UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Perfil de citocinas produzidas por macrófagos na presença de intimina e bundlina (BfpA) de *Escherichia coli* enteropatogênica

Daniela Bastos Mourão

Dissertação para obtenção de grau de
MESTRE

Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2011

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

Mourão, Daniela Bastos
M929p Perfil de citocinas produzidas por macrófagos na presença de intimina e bundlina (BfpA) de *Escherichia coli* enteropatogênica / Daniela Bastos Mourão. -- São Paulo, 2011.
116p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Piazza, Roxane Maria Fontes
Co-orientador: Borges, Monamaris Marques

1. Macrófago : Fagocitose : Imunologia : Medicina 2. Escherichia coli : Bacteriologia I. T. II. Piazza, Roxane Maria Fontes, orientador. III. Borges, Monamaris Marques, co-orientador.

616.079 CDD

Daniela Bastos Mourão

Perfil de citocinas produzidas por macrófagos na presença de intimina e bundlina (BfpA) de *Escherichia coli* enteropatogênica

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof[a]. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

orientadora/presidente

_____

1°. examinador

_____

2°. examinador

03/02/12

São Paulo, ___ de _____ de ____.

A Deus, por ter me abençoado em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe Eliane, pelo amor incondicional, pelos valores adquiridos, por acreditar e me apoiar.

Aos meus queridos irmãos e amigos, Flávia e Ricardo, que sempre estiveram ao meu lado.

Aos meus avós, Francisco e Neida que com muito amor participaram da minha formação.

Ao meu querido Fabiano pelo amor, carinho, apoio, companheirismo, paciência e incentivo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, por ter me acolhido em seu laboratório e me orientado no mestrado.

À Dra. Monamaris Marques Borges, pela orientação, dedicação e por toda ajuda sem medir esforços.

À Dra. Patrícia Antônia Estima Abreu pela paciência, apoio, ensinamentos, pela amizade e carinho que ficam marcados em minha vida.

À Dra. Ângela Silva Barbosa e Dra. Denise Horton pela criatividade, sugestões e discussões imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Aos amigos Márcio e Rafael Nassar, pela amizade, companheirismo e cumplicidade nos momentos que mais precisei.

Às amigas Dani Luz e Cyntia pelo carinho, apoio, incentivo e ajuda nos experimentos.

Aos colegas de bancada Naty, Andressa, Cris Souza, Anderson, Letícia, Dani Munhoz e Caio, pela ótima convivência e pela amizade.

Às amigas Denise e Ludmila pelo carinho, amizade, paciência e imensa ajuda nos experimentos!!!

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia Fran, Fernanda, Renato, Demétria, Cláudia, Lígia, Lucas, Gabi, Afonso, Hebert e Cris Mota pela amizade e pelos bons momentos.

Aos demais colegas do Laboratório de Bacteriologia, pela colaboração e amizade.

Aos inúmeros amigos do Instituto Butantan, pela amizade e carinho.

Aos amigos e ex-colegas do Laboratório de Bacteriologia, Silvia, Sarita, Beth, Priscila, Diego e Fran pelo carinho e amizade.

Aos demais pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia, pelo apoio científico.

Aos funcionários do Laboratóro de Bacteriologia, pelo apoio técnico prestado durtante o mestrado.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo apoio e dedicação prestados.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos e sugestões durante o mestrado.

Aos membros da banca de qualificação pelas valiosas sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

"Uma pessoa, para compreender, tem de se transformar. "

Saint-Exupéry

RESUMO

MOURÃO, D.B. **Perfil de citocinas produzidas por macrófagos na presença de intimina e bundlina (BfpA) de *Escherichia coli* enteropatogênica.** 2011. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é um dos principais agentes etiológicos da diarreia infantil tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Esta bactéria possui dois fatores de virulência comprovadamente envolvidos na patogênese, intimina e *bundle-forming pilus* (BFP). Este patotipo está dividido em EPEC típica e EPEC atípica, ambos apresentam uma ilha de patogenicidade cromossomal denominada *locus of enterocyte effacement* (região LEE) onde está localizado o gene *eae* (*E. coli attachment effacement),* que codifica a intimina, uma proteína de membrana externa que medeia a adesão íntima da bactéria ao enterócito. Diferente da EPEC típica, as cepas de EPEC atípica não possuem o plasmídeo EAF (EPEC adherence factor) no qual encontra-se o operon *bfp* (*bundle forming pilus*) constituído por 14 genes incluindo *bfpA* o qual codifica a bundlina (BfpA), principal subunidade da fímbria Bfp, que possibilita a agregação bacteriana. Na infecção por EPEC ocorre grave disfunção da barreira epitelial, e uma das conseqüências é a inflamação. Na literatura, é bem descrito a interação entre as proteínas efetoras de EPEC com as células epiteliais e os processos iniciais da interação bactéria à célula hospedeira. Entretanto, poucos são os estudos que analisam a produção de citocinas em infecções por EPEC ou suas moléculas efetoras com relação a ativação de macrófagos, fundamentais para o controle do processo inflamatório e geração da resposta imune durante esta infecção. A análise das citocinas produzidas constitui uma parte importante da resposta imune e representa a tentativa do hospedeiro em lidar com um determinado microrganismo. Em função disto analisou-se o papel da intimina e do BfpA na capacidade de ativar a resposta inata mediada por macrófagos *in vitro*, onde avaliou-se a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-12), citocina antiinflamatória (IL-10) e quimiocina (MCP-1). Os resultados demonstraram que as proteínas recombinantes intimina e BfpA são potentes ativadores de macrófagos, de forma dose dependente, produzindo TNF-α, IL-12 e IL-6, IL-10 e MCP-1, mas não IL-1β. Neste estudo não foi observado efeito sinérgico na produção de citocinas pró-inflamatórias ao associar intimina e BfpA, entretanto em dose mais elevada potenciou a produção de IL-10, um mediador antiinflamatório. O efeito imune obtido foi atribuído majoritariamente a estas proteínas uma vez que o tratamento destas com polimixina B não alterou a produção de TNF-α. Conclui-se que intimina e BfpA são potentes ativadores de macrófagos durante a resposta inata podendo colaborar para o controle do processo inflamatório durante a infecção por EPEC.

Palavras-chave: EPEC. Intimina. BfpA. Macrófagos. Citocinas.

ABSTRACT

MOURÃO, D.B. **Profile of cytokines produced by macrophages in the presence of intimin and bundlin (BfpA) of enteropathogenic *Escherichia coli.*** 2011. Dissertation (Master's Degree) – School of Pharmaceutical Science, Universidade de São Paulo, 2011.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a common cause of childhood diarrhea in developed countries as well as developing countries. This bacterium has two proven virulence factors involved in pathogenesis, intimin and bundle-forming pilus (BFP). This pathotype EPEC is divided into typical and atypical EPEC, both having a chromosomal pathogenicity island called locus of enterocyte effacement (LEE region) which contains the gene *eae* (E. coli attachment effacement). *eae* encodes intimin, an outer membrane protein that mediates the intimate adherence of bacteria to the enterocyte. Unlike typical EPEC, atypical EPEC strains do not possess the plasmid EAF (EPEC adherence factor) which is in the operon *bfp* (bundle forming pilus) consisting of 14 genes including *bfpA*, which encodes bundlin (BfpA), the main subunit of BFP allowing bacterial aggregation. EPEC infection occurs in severe dysfunction of the epithelial barrier, and one consequence is inflammation. In the literature, the interaction between effector proteins of EPEC and epithelial cells and the initial processes of bacterial interaction with the host cell are well described. However, there are few studies that have examined cytokine production in EPEC infections or their effector molecules with respect to macrophage activation, essential for controlling inflammation and immune response during this infection. The production of cytokines is an important part of the immune response and represents the host's attempt to deal with a particular microorganism. Therefore, we examined in vitro the role of intimin and BfpA in the ability to activate the innate response mediated by macrophages, where we analyzed the production of the proinflammatory cytokines TNF-α, IL-1, IL-6 and IL-12, and the antiinflammatory cytokine IL-10 and chemokine MCP-1. The results show that recombinant intimin and BfpA are potent activators of macrophages in a dose-dependent manner, where the stimulated cells produce TNF-α, IL-12 and IL-6, IL-10 and MCP-1, but not IL-1β. In this study, no synergistic effect was observed in the production of proinflammatory cytokines by combining BfpA and intimin, although production of IL-10, an antiinflammatory mediator, was potentiated at a higher dose. The effect obtained was largely attributed to these proteins, as the treatment of proteins with polymyxin B did not alter the production of TNF-α. We conclude that intimin and BfpA are potent activators of macrophages during the innate response and may contribute to the control of inflammation during infection with EPEC.

Key-words: EPEC. Intimin. BfpA. Macrophages. Cytokine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia de transmissão de célula Caco-2 infectada por cepas de EPEC induzindo a lesão attaching and effacing (A/E)..... 19

Figura 2. Representação esquemática da organização genética da região LEE de EPEC.....19

Figura 3. Padrões de aderência de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica. Adesão localizada (LA), adesão difusa (DA), aderência agregativa (AA), adesão localizada-*like* (LAL).....21

Figura 4. Translocação de proteínas secretadas pela EPEC através do sistema de secreção tipo III.....23

Figura 5. Patogênese de EPEC e o provável mecanismo da diarréia.....24

Figura 6. Interação entre intimina e seu receptor Tir presente na membrana da célula hospedeira.....26

Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão.....27

Figura 8. Exposição da mucosa a patógenos e a resposta do hospedeiro.....29

Figura 9. Cromatograma do sequenciamento do gene *eae*.....47

Figura 10. Comparação estrutural entre intimina recombinante e intimina nativa.....48

Figura 11. Perfil eletroforético da expressão do clone recombinante pFL3β em gel SDS-PAGE (12%) corado com *Comassie Blue* R250.....49

Figura 12. Perfil eletroforético após purificação da intimina 3β por SDS-PAGE a 12%, corado com Comassie *Blue* R250.....50

Figura 13. Identificação do componente de massa molecular de 80 kDa pela fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-intimina.....51

Figura 14. Identificação da proteína BfpA com soro de coelho anti-BfpA.....52

Figura 15. Viabilidade de macrófagos de camundongos C_3H/HeJ.....53

Figura 16. Detecção da produção de TNF-α em resposta ao estímulo com intimina ou BfpA.....54

