in vitro* são amplamente utilizados, como culturas de macrófagos, células dendríticas e células epiteliais intestinais. Os estudos com linhagens celulares vêm sendo bastante úteis na avaliação da relação entre o patógeno e o hospedeiro. No entanto, apresentam limitações, porque a interação entre o patógeno e o hospedeiro ocorre sem a influência do microambiente. A presente pesquisa, juntamente com os trabalhos recentes desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa (ALBUQUERQUE, 2005; AMHAZ, 2007; MORENO, 2008) pode explicar essa diferença de patogenicidade entre EIEC e *Shigella*.

Para o presente trabalho, um modelo experimental, que se assemelhasse ao microambiente intestinal do hospedeiro, foi escolhido. Para tanto, células epiteliais intestinais humanas da linhagem Caco-2 foram utilizadas. Diversos parâmetros da resposta destas células foram estudados após a invasão e disseminação bacteriana, a saber: morte celular, envolvimento de receptores que atuam no reconhecimento bacteriano, transcrição e secreção de mediadores pró-inflamatórios, bem como a expressão de molécula de adesão ICAM-1 e produção de óxido nítrico.

Uma das principais características da patogênese das infecções por EIEC e *Shigella* é a capacidade de induzir sua própria fagocitose pelas células do epitélio intestinal (COSSART & SANSONETTI, 2004). A capacidade invasora das cepas bacterianas foi avaliada pela determinação do número de bactérias viáveis

intracelulares após contato das células Caco-2 com EIEC e *S. flexneri*. A capacidade inicial de EIEC e *Shigella* invadirem as células Caco-2 é semelhante, uma vez que nas duas primeiras horas de infecção o número de UFC de *Shigella* e EIEC foi praticamente o mesmo (**Figura 3**). Entretanto, quando avaliamos períodos mais longos de infecção, observamos claramente uma tendência da *Shigella* de escapar mais rapidamente da célula e assim a reinfecção das células epiteliais Caco-2 por *S. flexneri* é mais eficiente do que por EIEC (dados não mostrados).

Recentemente, Amhaz (2007) avaliou a capacidade de invasão de EIEC e *Shigella* em macrófagos murinos. Um número significativamente maior de EIEC no interior dos macrófagos em relação a *Shigella* foi observado. Além disso, *Shigella* também apresentou maior capacidade de escape dos macrófagos, uma vez que essa bactéria foi recuperada em maior concentração no sobrenadante da cultura dos macrófagos infectados, quando comparada a EIEC (AMHAZ, 2007). Esses dados corroboram os nossos resultados, pois relata que *Shigella* possui maior probabilidade de reinfecção, devido à sua maior concentração no sobrenadante da cultura após escape da célula hospedeira.

Uma vez dentro da célula epitelial intestinal, a bactéria escapa do vacúolo e ganha acesso ao citoplasma, onde ocorre sua proliferação. O movimento bacteriano leva à formação de protusões, que penetram nas células adjacentes. O ciclo da infecção é então completado pela lise da dupla membrana, a fim de liberar a bactéria no citoplasma da célula adjacente (disseminação) (COSSART & SANSONETTI, 2004). Para se determinar o número de bactérias viáveis no interior das células e a posterior resposta inflamatória do hospedeiro durante o processo de disseminação bacteriana, escolhemos o tempo de 2 horas de infecção (período denominado infecção) que antecedeu todos ensaios posteriores. Tal cuidado foi tomado com o

objetivo de se excluir quaisquer dúvidas sobre a concentração bacteriana no interior das células Caco-2 durante o curso da disseminação, ou seja, no início dos ensaios as duas bactérias estavam presentes na mesma concentração e, dessa forma, inferimos que os estudos comparativos estavam normalizados.

Os dados obtidos no ensaio de disseminação bacteriana mostraram que até 3 horas de infecção não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre a concentração intracelular das duas espécies bacterianas. Contudo, a partir do intervalo de 4 horas, *Shigella* foi encontrada em maior número no interior das células Caco-2, quando comparado a EIEC. Mais uma vez, os resultados nos sugerem que, após longos períodos de infecção, *Shigella* apresenta a capacidade de potencializar a sua invasão e disseminação, ao passo que EIEC permanece mais localizada no sítio de infecção ou ainda no fagossomo das células Caco-2. Ainda no curso da disseminação bacteriana, no maior intervalo avaliado foi observado uma queda significativa no número das duas cepas bacterianas e esse fenômeno foi mais evidente na infecção por *Shigella*, o que sugere uma maior capacidade da *Shigella* em causar morte das células Caco-2 (**Figura 4**).