Figura 17. Detecção da produção de IL-6 em resposta ao estímulo com intimina ou BfpA.....55

Figura 18. Detecção da síntese de IL-12p40 em resposta ao estímulo com intimina ou BfpA.....56

Figura 19. Detecção da produção de IL-10.....57

Figura 20. Detecção da produção da quimiocina MCP-1.....58

Figura 21. Detecção da síntese de TNF-α.....59

Figura 22. Detecção da síntese de IL-6.....60

Figura 23. Detecção da síntese de IL-12p40.....61

Figura 24. Detecção da produção de IL-10.....62

Figura 25. Detecção da síntese de quimiocina MCP-1.....63

Figura 26. Detecção da resposta dos macrófagos J774 ao LPS após tratamento com polimixina B e proteinase K.....64

Figura 27. Detecção da produção de TNF-α por macrófagos de linhagem J774 após estímulo com intimina e BfpA pre-tratadas com polimixina B ou BSA.....66

Figura 28. Detecção da produção de TNF-α por macrófagos de linhagem J774 após estímulo com intiminae BfpA pré-tratados com proteinase K.....68

Figura 29. Detecção da produção de TNF-α por macrófagos de camundongos C_3H/HeJ comparado a linhagem J774 após estímulo com intimina e BfpA pré-tratados ou não com polimixina B.....70

Figura 30. Detecção da sensibilidade dos macrófagos de camundongos C_3H/HeJ a baixas concentrações de LPS.....72

TABELA

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento do gene *eae* 37

LISTA DE ABREVIATURAS

AA - aderência agregativa

A/E - lesão *attaching and effacing*

APC - célula apresentadora de antígeno

BFP - bundle-forming pilus

BfpA - bundlina

BSA - albumina de soro bovino

°C - graus Celsius

DA - aderência difusa

DO - densidade óptica

eae - *E. coli attachment effacement*

ELISA - Ensaio de imuno-absorção por ligação enzimática

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

EPECt - *Escherichia coli* enteropatogênica típica

EPECa - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

esp - *EPEC secreted proteins*

g - gramas

h - horas

IL- interleucina

IRF-3 - fator regulador de interferon-3

LA - adesão localizada

LAL - adesão localizada *like*

LB- Luria Bertani

LBP - proteína de ligação ao LPS

LEE- *locus of enterocyte effacement*

LPS - lipopolissacarídeo

LRR - sequências ricas em leucinas

M – molar

M-CSF - fator estimulador de colônias de macrófagos

MCP-1 - proteína quimiotática de macrófagos

µg - micrograma

mg - miligrama

MHC – complexo de histocompatibilidade

min – minutos

µL - microlitro

mL - mililitro

Mϕ - macrófagos

MϕDM - macrófagos derivados de medula óssea murina

MTT - brometo de 3-(4,5)-dimetiltialzolil-2,5 difeniltetrazólio

N - normal

NF-κB - fator nuclear κB

ng - nanogramas

NLRs - receptores do tipo Nod

nm - nanômetro

NO - óxido nítrico

Nod - *Nucleotide-binding oligomerization domain*

PAMP - padrões moleculares associados à patógenos

PBS - solução salina tamponada

PCR - reação em cadeia da polimerase

pEAF - plasmídeo *EPEC adherence factor*

PER - *plasmid encoded regulator*

pg - picogramas

pH - inverso do logaritmo decimal da concentração molar de hidrogênio ionizado

PK - proteinase K

PMN- polimorfonuclear

POLYB - polimixina B

PRRs - receptores de reconhecimento padrão

REPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica de coelho

RNA -m - Ácido ribonucléico mensageiro

RPMI - meio RPMI 1640

s – segundos

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB - soro fetal bovino

SSTT - sistema de secreção do tipo três

TCR - receptor de célula T

Th1- célula T auxiliar do tipo 1

Tir - translocated intimin receptor

TLR - toll-like receptor

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

UE - unidade de endotoxina

x g - força gravitacional

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO**.....17
1.1 Diarreia.....17
1.2 *Escherichia coli*.....17
1.3 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).....18
1.4 Patogênese de EPEC.....22
1.5 Intimina.....25
1.6 Bundle-forming pilus (BFP).....26
1.7 Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal.....27
1.8 Macrófagos e a resposta imune inata.....29
1.9 Mediadores Inflamatórios.....32
2. **OBJETIVOS**.....35
3. **MATERIAL E MÉTODOS**.....36
3.1 Proteínas utilizadas.....36
3.2 Técnicas de manipulação e de análise de DNA.....36
3.2.1 Extração de plasmídios.....36
3.2.2 Desenho dos oligonucleotídeos específicos.....37
3.2.3 Sequenciamento do inserto.....37
3.3 Cultivo do clone bacteriano recombinante pFL3β.....38
3.4 Purificação da His-Intimina em coluna de níquel.....39
3.5 Técnicas para análise de proteína.....40
3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.....40
3.5.2 *Immunoblotting* para intimina.....40
3.5.3 *Immunoblotting* para BfpA.....41
3.6 Dosagem de Endotoxina.....41
3.7 Cultura de células.....41
3.7.1 Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento (M-CSF) para diferenciação dos macrófagos de medula óssea.....41
3.7.2 Isolamento e diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea murina (MϕDM).....42
3.7.3 Ativação dos macrófagos derivados de medula óssea murina (MϕDM).....43
3.7.4 Ensaio de viabilidade celular.....43
3.7.5 Cultivo e ativação de macrófagos da linhagem J774A.1.....44
3.7.6 Efeito do tratamento com polimixina B e proteinase K na atividade das proteínas recombinantes.....44

3.8 Dosagem de citocinas....45
3.9 Análise estatística....45
4. **RESULTADOS**....46
4.1 Análise do sequenciamento da intimina....46
4.2 Análise da expressão das proteínas utilizadas....48
4.2.1 Análise da expressão da intimina 3β....48
4.2.2 Análise da expressão da bundlina (BfpA)....51
4.3 Análise da viabilidade dos macrófagos derivados de medula de camundongo C_3H/HeJ após estímulo com intimina e BfpA....52
4.4 Ação da intimina e BfpA sobre macrófagos de camundongos C_3H/HeJ....53
4.4.1 Produção de TNF-α....53
4.4.2 Produção de IL-6....54
4.4.3 Produção de IL-12 p40....55
4.4.4 Produção de IL-1β....56
4.4.5 Produção de IL-10....57
4.4.6 Produção de MCP-1....58
4.5 Investigando o efeito da combinação de intimina e BfpA na ativação de macrófagos de camundongos C_3H/HeJ....59
4.5.1 Produção de TNF-α....59
4.5.2 Produção de IL-6....60
4.5.3 Produção de IL-12p40....60
4.5.4 Produção de IL-10....61
4.5.5 Produção de MCP-1....62
4.6 Resposta dos macrófagos da linhagem J774 ao estímulo com LPS na presença de polimixina B ou proteinase K....63
4.7 Participação do LPS de *E. coli* na resposta induzida por intimina e BfpA....65
4.7.1 Tratamento com polimixina B....65
4.7.2 Tratamento com proteinase K....66
4.8 Análise comparativa da produção de TNF-α por macrófagos de camundongo C_3H/HeJ e de linhagem J774....69
4.9 Nível de sensibilidade dos macrófagos de camundongo C_3H/HeJ ao LPS....71
5. **DISCUSSÃO**....73
6. **CONCLUSÃO**....85
7. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**....86
8. **ANEXOS**....108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diarreia

As diarreias são um importante problema da saúde pública no Brasil e em outros países em desenvolvimento. A cada ano são registrados dois milhões de mortes no mundo, sendo a causa mais importante de morbidade e mortalidade principalmente em crianças de baixo nível sócio-econômico (BLACK *et al.*, 2010).

Além da melhora nas condições de higiene, a terapia de reidratação oral tem levado à diminuição da morbidade e mortalidade de crianças com diarreia aguda, relacionada à perda de fluídos e eletrólitos. Entretanto, a diarreia persistente emergiu como causa comum de morte. Por ser prolongada, persiste por mais de 14 dias, podendo resultar em várias infecções consecutivas ou mal resolvidas, má absorção ou gastroenterite (OCHOA *et al.*, 2008).

1.2 *Escherichia coli*

Dentre os agentes bacterianos responsáveis pela diarreia cita-se a *Escherichia coli,* um bacilo Gram-negativo, móvel da família Enterobacteriaceae e o principal representante da microbiota bacteriana anaeróbia facultativa presente no intestino, estabelecendo com o hospedeiro uma relação de simbiose (KAPER *et al.*, 2004). A aquisição e manutenção por parte destas bactérias de genes que codificam fatores de virulência tornam-as potecialmente patogênicas. Cepas comensais que adquiriram DNA "estrangeiro" o qual codifica fatores de virulência como enterotoxinas, adesinas ou fatores de invasão, podem causar, por exemplo, uma simples diarreia ou até mesmo uma desinteria acompanhada de reação inflamatória (WEINTRAUB, 2007).

Determinadas linhagens de *E. coli* apresentam propriedades específicas de virulência, causando doenças entéricas (LEVINE, 1987). Cepas de *E. coli* associadas à gastroenterite são conhecidas como *E. coli* diarreiogênicas. Estas estão classificadas em seis patotipos baseados nos mecanismos específicos de virulência, síndromes clínicas, sorotipos O:H, aspectos epidemiológicos e nos tipos

de interação com linhagens celulares *in vitro,* sendo consideradas como *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que apresenta padrão de adesão difusa (DAEC) (KAPER *et al.*, 2004).

1.3 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC é um dos principais agentes responsáveis pelos quadros de diarreia em crianças por todo o mundo (KAPER *et al.*, 2004). A infecção é veiculada por contaminação oral-fecal, e frequentemente contraída por ingestão desses microrganismos em água e alimentos contaminados, sendo o problema agravado pela desnutrição (NATARO; KAPER, 1998; FAGUNDES-NETO; SCALETSKY, 2000).

O patotipo EPEC é subdividido em dois grupos distintos, EPEC típicas (EPECt) e EPEC atípicas (EPECa). Diferentemente das EPECt, que têm como hospedeiro somente o homem, as EPECa podem ter como hospedeiros tanto homens como animais. Por muitos anos as EPECt foram consideradas a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento sendo raras nos países industrializados. No entanto, os dados atuais sugerem que EPECa são mais frequentes que as EPECt tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento tendo surgido como patógeno emergente, relacionado à diarreia prolongada (SMITH *et al.*, 1996; SCALETSKY *et al.*, 1999, TRABULSI *et al.*, 2002; BUERIS *et al.*, 2007; FRANZOLIN *et al.*, 2005; OCHOA *et al.*, 2008; MORENO *et al.*, 2010).

A identificação de EPEC e a classificação em EPECt e EPECa, baseia-se na presença de genes específicos como *eae* e *bfpA*, além de não expressarem as toxinas de Shiga (Stx) produzida por STEC, nem as enterotoxinas termo-estável (ST) e termo-lábil (LT) produzidas por ETEC. Tanto EPECt como EPECa carream o gene cromossomal *eae* entretanto apenas EPECt possui o plasmídeo *EPEC adherence factor* (pEAF) no qual está presente o gene *bfpA* (KAPER, 1996) e expressa a fímbria BFP (ABE *et al.*, 2009; NARA *et al.*, 2010).

Ambos os grupos de EPEC produzem a lesão histopatológica típica no epitélio intestinal, denominada de lesão *attaching and effacing* (A/E) (KAPER, 1996), que pode ser observada na **figura 1**.

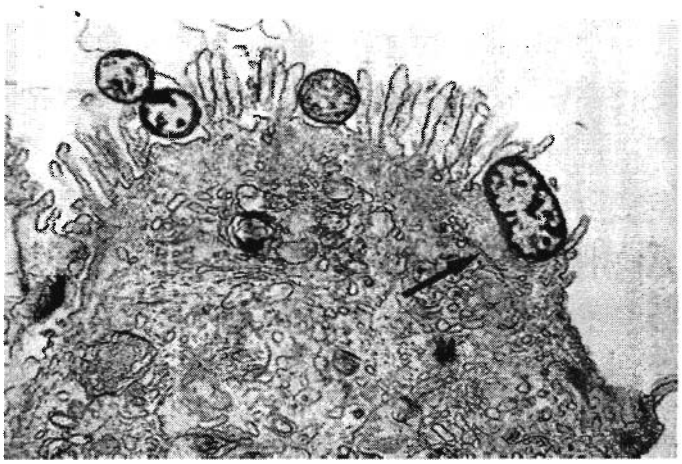

Figura 1. Microscopia de transmissão de célula Caco-2 infectada por cepas de EPEC induzindo a lesão attaching and effacing (A/E). Notar adesão do microrganismo à membrana celular da célula hospedeira, destruição das microvilosidades adjacentes à bactéria, e acúmulo de proteínas do citoesqueleto com formação de uma estrutura semelhante a um pedestal (seta). Fonte: adaptado de Nougayrède *et al.* (2003).

O fenótipo da lesão A/E é codificado por genes contidos em uma ilha de patogenicidade cromossomal de 35,5 Kb, denominada *locus of enterocyte effacement* (região LEE) (McDANIEL *et al.*, 1995). Conforme mostrado na **figura 2**, os genes que fazem parte da região LEE estão organizados em cinco principais operons LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (MELLIES *et al.*, 1999; SANCHES-SANMARTIN *et al.*, 2001).

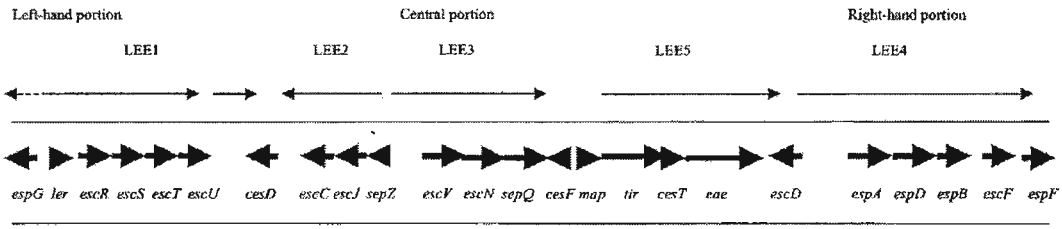

Figura 2. Representação esquemática da organização genética da região LEE de EPEC. Fonte: adaptado de Clarke *et al* (2003).

Os operons LEE1, LEE2 e LEE3 contêm os genes *esc* e *sep* que codificam componentes do sistema de secreção do tipo III (SSTT) além do gene *ler*, que regula positivamente os genes localizados em LEE (ELLIOTT *et al.*, 2000). LEE4 é a região codificadora das proteínas Esps (*EPEC secreted proteins*), secretadas pelo SSTT como: EspA, EspB, EspD e EspF (SANCHES-SANMARTIN *et al.*, 2001). O operon LEE5 contém o gene *eae* (*E. coli attachment effacement)*, o gene *tir* (*translocated intimin receptor*) e *cesT*, os quais codificam respectivamente, a intimina, uma adesina de membrana externa de 94 kDa responsável pela adesão íntima da bactéria à célula epitelial (JERSE *et al.*, 1990; FRANKEL *et al.*, 1994); o seu receptor Tir, o qual é translocado para o interior da célula epitelial através do SSTT (KENNY; WARAWA, 2001) e CesT a chaperonina das proteínas Tir e Map (*Mitochondrial- associated protein*) (SANCHES-SANMARTIN *et al.*, 2001; CREASEY *et al.*, 2003a).

Estudos demonstram que os genes da região LEE são regulados por *quorum sensing,* um sistema de comunicação entre bactérias e entre estas e seu hospedeiro, responsável por ativar ou reprimir determinados genes bacterianos (HUGHES; SPERANDIO, 2008). Em EPEC, foi mostrado que a proteína *quorum sensing E. coli regulator A* (QseA), está envolvida na ativação de LEE1, ativando diretamente este operon (SPERANDIO *et al.*, 1999; SIRCILI *et al.*, 2004). Outro importante regulador de LEE é o operon per (*plasmid-encoded regulator*), por estar presente no plasmídeo pEAF é encontrado somente em cepas de EPECt (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). O operon per é formado pelos genes *perA*, *perB, perC e perD* (GÓMEZ-DUARTE; KAPER, 1995), mas somente o produto do gene perC ativa diretamente LEE1 através de *ler* (PORTER *et al.*, 2005).

Além do operon *per,* o plasmídeo pEAF possui o operon *bfp* (*bundle forming pilus*) constituído por 14 genes incluindo *bfpA* responsável por codificar a bundlina (BfpA), principal subunidade da fímbria BFP (DONNENBERG *et al.*, 1992; STONE *et al.*, 1996; BIEBER *et al.*, 1998). BFP é responsável pelo padrão de aderência característico de EPECt em cultura de células epiteliais, chamado adesão localizada (LA) (**figura 3**) que podem ser visualizadas após a bactéria ter sido mantida em contato com as células por 3 horas (SCALETSKY *et al.*, 1984). No padrão LA, as bactérias ligam-se em áreas localizadas da superfície celular, formando microcolônias compactas (grupos bacterianos) mediadas pela fímbria BFP (GIRON *et al.*, 1991).

A ausência de expressão da fímbria BFP em EPECa reflete nos diferentes padrões de adesão, sendo o padrão de aderência mais freqüentemente observado a adesão localizada *like* (LAL) (**figura 3**) (RODRIGUES *et al.*, 1996). Esse padrão é definido após 6 h de incubação em cultura de células epiteliais, resultando na formação de microcolônias frouxas (PELAYO *et al.*, 1999; SCALETSKY *et al.*, 1999; VIEIRA *et al.*, 2001; DULGUER *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; ABE *et al.*, 2007). Entretando, algumas cepas de EPECa expressam padrões de aderência alternativos como aderência difusa (DA) ou aderência agregativa (AA) (**figura 3**) (VIEIRA *et al.*, 2001; DULGUER *et al.*, 2003; NUNES *et al.*, 2003; ROBINS-BROWNE *et al.*, 2004; ABE *et al.*, 2009). No entanto, uma quantidade considerável de cepas de EPECa são não aderentes *in vitro* (ABE *et al.*, 2009).