Essa maior capacidade de causar danos às células Caco-2 também foi evidenciada no ensaio de formação de placas de lise, confirmando a menor capacidade de EIEC em induzir morte celular quando comparada com *Shigella*, sendo os danos dependentes do tempo, ou seja, quanto maior tempo de infecção, maior o dano causado nas células, evidenciando o maior potencial inflamatório na infecção por *Shigella* (**Figura 6**). O estudo da morte das células Caco-2 no curso da disseminação bacteriana confirmou que a EIEC induz menores danos às células Caco-2 do que *Shigella*. A morte das células Caco-2, por apoptose induzido por *Shigella*, foi claramente superior durante o curso da disseminação, quando

comparada com a EIEC. Além disso, os danos celulares induzidos pelas duas bactérias mostraram-se dependentes do tempo de infecção. Não foram observadas diferenças entre as duas bactérias em relação à morte induzida por necrose, sendo o perfil de danos celulares também dependente do tempo de infecção (**Figura 5**). Já foi demonstrado que a *Shigella* é capaz de induzir a morte de macrófagos tanto por apoptose como por necrose (NONAKA *et al.*, 2003).

O trato gastrointestinal apresenta uma gama de funções que podem estar relacionadas à nutrição, ao transporte de água e eletrólitos, e à produção hormonal. Isso ocorre num complexo microambiente onde as células epiteliais intestinais são constantemente expostas às bactérias comensais, portanto essa barreira celular apresenta aspectos físicos, funcionais e imunológicos (MADARA *et al.*, 1990).

A co-evolução do homem e da microbiota intestinal tem levado o sistema imunológico a uma situação de tolerância e os mecanismos pelos quais isso ocorre têm ganhado destaque na literatura e recentemente avaliado em termos moleculares e celulares (MACDONALD & MONTELEONE, 2005). Os receptores da imunidade inata e sua regulação têm papel central nesse balanço homeostático, marcado pela situação controlada de inflamação. Particularmente, a bactéria patogênica, se difere da comensal pela habilidade de colonizar a superfície da mucosa epitelial e/ou invadir as células do hospedeiro para iniciar a resposta inflamatória com destruição da barreira intestinal (**Figura 12**) (SANSONETTI, 2006b).

Figura 12: Representação esquemática da interação das células epiteliais intestinais com bactérias comensais e patogênicas (SANSONETTI, 2006).

No intuito de avaliar os receptores da imunidade inata e sua regulação após a infecção por EIEC e *Shigella*, decidimos avaliar o papel dos receptores TLR e NLR envolvidos no reconhecimento dessas duas bactérias. O estudo dos receptores da imunidade inata presente nas células Caco-2, envolvidos no reconhecimento bacteriano, não revelou um aumento na síntese do RNA mensageiro dos receptores TLR2 e TLR4 após 3 e 6 horas pós-infecção com EIEC e *Shigella*, em relação ao nível basal (células não-infectadas) (Figura 7 e 9). Esses receptores são responsáveis pelo reconhecimento de bactérias extracelulares através de componentes presentes na parede celular como lipoproteínas, peptideoglicanos ou ácidos lipoteicóicos (ligantes do TLR2) e LPS (ligante do TLR4) (BEUTLER, 2004). Para resposta ao LPS, além da expressão do TLR4, precisa-se também da ligação com a molécula MD-2 (SHIMAZU et al., 1999) e o co-receptor CD14 (ULEVITH & TOBIAS, 1999).

As análises dos níveis de expressão dos diferentes TLR pelas células epiteliais intestinais têm sido bastante controversas, assim como a sua distribuição e localização exata nas células do cólon humano (FURRIE *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a expressão do receptor TLR5 nas células epiteliais intestinais é localizado apenas na membrana basolateral (GEWIRTZ *et al.*, 2001), o que resulta na ausência da estimulação por bactérias comensais que expressam a flagelina. A expressão do TLR2, CD14 e TLR4 parece ausente ou atenuada pelas células epiteliais intestinais, mostrando uma irresponsividade via TLR (CARIO *et al.*, 2000; ABREU *et al.*, 2001; MELMED *et al.*, 2003). Outros estudos também mostraram que a sinalização via TLR pare ser regulada negativamente (OTTE *et al.*, 2004; ABREU *et al.*, 2005)

Esses dados podem justificar a irresponsividade de células epiteliais intestinais às bactérias comensais presentes na microbiota intestinal, sugerindo o papel essencial dos receptores intracelulares na resposta na mucosa intestinal.

Nesse contexto, recentemente os receptores Nod1 e Nod2 foram descritos como proteínas intracelulares responsáveis pelo reconhecimento bacteriano e ativação dos genes pró-inflamatórios pelo reconhecimento de bactérias intracelulares (STROBER *et al.*, 2006). Já que esses receptores têm mostrado um importante papel no reconhecimento de bactérias intracelulares e sabendo-se que os receptores extracelulares parecem ser irresponsivos a essas bactérias, decidimos avaliar o papel desses receptores na resposta a EIEC e *Shigella* em células epiteliais Caco-2.