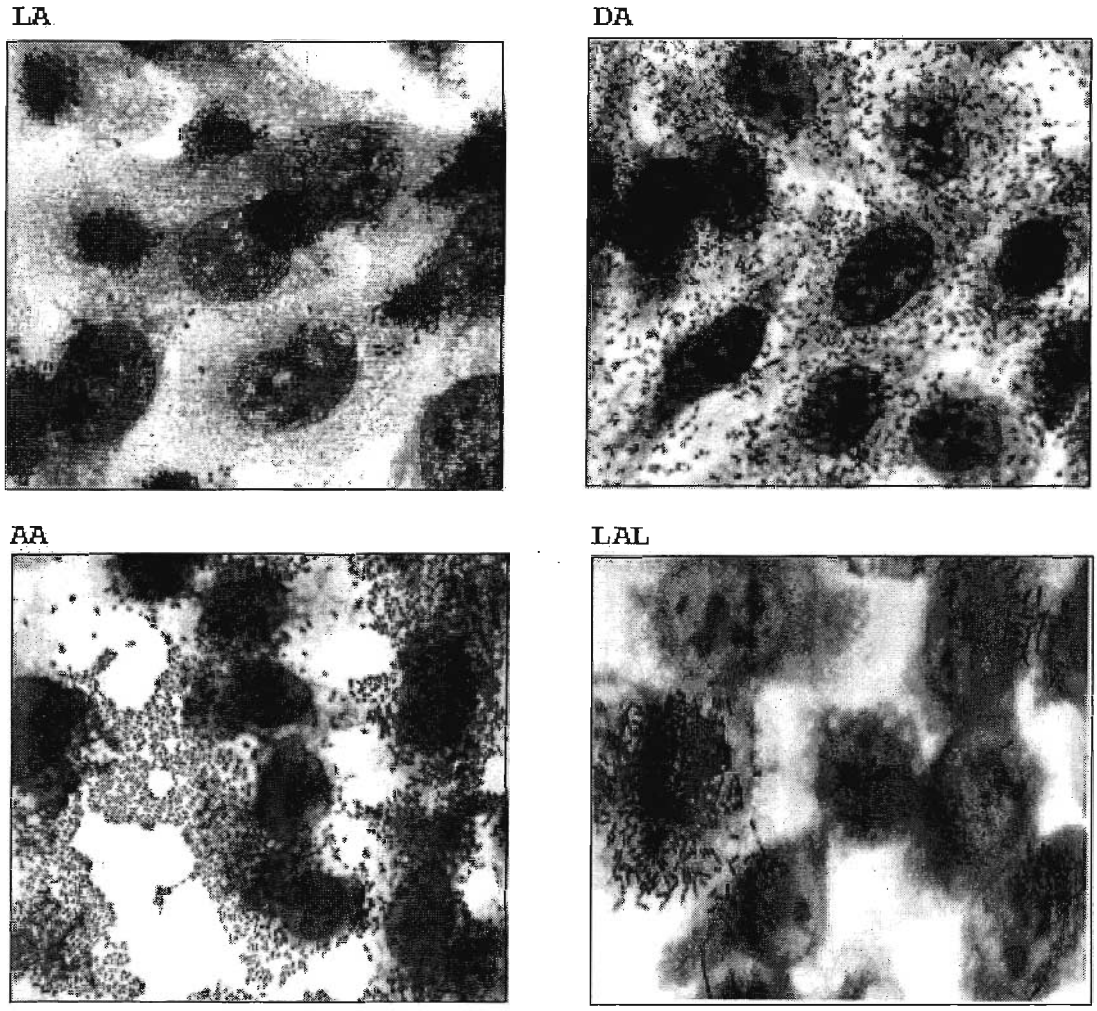

Figura 3. Padrões de aderência de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica. Adesão localizada (LA), adesão difusa (DA), aderência agregativa (AA), adesão localizada-*like* (LAL). Ampliação: 100x. Fonte: adaptado de Trabulsi *et al* (2002).

1.4 Patogênese de EPEC

Didaticamente a patogênese da infecção por EPEC é apresentada no modelo de três estágios diferentes: i) aderência inicial à célula hospedeira, ii) produção e translocação das proteínas bacterianas por uma agulha formada pelo complexo de secreção do tipo III e iii) ligação profunda com a formação do pedestal (NATARO; KAPER, 1998)

A primeira fase da infecção é superficial e não íntima, os fatores de virulência responsáveis pela adesão inicial ainda não foram definitivamente caracterizados, estudos reportam o possível envolvimento das fímbrias BFP (HYLAND *et al.*, 2008) e *E. coli common pilus* (ECP) (RENDON *et al.*, 2007), filamentos EspA (CLEARY *et al.*, 2004) e de outros fatores de virulência como o flagelo (RAMOS *et al.*, 2004). Sabe-se que esta fase é multifatorial e dependente de uma variedade de condições (HUMPHRIES; ARMSTRONG, 2010).

Após a adesão inicial, o complexo transportador SSTT é montado. Essa estrutura se assemelha a uma seringa e se estende desde a membrana interna da bactéria até o meio extracelular, formando um canal transmembrânico, através do qual, várias proteínas são secretadas (GARMENDIA; FRANKEL; CREPIN, 2005). Os filamentos de EspA promovem o contato inicial ao enterócito (KNUTTON *et al.*, 1998), possibilitando a translocaçao das proteínas estruturais EspB e EspD, responsáveis por direcionar EspA e formar um poro na membrana da célula hospedeira (**figura 4**) (DANIEL *et al.*, 2001). O SSTT formado, injeta para o interior da célula um número indeterminado de moléculas efetoras, como Tir, Esps e Map; essas transmitem sinais causando alterações no citoplasma do hospedeiro. Após ser translocado, Tir é fosforilado no resíduo de tirosina-474 por quinases específicas do enterócito e inserido na membrana da célula epitelial, com suas extremidades orientadas para o citoplasma e sua porção média localizada externamente à membrana, assumindo um formato de grampo e atuando como receptor para a intimina (LUO *et al.*, 2000).

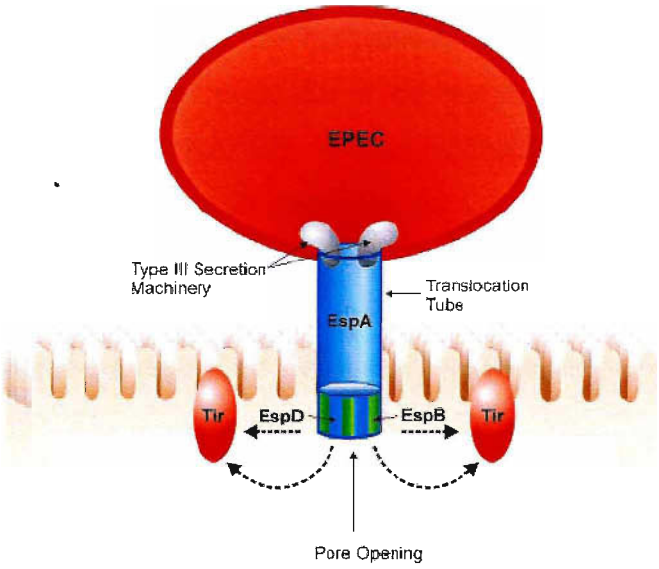

Figura 4. Translocação de proteínas secretadas pela EPEC através do sistema de secreção tipo III. Uma vez translocada para fora da bactéria, as EspA formam um filamento, EspB e EspD são inseridos na membrana celular do hospedeiro, formando a estrutura do poro, para a passagem de proteínas efetoras, como Tir. Fonte: adaptado de Vallance e Finlay (2000).

Finalmente, a adesina intimina liga-se a porção central, extracelular, de Tir resultando na adesão íntima entre a bactéria e o enterócito. A interação entre intimina e Tir induz uma cascata de sinalização intracelular (DEAN *et al.*, 2005), com o recrutamento da proteína adaptadora Nck (GRUENHEID *et al.*, 2001; CAMPELLONE *et al.*, 2002), a qual se liga diretamente ao domínio SH2 da proteína N-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*). O complexo Nck/N-WASP recruta e ativa diretamente as proteínas Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) culminando na mobilização de diferentes proteínas do citoesqueleto e dos microfilamentos de actina que se condensam logo abaixo do sítio de adesão da bactéria, resultando na formação de pedestal característica da lesão A/E (KALMAN *et al.*, 1999; LOMMEL *et al.*, 2001).

Em 2007, Whale *et al.* demonstraram que determinada linhagem de EPEC (EPEC-2) induzia a polimerização da actina independente da fosforilação de Tir, através de uma segunda proteína efetora, TccP a qual ativa N-WASP na ausência de Nck. Mais recentemente, Bai *et al.* (2008), sugeriram que a cepa de EPEC O125:H6 induz a formação do pedestal em biópsia intestinal utilizando uma via de sinalização independente de Nck e TccP. Apesar da controvérsia, de que uma das

três vias pode ser utilizada, morfologicamente, na lesão A/E observa-se a adesão do microrganismo à membrana celular do hospedeiro ("attaching") com formação de uma estrutura semelhante a um pedestal e destruição localizada dos microvilos ("effacing") (**figura 1**) (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI *et al.*, 2002).

Além de induzir à formação do pedestal, as moléculas efetoras translocadas pelo SSTT afetam os processos naturais do enterócito, resultando na perda da integridade das junções intercelulares, das funções mitocondriais, perda de eletrólitos e consequentemente morte celular, o que caracteriza a diarreia aguda (CLARKE *et al.*, 2003). O efeito acumulativo deste processo leva a inflamação, graças à produção de IL-8 pelos enterócitos e a transmigração de polimorfonucleares para o local da infecção (SAVKOVIC *et al.*, 1996), o que pode ser observado na **figura 5**.

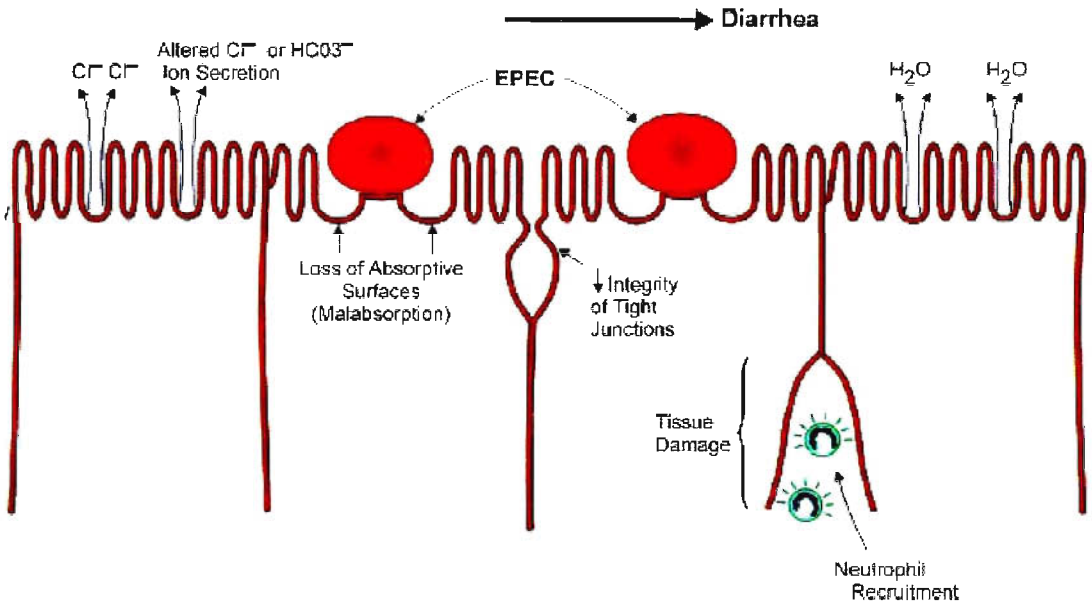

Figura 5. Patogênese de EPEC e o provável mecanismo da diarréia: destruição do epitélio intestinal, aumento da permeabilidade epitelial, alterações no tansporte de íons (cloreto e bicarbonato) e água, abertura das junções epiteliais e processo inflamatório. Fonte: adaptado de Vallance e Finlay (2000).