Foi demonstrado que em células epiteliais intestinais as expressões dos genes Nod1 e Nod2 são moduladas positivamente por citocinas pró-inflamatórias, mas isso ocorre por vias diferentes. No caso de Nod1, essa modulação positiva é

exercida por IFN- γ (HISAMATSU *et al.*, 2003), enquanto o Nod2 é regulado positivamente pela citocina TNF- α , mas esse efeito positivo pode ser amplificado por IFN- γ (ROSENSTIEL *et al.*, 2003). Nossos resultados mostraram que durante a infecção das células Caco-2 por EIEC ocorreu uma maior síntese de *nod1* em relação a *Shigella*, embora ambas tivessem aumentado a sua síntese em relação ao tempo de infecção. Em relação à proteína citoplasmática Nod2, nossos resultados mostraram que a síntese desse gene é bem menor do que o Nod1, sugerindo que o Nod1 é o principal meio de ativação dos genes pró-inflamatórios durante a infecção por EIEC e *Shigella* (Figura 8).

Corroborando nossos resultados, recentemente foi demonstrado, por PCR em tempo real, que nas células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2 a expressão do gene *nod2* é 20 vezes menor que *nod1*. Ainda demonstraram que a síntese de *nod2* não foi modulada de maneira positiva após estímulo das células Caco-2 com LPS, mas aumentou quando infectadas com EIEC, embora esses níveis de *nod2* fossem constantemente menores que os níveis expressos de *nod1* (KIM *et al.*, 2004). Além disso, a microinjeção de sobrenadantes de *Shigella flexneri* (o qual contém o ligante para Nod1) em células epiteliais intestinais ativa a translocação da subunidade p65 do fator de transcrição NF- κ B para o núcleo das células intestinais dos camundongos selvagens. Contudo, esse fenômeno não é observado em células de camundongos Nod1-deficiente. A ativação do Nod1 por *Shigella flexneri* induz a transcrição do fator NF- κ B e c-JUN kinase, que estimula a produção de citocinas, quimiocinas, enzimas e outras proteínas envolvidas em funções antimicrobianas pelas células epiteliais intestinais, cruciais para erradicação do patógeno (GIRARDIN *et al.*, 2001). Corroborando esses dados, nossos resultados mostraram que as duas

bactérias modularam de maneira positiva a síntese de RNA mensageiro do NF- κ B e c-JUN kinase (**Figura 9**).

Esses dados da literatura, juntamente com nossos resultados, sugerem que o receptor Nod2 não seja importante na ativação de NF- κ B, e assim na resposta inflamatória das células epiteliais intestinais infectadas pelas duas espécies bacterianas. Em contrapartida, sugerem o essencial papel do Nod1 no reconhecimento dessas bactérias e a posterior resposta inflamatória das células epiteliais intestinais humanas infectadas.

Estudos *in vitro* têm demonstrado o envolvimento do receptor Nod1 na infecção por outros patógenos além da *Shigella* e EIEC, como *Chlamydomphila pneumoniae* (OPITZ *et al.*, 2005), *Campylobacter jejuni* (ZILBAUER *et al.*, 2007) e *Listeria monocytogenes* (HAZEGAWA *et al.*, 2006), enquanto o receptor Nod2 tem sido envolvido no reconhecimento intracelular de *Streptococcus pneumoniae* (OPITZ *et al.*, 2004) e *Mycobacterium tuberculosis* (FERWERDA *et al.*, 2005).

Na infecção por *Shigella*, a resposta inflamatória provoca rompimento da barreira epitelial intestinal, facilitando a invasão bacteriana nas áreas adjacentes ao ponto inicial da translocação (PHALIPON & SANSONETTI, 2007).

A citocina pró-inflamatória TNF- α tem papel fundamental no início da inflamação na infecção por *Shigella* (RAQIB *et al.*, 1995) e dentre suas funções, a citocina TNF- α se destaca como principal estímulo envolvido no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. Por esse motivo, investigamos a presença de TNF- α no sobrenadante de culturas de células Caco-2 infectadas com EIEC e *Shigella* e observamos um aumento na síntese de TNF- α após 24 horas de pós-infecção por EIEC e *Shigella*. Embora ambas as bactérias induzam de maneira

significativa secreção de TNF- α em relação ao nível basal das células Caco-2, não observamos diferenças significativas entre as duas bactérias (**Figura 10**).

As quimiocinas desempenham um grande número de atividades no recrutamento das diferentes populações de leucócitos para o local da inflamação e tem um papel importante no início da resposta inflamatória do hospedeiro e em sua manutenção (YANG *et al.*, 1997). As quimiocinas IL-8 e MCP-1 atuam, respectivamente, no recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. . A quimiocina IL-8 sintetizada pelas células epiteliais é responsável pela resposta inflamatória exacerbada e pela destruição tecidual. Ambas necessárias para se eliminar o microrganismo do sítio infectado (SANSONETTI *et al.*, 1999). A avaliação da expressão de moléculas de adesão e secreção de quimiocinas induzidas pelas diferentes bactérias torna-se interessante, uma vez que essas moléculas estão envolvidas com a condução da resposta inflamatória, o que é crucial para o estabelecimento ou não da doença.

A infecção de células Caco-2 por *Shigella* ou EIEC induziu um aumento significativo na secreção de IL-8 no sobrenadante das culturas celulares infectadas por ambas as bactérias em relação ao nível basal, nos intervalos de 6 e 24 horas pós-infecção. Diferente do que observamos para TNF- α , podemos notar uma maior secreção de IL-8 pelas células Caco-2 infectadas com *Shigella* do que com EIEC no maior intervalo de tempo analisado (24 horas pós-infecção) (**Figura 10**). A presença de IL-8 durante a infecção certamente está relacionada com o papel essencial desempenhado pelos neutrófilos durante a infecção primária, já que inibe o escape bacteriano do vacúolo fagocítico, fato que resulta na morte do microrganismo por enzimas, peptídeos antimicrobianos e grânulos neutrofílicos (PERDOMO *et al.*, 1994b; WEINRAUCH *et al.*, 2002).

Outro aspecto bastante interessante foi o aumento da expressão do RNA mensageiro para molécula de adesão ICAM-1 pelas células Caco-2 infectadas por EIEC ou *Shigella*, em relação às células não-infectadas no tempo de 3 horas pós-infecção (**Figura 9**). A expressão de ICAM-1 proporciona a interação direta dos leucócitos com as células epiteliais do hospedeiro, favorecendo o influxo dessas células para o local da infecção (KAISERLIAN et al., 1991; HUANG et al., 1996). Não foram observadas diferenças estatísticas na síntese de RNA mensageiro, assim como na produção de MCP-1 em relação ao nível basal (**Figura 8 e 10**). Também não observamos a produção de RNA mensageiro para as quimiocinas eotaxina, RANTES, MCP-4, MIP-1 β , MCP-2, MIP-1 α , MCP-3, I-309 pelas células Caco-2 infectadas pelas duas bactérias em 3 horas pós-infecção (**Figura 8**).

Esse e outros fatos relacionados à resposta celular podem ser justificados pela ausência de estímulos que atuassem nas células epiteliais intestinais Caco-2, como por exemplo, a citocina IL-1 (ECKMANN et al., 1993) secretada pelos leucócitos no local da infecção. Na infecção por *Shigella*, o papel da IL-1 no processo de migração celular relacionado à ruptura da barreira intestinal está bem estabelecido (SANSONETTI et al., 2000). A IL-1, juntamente com a IL-8 atua na migração inicial de células do sistema imune inato para o local da infecção e isso causa uma desestabilização do epitélio intestinal, favorecendo a infecção bacteriana, pois permite a passagem de um maior número de bactérias que irão invadir as células do epitélio, levando a destruição tecidual (SANSONETTI, 2001).

A produção de IL-1, além de estimular o recrutamento de leucócitos, também induz a produção de outras citocinas. YANG e colaboradores mostraram que o estímulo apenas com IL-1 induziu as células Caco-2 a secretarem níveis maiores de quimiocinas pró-inflamatórias, quando comparadas com a infecção *Salmonella*

(YANG et al., 1997). E, ainda, em um processo infeccioso, a produção de citocinas e quimiocinas é regulada por múltiplos fatores, além da presença do patógeno.

O estudo da morte de células epiteliais intestinais infectadas com *Salmonella* ou EIEC demonstraram que as características morfológicas e bioquímicas da apoptose podem ser observadas no curso da infecção (KIM et al., 1998). De início, atribuiu-se à caspase-1 um papel primordial na apoptose, mas estudos mostraram que na sua ausência diferentes cascatas são ativadas na apoptose. Ao ser ativada, a caspase iniciadora cliva outras, em seqüência, até gerar uma caspase executora (como caspase-3 e caspase-7) que destrói proteínas essenciais à célula, ativa proteínas tóxicas ou destrói proteínas que protegem a célula da apoptose; todos esses casos levam à morte celular (ABASTADO, 1996; COHEN, 1999).