1.5 Intimina

A intimina é uma adesina expressa na membrana externa de EPEC, constituída por 939 aminoácidos altamente conservados na região N-terminal (aminoácidos 388 até 667) (BATCHELOR *et al.*, 1999), e variáveis nos últimos 280 aminoácidos da região C-terminal (Int_{280}), onde se encontra o domínio de ligação da intimina ao seu receptor Tir (FRANKEL *et al.*, 1994) (**figura 6**). A intimina compõe-se de cinco domínios funcionais: um domínio N-terminal ancorado na membrana externa da bactéria, incluindo os aminoácidos inseridos na região periplasmática (PP) e transmembrânica (TM), e quatro domínios extracelulares denominados: D0 [559-657], D1 [658-751], D2 [752-841] e D3 [842-939] (LUO *et al.*, 2000).

Com base em variações na sequência da porção C-terminal (Int_{280}), foram descritos até o momento mais de 29 subtipos (tipos imunológicos) de intimina, são eles: α, $\alpha2$, $\beta1$ a –3, $\gamma1$, $\gamma2$, δ, ε, $\varepsilon2$ a –4, ζ, η, $\eta2$, θ, ι, $\iota2$, κ, λ, μ, ν, ξ, o, π, ρ e σ (ADU-BOBIE *et al.*, 1998; CHINA *et al.*, 1999; OSWALD *et al.*, 2000; TARR; WHITTAM, 2002; ZHANG *et al.*, 2002; JORES *et al.*, 2003; BLANCO *et al.*, 2004, 2006; ITO *et al.*, 2007; MORA *et al.*, 2009). De acordo com estudos realizados em cultura de órgãos, existem diferenças nos padrões de adesão da bactéria a célula hospedeira dependendo do subtipo de intimina, sugerindo que os diferentes subtipos de intimina podem determinar tropismo por diferentes sítios intestinais (PHILLIPS; FRANKEL, 2000).

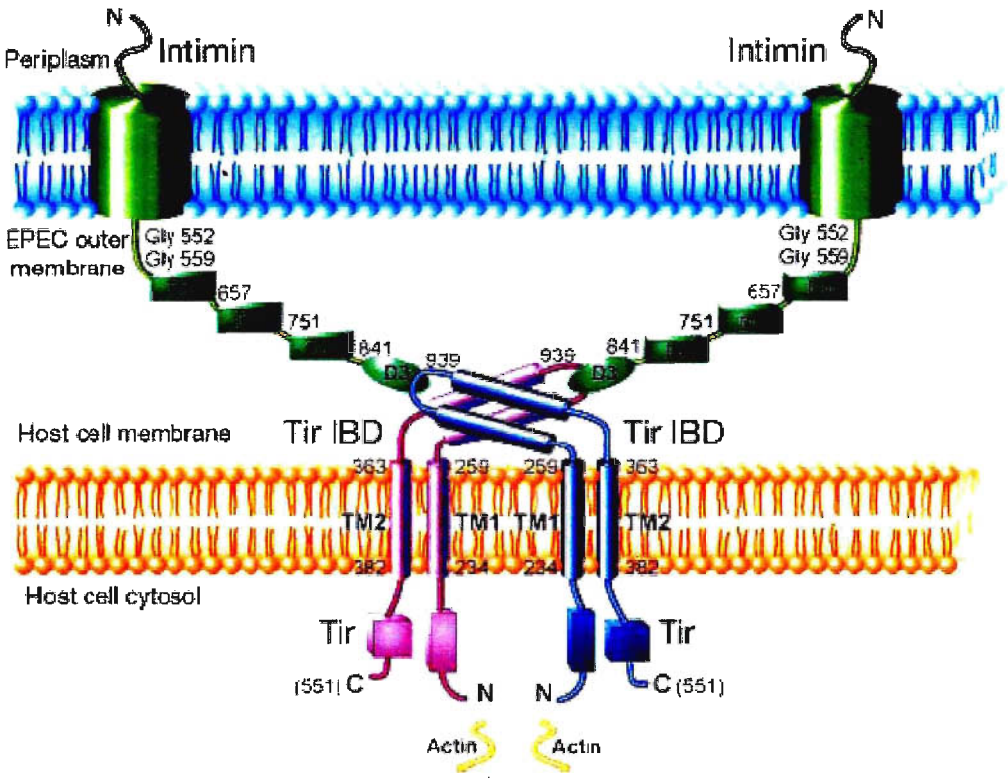

Figura 6. Interação entre intimina e seu receptor Tir presente na membrana da célula hospedeira. Intimina está representada em verde com os resíduos da porção C-terminal numerados. Os domínios tipo imunoglobulina (D0, D1 e D2) estão representados em retângulos, e o domínio tipo lecitina (D3) responsável pela ligação ao Tir em oval. Tir está representado como dímero (em azul escuro e rosa), com o domínio de ligação a intimina (IBD) extracelular e as porções N e C-terminais intracelulares. Fonte: adaptado de Luo *et al* (2000).

1.6 Bundle-forming pilus (BFP)

BFP (Bundle-forming pilus) foi originalmente descrito por Girón e colaboradores (GIRÓN *et al*., 1991), como um pilus longo, flexível, composto de estruturas semelhantes a cordas entrelaçadas na superfície bacteriana como projeções alinhados lateralmente (**figura 7**), possibilitando interligação entre cada cepa de EPEC. De acordo com análise de sua sequência de proteínas, morfologia e mecanismo de montagem, pertence ao grupo de fímbrias e de pilus tipo IV, cujas subunidades de bundlina (BfpA) estão organizadas helicoidalmente (BLANK *et al.*, 2000; CRAIG; LI, 2008; HUMPHRIES; ARMSTRONG, 2010).

Este, além de possibilitar a agregação bacteriana em microcolônias (adesão localizada – LA) (SCALETSKY *et al.*, 1984), está envolvido no evento de dispersão (BIEBER *et al.*, 1998; KNUTTON *et al.*, 1999), auxiliando na infecção de outros sítios, o que torna mais eficiente a colonização. Assim, as EPEC poderiam não infectar células isoladamente, mas como um grupo de bactérias coesas por BFP. Alguns trabalhos atribuem a essa fímbria uma participação na adesão inicial da EPECt a mucosa intestinal, contudo, este fato ainda não foi comprovado. Independente do seu mecanismo de ação, BFP é um importante fator de virulência, já que induz resposta imune (KHURSIGARA *et al.*, 2001) e exerce um papel fundamental na patogênese, tendo sido comprovado que cepa mutante causa uma diarreia mais branda quando comparado com a cepa selvagem, além de necessitar de mais tempo de incubação para o desenvolvimento do quadro diarreico (HUMPHRIES; ARMSTRONG, 2010).

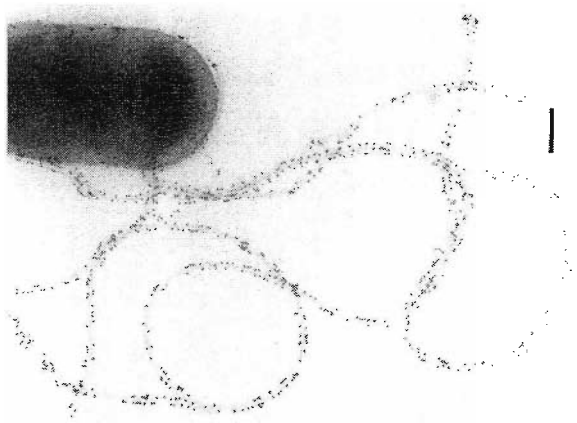

Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão. Suspensão bacteriana E2348/69 aplicada em suporte de carbono. Reação desenvolvida com soro policlonal de coelho anti bundle-forming-pilus na diluição 1:100. Fonte: adaptado de Nara *et al* (2010).

1.7 Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal

A infecção por EPEC ocorre por via oral, sendo o sistema imune de mucosas o compartimento de maior importância na proteção do hospedeiro nesta infecção. A mucosa intestinal é constituída por células epiteliais que formam uma barreira entre células de tecidos subjacentes e microrganismos presentes no lúmen intestinal. Abaixo do epitélio monoestratificado da mucosa intestinal são encontrados uma

série de folículos linfóides, isolados ou em agregados (Placas de Peyer), responsáveis pelo reconhecimento de microrganismos e pela indução da resposta imune. Estes folículos são constituídos por agregados de linfócitos, macrófagos, e células dendríticas (MAHIDA, 2000). Nesta infeção foi comprovado que há algumas rotas pelas quais estes antígenos luminais podem estimular a resposta imune, por exemplo: ruptura da barreira intestinal, entre ou através de células epiteliais íntegras, através das células M ou através das células dendríticas que podem inserir os dendritos entre os enterócitos para capturar antígenos no lúmen intestinal (**figura 8**) (MARIC *et al.*, 1996; RESCIGNO *et al.*, 2001; NIESS; REINECKER, 2006; SMITH *et al.*, 2011).

Vários enteropatógenos utilizam as células M como rota de invasão da mucosa intestinal. As células M são células epiteliais especializadas, localizadas entre as células epiteliais da mucosa, constituindo o epitélio associado ao folículo (FAE) que recobre os nódulos linfáticos das placas de Peyer. Estas células possuem membrana mais frouxa e na região apical não possuem as bordas em escova, típicos dos enterócitos do epitélio intestinal (SANSONETTI *et al.*, 1996; CORR *et al.*, 2008). Por isto, são capazes de absorver e transportar microrganismos provenientes da luz intestinal, até o folículo. Assim, as células M facilitam a entrada de partículas e microrganismos pela porção apical, provenientes da luz intestinal, que serão em seguida transferidos para as células subjacentes, aptas à fagocitose e ao processamento de antígeno, o que irá desencadear uma resposta imune no folículo linfóide. O processamento e apresentação de antígeno nas Placas de Peyer e lâmina própria em infecções intestinais é pouco explorado, mas sabe-se que macrófagos e células dendríticas são fundamentais neste processo (GEBERT *et al.*, 2004; TEMBLAY *et al.*, 2007).