Neste presente trabalho, não observamos diferenças de RNA mensageiro para as caspases entre o nível basal mostrado por células não infectadas e as células infectadas com as bactérias 3 horas de pós-infecção. Apesar de não haver diferença entre a presença de RNAm para caspase nas células infectadas com EIEC ou *Shigella*, nossos dados mostraram que a *Shigella* induz mais apoptose que a EIEC. Isso sugere que as bactérias podem iniciar o processo de morte induzida nas células epiteliais intestinais Caco-2 por outras vias de ativação além daquelas dependentes de caspase (**Figura 9**). Outras vias podem influenciar e/ou induzir a apoptose nas células epiteliais intestinais, como a estimulação por citocinas (TNF- α) (ABREU-MARTIN et al., 1995), a produção de óxido nítrico (KIM et al., 1998) ou pela ligação do receptor Fas (CD95/Apo-1), presente na superfície celular com seu ligante FasL (YONEHARA et al., 1989; ABREU-MARTIN et al., 1995).

Para avaliar os mecanismos microbicidas envolvidos no controle da infecção por EIEC e *Shigella* em células Caco-2, nós avaliamos a produção de NO por essas

células e nós observamos uma diferença significativa na produção de óxido nítrico produzido por células epiteliais intestinais Caco-2 infectadas por EIEC, comparando-a com as células infectadas por *Shigella*. Nossos resultados demonstraram que ocorre uma produção precoce de NO pelas células Caco-2 em resposta à infecção por EIEC (6 horas pós-infecção), o que não foi observado na infecção com *Shigella* (**Figura 11**). WITTHOFT e colaboradores (1998) demonstraram que o pico do nível de RNA mensageiro, produzido pelas células Caco-2 para proteína iNOS, ocorre em 8 horas após infecção por EIEC e, além disso, foi observado uma decrescente síntese dessa molécula nos tempos posteriores 12 e 24 horas de infecção (WITTHOFT et al., 1998).

Um estudo recente em células mesoteliais mostrou que a estimulação de Nod1 com seu ligante específico (iE-DAP) induziu a expressão de *iNOS* com conseqüente produção de NO (PARK *et al.*, 2007b). Com isso, nossos resultados sugerem que a alta produção de NO pelas células Caco-2, quando infectadas por EIEC (**Figura 11**), pode estar relacionada com o maior reconhecimento bacteriano via Nod1, uma vez que houve um maior nível de Nod1 e uma maior produção de NO em células Caco-2 infectadas com EIEC do que com *Shigella* (**Figura 7**). A maior produção de NO pelas células infectadas por EIEC, quando comparada com as células infectadas com *Shigella*, está claramente relacionada ao efeito microbicida dessa molécula, evidenciado pelo controle significativo da EIEC durante o curso da disseminação (**Figura 4 e 6**). Apesar da infecção por *Shigella* induzir uma significativa produção de NO, parece que essa molécula não está diretamente relacionada com a eliminação bacteriana e nesse sentido WAY e colaboradores (1998) observaram que após desafio intranasal com *Shigella flexneri* houve um aumento na produção de NO, porém não houve diferenças na letalidade entre os

animais selvagens e iNOS deficiente (WAY & GOLDBERG, 1998). Em ensaios *in vivo*, realizados em nosso laboratório, utilizando camundongos iNOS^{-/-}, o NO pareceu ter um papel importante no controle da infecção por EIEC, embora a eliminação de *Shigella* pareça ocorrer independentemente desta via (AMHAZ, 2007).

Além do efeito microbicida, em altas concentrações, o NO acaba por causar danos também às células hospedeiras. Após a invasão bacteriana, células epiteliais intestinais mostram um aumento na produção de NO, o que resulta em diminuição de resistência transepitelial, ou seja, perda da função de barreira celular (RESTA-LENERT & BARRET et al., 2002). O microambiente criado durante a inflamação é importante na contenção da infecção, porém, além de tóxico para microrganismos, o NO é também tóxico para os tecidos do hospedeiro. Dessa maneira, esse processo precisa ser regulado para evitar maiores danos às células. Em altas concentrações, NO pode inibir praticamente todas as células do sistema imune através de apoptose, diminuição de fatores de transcrição, citocinas, proteínas quinases, expressão de moléculas de superfície e migração de células ao tecido inflamado devido à inibição de moléculas de adesão do endotélio (BOGDAN, 2001). Portanto, com essa gama de ações, não é surpreendente que o NO, além de importante para morte de patógenos intracelulares, seja um poderoso agente imunossupressor e anti-inflamatório.

O aumento na produção de NO após infecção por *Salmonella* foi relacionado com a apoptose de células epiteliais intestinais infectadas. Esse fato foi confirmado através da inibição da síntese de NO, o que levou a uma diminuição significativa na indução de apoptose de células HT-29 (KIM et al., 1998). Não observamos essa relação com a alta produção de NO induzida por EIEC com a apoptose das células Caco-2. Isso sugere que esses altos níveis secretados de NO no início da infecção

funcionem como um efeito microbicida importante no controle da infecção e não atuem como citotóxicas para as células Caco-2 (**Figura 5**).