As células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos e células dendríticas fagocitam estes antígenos e em seguida apresentam o antígeno processado para os linfócitos T virgens, presentes na lâmina própria (SMITH *et al.*, 2011). Entretanto, somente as células dendríticas migram para as áreas foliculares como linfonodos mesentéricos onde apresentam o antígeno processado para os linfócitos T virgens e de memória (RANDOLPH *et al.*, 2008).

Os linfócitos ativados iniciam seu processo de diferenciação e migram passando pelos vasos linfáticos, chegando aos linfonodos mesentéricos, onde podem permanecer por algum tempo, indo finalmente para a lâmina própria onde

desencadeiam a indução da resposta imune adaptativa no controle da inflamação do tecido e na manutenção da tolerância imune (WITTING; ZEITZ, 2003).

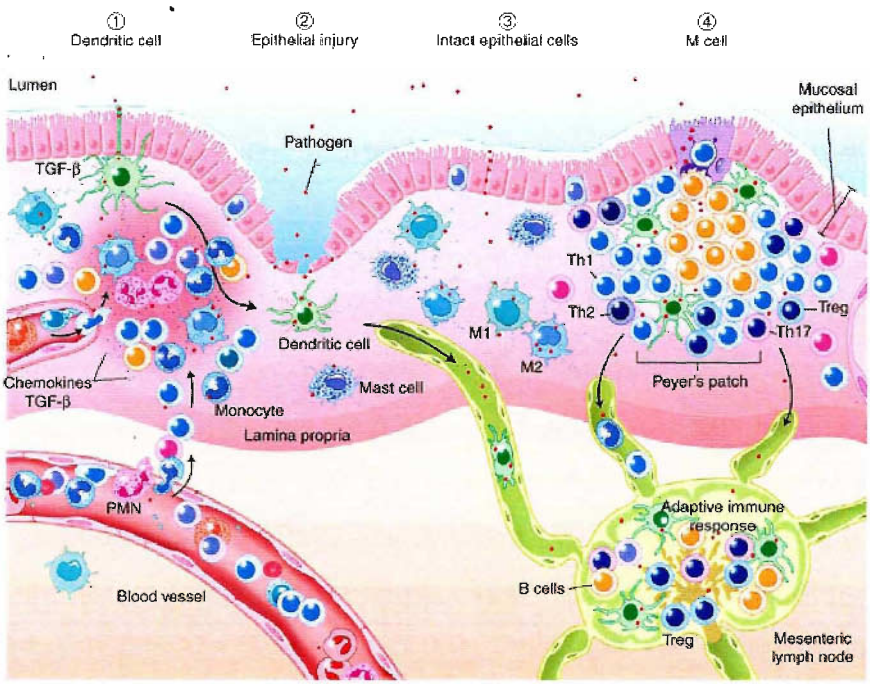

Figura 8. Exposição da mucosa a patógenos e a resposta do hospedeiro. O epitélio da mucosa apresenta uma enorme barreira estrutural e química para microrganismos patogênicos, que penetram na lâmina própria (1) pelas células dendríticas, (2) através do epitélio destruído ou lesionado, (3) entre ou através de células epiteliais íntegras, e (4) através das células M. Na lâmina própria, macrófagos e células dendríticas fagocitam e matam microrganismos. Os antígenos e/ou seus produtos são transportados pelas células dendríticas até os linfonodos, onde induzem uma resposta imune adaptativa. (ilustração por Lydia Kibiuk, NIH). Fonte: adaptado de Smith *et al* (2011).

1.8 Macrófagos e a resposta imune inata

A interação de bactérias que acarretam lesão do tipo A/E com o epitélio intestinal do hospedeiro induz resposta imune inata e adquirida decorrente do processo inflamatório no epitélio intestinal (LEBEIS *et al.*, 2008). O sistema imune inato tem como função proteger o organismo contra agentes estranhos como microrganismos, células alteradas ou transformadas. Este sistema consiste na primeira barreira de proteção do organismo e reflete no desenvolvimento da imunidade específica formada posteriormente (TOSI, 2005).

Macrófagos são células do sistema imune inato com papéis bem estabelecidos na resposta primária a patógenos, bem como na homeostase do tecido, na coordenação da resposta imune adaptativa, durante o processo inflamatório e na resolução e reparação tecidual (MARTINEZ *et al.*, 2009). Essas células são produzidas na medula óssea, primariamente como monócitos e posteriormente, liberadas na corrente sanguínea. Após migração para sítios extravasculares os monócitos sofrem maturação e adquirem características fenotípicas e funcionais, como aumento do tamanho celular, desenvolvimento do sistema lisossomal e conteúdo das enzimas hidrolíticas, além do aumento no número de mitocôndrias, o que leva ao aumento do metabolismo energético, sendo então denominado macrófago residente ou inflamatório. Assim, podem se apresentar como macrófagos livres ou como células fixas em tecidos (GORDON, 2003, MOSSER; EDWARDS, 2008). Dependendo do microambiente, os macrófagos podem seguir diferentes processos de ativação resultando em populações com heterogeneidade fenotípica originando diferentes populações com funções distintas (EDWARDS *et al.*, 2006), refletindo na resposta imune a ser desenvolvida. Entretanto, vários estudos *in vitro* indicam que o fenótipo de uma população de macrófagos pode mudar em resposta a diferentes estímulos (STOUT *et al.*, 2005), o que explica sua plasticidade na resposta a sinais ambientais (MYLONAS *et al.*, 2009; GEA-SORLÍ; CLOSA, 2010).

O grau de ativação de macrófagos pode ser um dos fatores que determina a gravidade do processo inflamatório, uma vez que os macrófagos orquestram o início e a resolução da inflamação (GEA-SORLÍ; CLOSA, 2010). Durante o processo inflamatório são ativados e desempenham funções primordiais: fagocitose para a destruição de microrganismos, apresentação de antígenos e resolução de processos inflamatórios através da produção de várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Os macrófagos, assim como outras células efetoras do sistema imune inato, reconhecem microrganismos através de vários grupos de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como receptores do tipo Toll-like (TLRs), os do tipo Nod (NLRs), receptores para lectinas, que se ligam a carboidratos presentes na superfície do microrganismo (por exemplo, manose) (TAKEDA; AKIRA, 2005; IWASAKI; MEDZHITOV, 2010), receptores *scavengers* envolvidos na captação de lipoproteínas oxidadas para dentro da célula (ABBAS *et al.*, 2008), entre outros, que

interagem com componentes microbianos conhecidos como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs). Os PAMPs são componentes estruturais essenciais para a sobrevivência do microrganismo os quais são reconhecidos pelo sistema imune inato (IWASAKI; MEDZHITOV, 2010).

Os PRRs são expressos constitutivamente na superfície de vários tipos celulares, são ligados a vias de transdução de sinais intracelulares que ativam várias respostas celulares, culminando na produção de mediadores inflamatórios (AKIRA *et al.*, 2009; CARIO, 2008). O genoma humano codifica pelo menos dez TLRs (HIBINO *et al.*, 2006) onde cada qual reconhece diferentes PAMPs presentes em microrganismos como, por exemplo, peptidioglicanos da parede celular bacteriana que são reconhecidos pelo TLR2, flagelina reconhecida pelo TLR5 e sequências CpG não metiladas de DNA bacteriano que se ligam ao TLR9 (AKIRA *et al.*, 2006; OSHIUMI *et al.*, 2008). O principal PAMP envolvido no estímulo da resposta inflamatória local e sistêmica é o lipopolissacaridio (LPS) presente em bactérias Gram-negativas que se liga ao TLR4 na superfície de células como macrófagos. Esse reconhecimento desencadeia uma cascata de sinalização intracelular, que culmina na ativação de diversos reguladores transcricionais como NF-κB ou IRF-3 (fator regulador de interferon-3), os quais ativam genes responsáveis pela transcrição de mediadores inflamatórios (BLASIUS; BEUTLER, 2010). Os receptores Nod (*Nucleotide-binding oligomerization domain*) são conhecidos como sensores intracelulares de moléculas virais e bacterianas (DIACOVICH; GORVEL, 2010). Podem reconhecer peptideoglicanos gerados por microrganismos intracelulares e contribuir para a resposta inata aumentando a resposta inflamatória via a ativação de NF-κB e AP-1 (ALTHMAN; PHILLPOT, 2004).

TLRs reconhecem PAMPs na superfície celular e em endossomos, enquanto que NLRs reconhecem PAMPs nos compartimentos intracelulares (AKIRA *et al.*, 2006; TING *et al.*, 2008). Ao mediarem o reconhecimento de PAMPs, levam a uma cascata de sinalização intracelular com consequente desenvolvimento da resposta imune (DIACOVICH; GORVEL, 2010). Nesse contexto, a descoberta dos TLRs revolucionou os mecanismos envolvidos no reconhecimento do sistema imune inato. Os TLR são moléculas transmembranas que contém um domínio externo à membrana com sequências ricas em leucina (LRR), e uma ou duas regiões ricas em cisteína, particular para cada TLR. O domínio intracelular consiste em uma cauda intracitoplasmática que fornece o sítio de ancoragem para as proteínas da cascata

de sinalização. A ativação do TLR por seus ligantes induz a dimerização de TLR, seguida pelo recrutamento de proteínas adaptadoras específicas (MyD88, Mal, Trif, e TRAM), as quais facilitam o recrutamento e ativação de proteína quinases, levando a ativação de fatores de transcrição como NF-κB e AP-1. Estes fatores (NF-κB ou AP-1) estimulam a transcrição de genes que codificam moléculas que participam da resposta imune inata, incluindo citocinas pró ou antiinflamatórias, quimiocinas, moléculas co-estimulatórias e moléculas de adesão endotelial dentre outros (ADEREM; ULEVITCH, 2000; ABBAS *et al.*, 2008).

1.9 Mediadores Inflamatórios

Nas infecções por EPEC, a inflamação é característica, devido ao aumento da permeabilidade celular. Na lâmina própria, ocorre intensa infiltração de neutrófilos para o sítio da infecção (ULSHEN *et al.*, 1980) e certamente, outras células inflamatórias como os macrófagos. Uma das conseqüências da infecção por EPEC é transdução de sinais culminando na ativação de NF-κB (ZHOU *et al.*, 2003), que promove a expressão de citocinas. Após a interação das células fagocíticas com microrganismos ou seus produtos, ocorre secreção de vários mediadores pró ou antiinflamatórios que inclui derivados do oxigênio e nitrogênio, citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF-α e quimiocinas como MCP-1, além de mediadores derivados de ácido araquidônico (MAHIDA, 2000; GORDON *et al.*, 2003; MANTOVANI *et al.*, 2007). Esta variedade de componentes regula a imunidade adaptativa a ser desenvolvida posteriormente.