Em ensaios *in vivo* realizados em nosso laboratório, observamos uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção por *Shigella*, enquanto EIEC estimulou uma maior produção da citocina IL-10. (AMHAZ, 2007). Também foi observado a secreção de IL-10 por células dendríticas intestinais infectadas com EIEC, e esse perfil não foi observado na infecção por *Shigella* (MORENO 2008). A produção de IL-10 tem efeito anti-inflamatório e provavelmente representa uma tentativa das células do hospedeiro em evitar uma resposta imune descontrolada (DEMUTH *et al.*, 1996) que poderá favorecer a colonização do patógeno.

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

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente modelo experimental demonstram que ambas as cepas bacterianas apresentam uma semelhante capacidade de invasão em células Caco-2. Contudo, a EIEC apresenta uma menor capacidade de disseminação em relação a *Shigella*, assim como uma menor indução de morte das células Caco-2. EIEC parece ser mais reconhecida pelo sistema imune inato, e assim a resposta inflamatória direcionada por EIEC parece favorecer o hospedeiro como a produção de NO (resposta protetora), enquanto a *Shigella* demonstra ser mais patogênica, escapando de uma resposta inflamatória inicial que seria gerada pelas células epiteliais intestinais Caco-2. Esses fatos favorecem o estabelecimento de uma doença mais grave por *Shigella* em relação à doença desencadeada por EIEC.

Tais dados, em conjunto com os dados obtidos recentemente pelo nosso grupo de pesquisa, nos levam a especular que o hospedeiro é mais responsivo à infecção por EIEC quando comparada à *Shigella* e isso explica a forma mais branda da doença desencadeada pela EIEC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASTADO, J.P. Apoptosis: function and regulation of cell death. *Res. Immunol.*, 147:443-56, 1996.

ABREU, M.T., VORA, P., FAURE, E., THOMAS, L.S., ARNOLD, E.T., ARDITI, M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, 167(3):1609-16, 2001.

ABREU-MARTIN, M.T., VIDRICH, A., LYNCH, D.H., TARGAN, S.R. Divergent induction of apoptosis and IL-8 secretion in HT-29 cells in response to TNF-alpha and ligation of Fas antigen. *J. Immunol.*, 155:4147-54, 1995.

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

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

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

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

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

BERG, R.D. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol.*, 4:430-5, 1996.

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

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

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

BONECA, I.G. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 8:46-53, 2005.

BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D.S., WEINRAUCH, Y., ZYCHLINSKI, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303:1532-1535, 2004.

CARIO, E., ROSENBERG, I.M., BRANDWEIN, S.L., BECK, P.L., REINECKER, H.C., PODOLSKY, D.K. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J. Immunol.*, 164(2):966-72, 2000.

CHEDID, L. Muramyl peptides as possible endogenous immunopharmacological mediators. *Microbiol. Immunol.*, 27:723-32. 1983.

CHIN, A.I., DEMPSEY, P.W., BRUHN, K., MILLER, J.F., XU, Y., CHENG, G. Involvement of receptor-interacting protein 2 in innate and adaptive immune responses. *Nature*, 416(6877):190-4, 2002.

COHEN, J.J. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 103:548-54, 1999.

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

DEMUTH, A., GOEBEL, W., BEUSCHER, H.U., KUHN, M. Differential Regulation of cytokine and cytokine receptor mRNA expression upon infection of bone marrow-derived macrophages with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 64: 3475-3483, 1996.

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

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

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

ELEWAUT, D., DIDONATO, J.A., KIM, J.M., TRUONG, F., ECKMANN, L., KAGNOFF, M.F. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J. Immunol.*, 3:1457-66, 1999.

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

FERWERDA, G., GIRARDIN, S.E., KULLBERG, B.J., LE BOURHIS, L., DE JONG, D.J., LANGENBERG, D.M., VAN CREVEL, R., ADEMA, G.J., OTTENHOFF, T.H., VAN DER MEER, J.W., NETEA, M.G. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS PathogNov.*, 1:279-85,

FILHO, R.F.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 46(3):265-71, 2000.

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

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

FURRIE, E., MACFARLANE, S., THOMSON, G., MACFARLANE, G.T. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, 115:565-74, 2005.

GAILLARD, J.L., BERCHE, P., MOUNIER, J., RICHARD, S., SANSONETTI, P. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.*, 55:2822-9, 1987.

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

GEWIRTZ, A.T., NAVAS, T.A., LYONS, S., GODOWSKI, P.J., MADARA, J.L. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J. Immunol.*, 167:1882-5, 2001.

GIRARDIN, S.E., TOURNEBIZE, R., MAVRIS, M., PAGE, A.L., LI, X., STARK, G.R., BERTIN, J., DISTEFANO, P.S., YANIV, M., SANSONETTI, P.J., PHILPOTT, D.J.

CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO*, 8:736-42, 2001.

GIRARDIN, S.E., BONECA, I.G., CARNEIRO, L.A., ANTIGNAC, A., JEHANNO, M., VIALA, J., TEDIN, K., TAHA, M.K., LABIGNE, A., ZÄHRINGER, U., COYLE, A.J., DISTEFANO, P.S., BERTIN, J., SANSONETTI, P.J., PHILPOTT, D.J. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 300:1584-7, 2003a.

GIRARDIN SE, BONECA IG, VIALA J, CHAMAILLARD M, LABIGNE A, THOMAS G, PHILPOTT DJ, SANSONETTI PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, 278(11):8869-72, 2003b.

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

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

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

HARRIS, G., KUOLEE, R., CHEN, W. Role of Toll-like receptors in health and diseases of gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.*, 14:2149-60, 2006.

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

HISAMATSU, T., SUZUKI, M., PODOLSKY, D.K. Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 278(35):32962-8, 2003.

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

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

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

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

KAISERLIAN, D., RIGAL, D., ABELLO, J., REVILLARD, J.P. Expression, function and regulation of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human intestinal epithelial cell lines. *Eur. J. Immunol.*, 21(10):2415-21, 1991.

KIM, J.M.; ECKMANN, L.; SAVIDGE, T.C.; LOWE, D.C.; WITTHOFT, T.; KAGNOFF, M.F. Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J. Clin. Invest.*, 102(10):1815-23, 1998.

KIM, J.G., LEE, S.J., KAGNOFF, M.F. Nod1 is an essential signal transducer in intestinal epithelial cells infected with bacteria that avoid recognition by toll-like receptors. *Infect. Immun.*, 72(3):1487-95, 2004.

KOBAYASHI, K., INOHARA, N., HERNANDEZ, L.D., GALÁN, J.E., NÚÑEZ, G., JANEWAY, C.A., MEDZHITOV, R., FLAVELL, R.A. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*, 416(6877):194-9, 2002.

KOTLOFF, K.L., WINICKOFF, J.P., IVANOFF, B., CLEMENS, J.D., SWERDLOW, D.L., SANSONETTI, P.J., ADAK, G.K., LEVINE, M.M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. *Bull World Health Organization*, 77:651-666, 1999.

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

LOTZ, M., GÜTLE, D., WALTHER, S., MÉNARD, S., BOGDAN, C., HORNEF, M.W. Postnatal acquisition of endotoxin tolerance in intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.*, 4:973-84, 2006.

MADARA, J.L., NASH, S., MOORE, R., ATISOOK, K. Structure and function of the intestinal epithelial barrier in health and disease. *Monogr. Pathol.*, 31:306-24, 1990.

MACDONALD, T.T., MONTELEONE, G. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science*, 25;307(5717):1920-5, 2005.

MAGALHAES, J.G., TATTOLI, I., GIRARDIN, S.E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin. Immunol.*, 19(2):106-15, 2007.

MARTINO, M.C., ROSSI, G., MARTINI, I., TATTOLI, I., CHIAVOLINI, D., PHALLIPON, A., SANSONETTI, P.J., BERNARDINI, M.L. Mucosal lymphoid infiltrate dominates colonic pathological changes in murine experimental shigellosis. *J. Inf. Dis.*, 192:136-148, 2005.

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

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

MAVRIS, M., SANSONETTI, P. Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 18(2):373-86, 2004.

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

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

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune Recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173:89-97, 2000.

MELMED, G., THOMAS, L.S., LEE, N., TESFAY, S.Y., LUKASEK, K., MICHELSEN, K.S., ZHOU, Y., HU, B., ARDITI, M., ABREU, M.T. Human intestinal epithelial cells are broadly unresponsive to Toll-like receptor 2-dependent bacterial ligands: implications for host-microbial interactions in the gut. *J. Immunol.*, 170:1406-15, 2003.

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

MORENO, A.C.R. Diferença da patogenicidade entre EIEC e *Shigella flexneri* em modelo experimental de infecção intestinal. São Paulo, 2008. 116p. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

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

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

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

OAKS, E.V., WINGFIELD, M.E., FORMAL, S.B. Plaque formation by virulent *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.*, 48(1):124-9, 1985.

Ottaway JH, Apps DK. Estrutura e Metabolismo de Glicídios. In: BIOQUÍMICA. 4a ed. Guanabara-Koogan 1984; 6:70-71.

OPITZ, B., PÜSCHEL, A., SCHMECK, B., HOCKE, A.C., ROSSEAU, S., HAMMERSCHMIDT, S., SCHUMANN, R.R., SUTTORP, N., HIPPENSTIEL, S. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.*, 279(35):36426-32, 2004.

OPITZ, B., FÖRSTER, S., HOCKE, A.C., MAASS, M., SCHMECK, B., HIPPENSTIEL, S., SUTTORP, N., KRÜLL, M. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydia pneumoniae*. *Circ. Res.*, 96(3):319-26, 2005.

PARK, J.H., KIM, Y.G., MCDONALD, C., KANNEGANTI, T.D., HASEGAWA, M., BODY-MALAPEL, M., INOHARA, N., NÚÑEZ, G. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J. Immunol.*, 178(4):2380-6, 2007.

PARK, J.H., KIM, Y.G., SHAW, M., KANNEGANTI, T.D., FUJIMOTO, Y., FUKASE, K., INOHARA, N., NÚÑEZ, G. Nod1/RICK and TLR signaling regulate chemokine and antimicrobial innate immune responses in mesothelial cells. *J. Immunol.*, 179(1):514-21, 2007

PARSOT, C., SANSONETTI, P.J. Invasion and pathogenesis of *Shigella* infections. In: Miller, V.L. Bacterial invasiveness. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* Springer, New York, 25-42, 1995.

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

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

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

PÉDRON, T.; THIBAUT, C.; SANSONETTI, P.J. The invasive phenotype of *Shigella flexneri* directs a distinct gene expression pattern in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J. Biol. Chem.*, 278:33876-86, 2003.

PERDOMO, O.J., CAVAILLON, J.M., HUERRE, M., OHAYON, H., GOUNON, P., SANSONETTI, P.J. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. *J. Exp. Med.*, 180(4):1307-19, 1994a.

PERDOMO, J.J., GOUNON, P., SANSONETTI, P.J. Polymorphonuclear leukocyte transmigration promotes invasion of colonic epithelial monolayer by *Shigella flexneri*. *J. Clin. Invest.*, 93(2):633-43, 1994b.

PHALIPON, A., SANSONETTI, P.J. Shigellosis: innate mechanisms of inflammatory destruction of the intestinal epithelium, adaptive immune response, and vaccine development. *Crit. Rev. Immunol.*, 23:371-401, 2003.

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

PHILPOTT, D.J., YAMAOKA, S., ISRAËL, A., SANSONETTI, P.J. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J. Immunol.*, 165:903-14, 2000.

PHILPOTT DJ, GIRARDIN SE. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.*, 41:1099-108, 2004

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

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

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

ROSENSTIEL, P., FANTINI, M., BRÄUTIGAM, K., KÜHBACHER, T., WAETZIG, G.H., SEEGER, D., SCHREIBER, S. TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 124(4):1001-9, 2003.

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

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

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

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

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

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

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

SCHINDLER, H., BOGDAN, C. NO as a signaling molecule: effects on kinases. *Int. Immunopharmacol.*, 8:1443-55, 2001.

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

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

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

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

SHIMAZU R, AKASHI S, OGATA H, NAGAI Y, FUKUDOME K, MIYAKE K, KIMOTO M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.*, 189(11):1777-82, 1999.

STROBER, W., MURRAY, P.J., KITANI, A., WATANABE, T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat. Rev. Immunol.*, 6:9-20, 2006.

SUZUKI, T., FUJIKURA, K., HIGASHIYAMA, T., TAKATA, K., DNA staining for fluorescence and laser confocal microscopy. *Journal of Histochemistry and Citochemistry*, 45: 9-53, 1992.

TRABULSI, L.R., ZULIANI, M.E., SERRANO, J.A. On two new enterobacteria pathogenic to the guinea-pig eye (cultures 185T-64 and 193T-64). *Rev. Inst. Med. Trop.*, 7:241-6, 1965.

ULEVITCH RJ, TOBIAS PS. Recognition of gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. *Curr. Opin. Immunol.*, 11(1):19-22, 1999.

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

WAY, S.S., GOLDBERG, M.B. Clearance of *Shigella flexneri* infection occurs through a nitric oxide-independent mechanism. *Infect. Immun.*, 66:3012-6, 1998.

WEINRAUCH, Y., DRUJAN, D., SHAPIRO, S.D., WEISS, J., ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature*, 417:91-4, 2002.

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

YANG, S., ECKMANN, L., PANJA, A., KAGNOFF, M.F. Differential and regulated expression of C-X-C, C-C and C-chemokines by human colon epithelial cells. *Gastroenterology*, 113:1214-1223, 1997.

YONEHARA, S., ISHII, A., YONEHARA, M. A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.*, 169(5):1747-56, 1989.

ZILBAUER, M., DORRELL, N., ELMI, A., LINDLEY, K.J., SCHÜLLER, S., JONES, H.E., KLEIN, N.J., NÚÑEZ, G., WREN, B.W., BAJAJ-ELLIOTT, M. A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune responses to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol.*, 9(10): 2404-16, 2007.

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

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