A produção de citocinas constitui uma parte importante da resposta imune representando uma tentativa do hospedeiro para eliminar determinado microorganismo (RAMIREZ *et al.*, 2005).

Citocinas são proteínas que desempenham papel importante nas funções fisiológicas e inflamatórias. A ativação de macrófagos resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF-α e IL-1β que atuam sobre o endotélio vascular induzindo a expressão de moléculas de adesão (como as selectinas, ICAM-11 e VCAM-1) enquanto outras citocinas como IL-6 e IL-8 auxiliam no recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação. Além destas citocinas a produção de IL-10 e IL-12 controlam a ativação de linfócitos (CHEN *et al.*, 2003;

TOSI, 2005). Uma vez liberado nos tecidos ou na circulação, o TNF-α atua sobre os neutrófilos aumentando a atividade fagocítica, citotoxicidade e a produção do ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio, além de estimular a degranulação e a aderência dessas células ao endotélio (BEYAERT; FIERS, 1998; CAMPEBELL *et al.*, 2007).

Dann *et al.* (2008) demonstraram que em infecções causadas por *Citrobacter rodentium*, modelo de lesão A/E, macrófagos e células epiteliais presentes no cólon, expressam IL-6, citocina relacionada com o recrutamento e ativação de neutrófilos, além de induzir a produção de proteínas de fase aguda importante para o controle eficiente das bactérias. Assim, IL-6 é um mediador chave da resposta imune de fase aguda (FORTE, 2007).

Macrófagos ativados produzem outra citocina denominada IL-12, que faz a ligação entre imunidade inata e adaptativa. Esta citocina estimula as células NK e linfócitos T a produzirem IFN-γ. Este por sua vez potencia a ativação dos macrófagos, aumentando sua ação microbicida através da produção de reativos derivados do oxigênio e nitrogênio, incluindo óxido nítrico (SCHINDLER *et al.*, 2001).

Além disto, após infecção, macrófagos também produzem quimiocinas dentre elas MCP-1 (proteína quimiotática de macrófagos) que aumenta a quimiotaxia de monócitos, macrófagos, linfócitos T citotóxicos e células NK, para o local da inflamação, além de ativar estas células, melhorando a defesa do hospedeiro (GRÜTZ, 2005; FORTE, 2007).

O equilíbrio entre mediadores pró e antiinflamatórios é necessário para regular a resposta imunológica adequada contra um patógeno. Assim a resposta pró-inflamatória é essencial para combater o patógeno, enquanto antiinflamatória limita e controla os danos para o próprio hospedeiro (GRÜTZ, 2005).

A citocina antiinflamatória IL-10 desempenha papel importante na infecção inibindo a produção de IL-12 e a ativação de células T, limitando a reação imune mediada por células. A inibição da expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias pode retardar a lesão e a sepse, favorecendo a invasão microbiana (RAMIREZ *et al.*, 2005).

Ramirez *et al.* (2005) ao explorarem a resposta imune de mucosa, através da análise da produção de citocinas, em coelhos infectados com REPEC (EPEC de coelho), detectaram aumento da expressão do RNAm para IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α e IL-10 produzidas por enterócitos durante o quadro diarreico desenvolvido.

Há várias informações quanto ao papel das proteínas efetoras de EPEC sobre a célula epitelial intestinal no início da infecção, sendo raras as discussões sobre a interação EPEC ou suas moléculas efetoras com os macrófagos. Desconhecem-se como estes fatores de virulência atuam sobre estas células, que são fundamentais para o controle do processo inflamatório e geração da resposta imune durante a infecção. A relação entre os mecanismos patogênicos e a resposta imune de mucosa é um delicado equilíbrio que determina o estabelecimento da infecção. Em função disto, será analisado *in vitro* o papel de intimina e BfpA, na capacidade de ativar a resposta inata mediada por macrófagos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de citocinas produzidas por macrófagos na presença de intimina e bundlina (BfpA) de *Escherichia coli* enteropatogênica. Para isso, as seguintes etapas foram realizadas:

- Obtenção e caracterização da intimina recombinante 3β.
- Caracterização de BfpA.
- Isolamento e diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea de camundongo C_3H/HeJ.
- Cultivo da linhagem J774A.1
- Dosagem das citocinas pró (TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-12) ou antiinflamatória (IL-10) e quimiocina (MCP-1).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Proteínas utilizadas

A intimina 3β utilizada nos ensaios, foi obtida a partir do clone recombinante pFL3β (LIMA, 2004), disponível na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia do Institudo Butantan e a proteína BfpA (bundlina) foi gentilmente cedida pelo Dr. Wilmar Dias da Silva do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil).

3.2 Técnicas de manipulação e de análise de DNA

Exceto quando especificado, as técnicas de manipulação e análise de DNA foram realizadas de acordo com Sambrook *et al* (1989).

3.2.1 Extração de plasmídios

O clone bacteriano recombinante foi cultivado em caldo Luria-Bertani (LB) contendo os antibióticos canamicina 25 µg/mL e ampicilina 100 µg/mL a 37°C por 18 h sob agitação constante (200 rpm). Os cultivos foram transferidos para tubos *eppendorfs* e centrifugados durante 5 minutos a 10.000 x g em temperatura de 4°C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos utilizados para extração do DNA plasmidial. Através da utilização do *kit* comercial *Bacteria Genomic Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare, Reino Unido) foi extraído o DNA plasmidial, segundo recomendação do fabricante.

O Kit comercial utiliza um detergente fortemente aniônico em pH alto para lisar o sedimento bacteriano e, em seguida, liberar o DNA plasmidial. Esse é aplicado em uma coluna de sílica-gel, a qual absorve o DNA plasmidial e, através de lavagens, impurezas são removidas e então o DNA plasmidial puro é eluído em um pequeno volume de tampão de eluição ou água.

3.2.2 Desenho dos oligonucleotídeos específicos

Após pesquisa da sequência do plasmídio pQE30 (Quiagen, EUA), oligonucleotídeos específicos que anelassem com sítios no gene *eae* foram desenhados utilizando-se o Programa Gene Runner Versão 3.01 (1994, Hastings Software, Inc. USA) **Tabela 1**. A síntese dos oligonucleotídeos foi comercialmente obtida (Invitrogen, Brasil).

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados para o sequenciamento do gene *eae* o qual codifica a intimina de EPEC:

pQE-30F*orward* 1: GCTTCGTCACAGTTGCAGGC	pQE-30Reverse 1: CATATGTACTTGATACGCC
pQE-30F*orward* 2: GATCAGGATTTTTCTGGTG	pQE-30Reverse 2: GGTAATCGCATCAGAACC
pQE-30F*orward* 3: GCTTCGTCACAGTTGCAGGC	pQE-30Reverse 3: GGTAATCGCATCAGAACC
pQE-30F*orward* 4: GATCAGGATTTTTCTGGTG	pQE-30Reverse 4: CATATGTACTTGATACGCC

3.2.3 Sequenciamento do inserto

Foram utilizados 150 ng do DNA plasmidial e 1,6 pmol de iniciadores em uma solução final de 7,5 µL para o sequenciamento no Kit "*Big dye terminator*" da Perkin Elmer, seguindo protocolo do fabricante. Foram realizados vários sequenciamentos utilizando os quatro pares de iniciadores da **Tabela 1**. Os resultados dos sequenciamentos foram se sobrepondo até que se obtivesse um seqüenciamento completo do inserto.

Para análise da sequência de DNA utilizamos o método de Sanger adaptado para sequenciador automático capilar ABI3100 (Perkin Elmer). O método consiste na amplificação de DNA unifilamentar por PCR a partir de oligonucleotído anelado na extremidade 3`, com formação de fragmentos de DNA de diversos tamanhos pela interrupção da polimerização devido à incorporação de análogos 2`, 3`-

didesoxinucleotídeos (ddNTP BIG DYE, Perkin Elmer). Os ddNTP são marcados com diferentes corantes fluorescentes específicos e permite identificar a base terminal de cada tamanho de fragmento de DNA separado por eletroforese em polímero. A separação eletroforética é realizada em sequenciador ABI PRISM nas condições especificadas pelo fabricante (Perkin Elmer). O sistema de detecção consiste em uma fonte de laser de excitação e um detector de fluorescência, localizados na parte inferior do capilar, o qual capta as fluorescências de cada ddNTP. As informações são computadorizadas e traduzidas em um cromatograma que permite precisar as posições dos nucleotídeos determinando assim a sequência do DNA.

3.3 Cultivo do clone bacteriano recombinante pFL3β

O clone bacteriano recombinante foi cultivado em 10 mL de caldo LB contendo canamicina 25 µg/mL e ampicilina 100 µg/mL a 37°C por 18 h sob agitação constante (200 rpm). Após o crescimento, 10 mL desta cultura foi transferido para um frasco com 500 mL de LB contendo 25 µg/mL de canamicina e 100 µg/mL de ampicilina, logo, a cultura foi incubada sob agitação de 300 rpm a 37°C, até atingir uma densidade óptica (DO) entre 0,5 a 0,7 em espectrofotômetro λ 600nm.

Ao atingir a DO desejada, foi retirada uma alíquota da cultura não induzida, para posterior análise em gel de SDS-PAGE como controle negativo da expressão e à cultura bacteriana foi adicionado 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma, EUA) e incubado a 37°C por 5 h sob agitação (300 rpm). Ao final do experimento foi retirada outra alíquota para posterior análise sobre a expressão eficiente da proteína. A cultura foi então centrifugada a 4.000 x g por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 30 mL de tampão de lise (20 mM de tampão fosfato de sódio; 0,5 M de NaCl; 5 mM de imidazol pH 8,0) e adicionado 1 mM de fluoreto de fenilmetilsufato (PMSF) (Sigma, EUA). As células bacterianas em suspensão foram rompidas por pressão em *French Pressure* (Thermo Scientific, EUA) a 2.000 psi. Após o rompimento foi retirada uma alíquota para controle induzido. O lisado obtido foi centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C para retirar os restos celulares, o sobrenadante desprezado e o precipitado recuperado. Para solubilização do precipitado celular,

este foi ressuspenso em 8 M de ureia em 50 mL de tampão de lise e, com auxílio de um agitador, o precipitado celular foi solubilizado e transferido para um tubo FALCON® novo e centrifugado a 10.000 x g por 20 min. a 20°C. O sobrenadante foi recuperado e o precipitado celular descartado. Alíquota do sobrenadante foi retirada para posterior análise em gel de SDS-PAGE.

O sobrenadante foi filtrado a 0,45 μm e, com auxílio da bomba peristáltica, gotejado lentamente em 2 L de tampão de lise em agitação lenta para evitar precipitação da proteína. Assim, nessas condições de renaturação, a proteína recombinante desnaturada, teve sua estrutura nativa recuperada para ser purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

3.4 Purificação da His-Intimina em coluna de níquel

A proteína solubilizada em 2 L de tampão de lise foi lentamente adicionada à resina de níquel *sepharose* (GE Healthcare, Reino Unido) previamente lavada com água destilada estéril e equilibrada com tampão de lise, dentro da coluna de purificação (GE Healthcare, Reino Unido). Após a passagem de toda a amostra, a resina foi lavada 4 vezes com tampões de lavagem contendo concentrações crescente de imidazol [20 mM de tampão fosfato de sódio; 0,5 M de NaCl; concentração crescente de imidazol (10 mM, 20 mM, 40 mM e 50 mM de imidazol) pH 8,0], para retirar proteínas inespecíficas. A proteína recombinante contendo a cauda de histidina se liga por afinidade ao níquel da resina (Ni–6xHis–proteína), enquanto as proteínas inespecíficas são lavadas pelo tampão de lavagem. A lavagem foi monitorada pelo método Bradford até não se detectarem mais proteínas. Após lavagem a amostra foi eluída com tampão de eluição (20 mM de tampão fosfato de sódio; 0,5 M de NaCl e 500 mM de imidazol; pH 8,0) até não sair mais proteínas. A resina foi lavada com água destilada estéril e estocada em etanol 20%. A amostra foi dialisada contra solução salina tamponada com fosfato (PBS) [0,13 M de NaCl; 2,7 mM de KCl; 0,01 M de Na_2HPO_4; 1,7 mM de KH_2PO_4; pH 7,4] e armazenada a - 20°C. Após diálise a amostra foi dosada pelo NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. Em todas as etapas foram coletadas alíquotas para análise das proteínas por SDS-PAGE.

3.5 Técnicas para análise de proteína

3.5.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS–PAGE) foi realizada em condições de desnaturação, como descrito por Laemmli (1970). A proteína foi separada por SDS-PAGE a 12% (intimina 80 kDa), juntamente com o padrão de peso molecular LMW-SDS – *Low Molecular Weight Calibration Kit for Eletrophoresis* (GE Healthcare, Reino Unido). As corridas eletroforéticas foram efetuadas sob corrente de 20 mA por cerca de 120 minutos em tampão de corrida (0,024 M de Tris base; 0,25 M de Glicina; 10% de SDS e água milli-Q qsp 1000 mL; pH 8,3). As proteínas separadas por eletroforese (SDS-PAGE) foram visualizadas através da coloração dos géis com solução a 1% de *Coomassie Blue - Comassie Brilliant Blue R-250* (Sigma) por 2 horas, seguida de descoloração com descorante contendo 300 mL de metanol, 70 mL de ácido acético glacial e água milli-Q qsp 1000 mL.

3.5.2 *Immunoblotting* para intimina

As proteínas contidas no gel de SDS-PAGE foram transferidas eletroforeticamente para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Reino Unido) a 350 mA sob refrigeração por 1 h. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma, EUA) (Ponceau S 1 g; ácido acético 1 mL; água milli-Q 100 mL), lavada com água destilada e bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em PBS por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. Após bloqueio a membrana foi lavada com PBS *Tween* (100 mL de PBS; 0,05% de *Tween* 20) por 3 vezes e incubada com a fração enrriquecida em IgG anti-intimina obtida em coelho (MENEZES *et al.*, 2010) em uma diluição de 1:100 em tampão de bloqueio por 1 h em temperatura ambiente. A membrana foi então lavada 3 vezes com PBS *Tween* e incubada por 1 h com o soro de cabra IgG (H+L) anti-coelho conjugado a peroxidase (Zymed®) em tampão de bloqueio, em uma diluição de 1:5000 à temperatura ambiente com agitação. A membrana foi então lavada 3 vezes com PBS *Tween* e revelada com PBS contendo 0,16 mg/mL de 3,3-diaminobenzidina (DAB) (Sigma, EUA) e 5 μL/mL de peróxido de hidrogênio até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.5.3 *Immunoblotting* para BfpA

O *immunoblotting* foi realizado conforme descrito no item 3.5.2, sendo aplicado BfpA purificado (20 kDa) ao gel. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Reino Unido) a 350 mA sob refrigeração por 1 h. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S (Sigma, EUA), lavada com água destilada e bloqueada com leite em pó desnatado a 5% em PBS *Tween overnight* a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada durante 1 h e 30 min a temperatura ambiente com soro policlonal (IgG) de coelho anti-BfpA (NARA *et al.*, 2010), diluído a 1:100. A membrana foi lavada 5 vezes com PBS *Tween* por 5 min e incubada por 1 h e 30 min a temperatura ambiente com soro de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase na diluição 1:5000 (Zymed®). Posteriormente a membrana foi lavada 5 vezes com PBS *Tween* por 5 min e revelada com PBS contendo 0,16 mg/mL de DAB (Sigma, EUA) e 5 μL/mL de peróxido de hidrogênio até o aparecimento das bandas. A reação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.6 Dosagem de Endotoxina

A faixa de endotoxina presente nas amostras de intimina e BfpA (0,125 a 1,25 UE/μg de proteína) foi mensurada pelo teste do Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Kit da Lonza (Basel, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante (sensibilidade de 0,125 UE/mL), o qual considera que 1 UE (Unidade de Endotoxina) corresponde a 5 ng/mL de LPS.

3.7 Cultura de células

3.7.1 Cultivo de células L929 para obtenção do fator de crescimento (M-CSF) para diferenciação dos macrófagos de medula óssea

A linhagem L929 são fibroblastos imortalizados originados de camundongo *Mus musculus,* possuindo a capacidade de secretar fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) em seu sobrenadante. Assim, o sobrenadante destas células

foi utilizado como fonte de M-CSF para diferenciar macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C_3H/HeJ (GERSUK *et al.*, 2004). Para obtenção do sobrenadante as células (1 x 10^5/mL) foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (CRIPION) e gentamicina (30 µg/ml) por sete dias a 37°C e 5% de CO_2. Após este período o sobrenadante contendo M-CSF foi centrifugado por 10 minutos a 185 x g, para separar possível contaminação celular, filtrado e conservado a - 20°C até o momento do uso para diferenciar as culturas de macrófagos obtidos da medula óssea.

3.7.2 Isolamento e diferenciação de macrófagos derivados de medula óssea murina (MϕDM)

Foram utilizados camundongos fêmeas isogênicos C_3H/HeJ com 6-8 semanas de idade, obtidos do biotério da Faculdade de Veterinária ou da Faculdade de Medicina da USP. Os camundongos foram sacrificados através da exposição ao CO_2. A seguir, foram extraídos o fêmur e a tíbia para a obtenção das células medulares que deram origem aos macrófagos utilizados. Todos os procedimentos estão de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB).

As células obtidas foram centrifugadas por 10 minutos a 185 x g, o sobrenadante foi desprezado e sobre o sedimento foi adicionado o tampão ACK (NH_4Cl 0,15 M; $KHCO_3$ 1 mM e Na_2EDTA 0,1 mM) para lisar as hemácias presentes. A suspensão celular foi mantida à temperatura ambiente por cinco minutos, sendo então as células lavadas com PBS pH 7.2. Finalmente as células obtidas foram diluídas na concentração adequada (6 x 10^5 células/poço) e cultivadas em placas de 48 poços (Costar) a 37°C e 5% de CO_2, em meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco Invitrogen Corporation), 0,2 mM de L-glutamina, 50 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, 1 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais e 20% (v/v) em relação ao meio de cultura do sobrenadante de célula L929 (GERSUK *et al.*, 2004) usado na diferenciação dos macrófagos de medula óssea.

No sétimo dia as células já diferenciadas, foram lavadas com PBS pH 7.2, para a remoção das células não aderentes, as aderentes foram mantidas em meio

RPMI suplementado com 10% SFB e 50 UI/mL de penicilina e 50 μg/mL de estreptomicina, estando prontas para serem utilizadas nos ensaios. Anteriormente estas células foram confirmadas quanto ao seu fenótipo através de Citometria de Fluxo usando anticorpos monoclonais específicos para linfócitos T (anticorpos anti-CD3), linfócitos B (anti-B220) e macrófagos (anti-F4/80). Estas células mostraram-se exclusivamente F4/80 (rendimento de 90%), sendo negativa para outras marcações.

3.7.3 Ativação dos macrófagos derivados de medula óssea murina (MϕDM)

As células aderentes (6 x 10^5 células/poço) previamente lavadas com PBS pH 7.2 foram ativadas com 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 μg/mL de intimina ou de BfpA associados ou não. O sobrenadante das culturas foi colhido após 20 h de estímulo para dosagem de TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e MCP-1. Para o controle da possível contaminação por LPS as mesmas células foram estimuladas com 2,5; 5; 10, 50 e 100 ng/mL de LPS. Após 20 h de estímulo o sobrenadante foi coletado para dosagem de TNF-α.

3.7.4 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular após o tratamento dos macrófagos com intimina e BfpA foi avaliada pela atividade da succinil desidrogenase, uma enzima mitocondrial presente somente em células vivas. O substrato utilizado para esta enzima foi o brometo de 3-(4,5)-dimetiltialzolil-2,5 difeniltetrazólio (MTT). Células vivas convertem o MTT em um cristal roxo insolúvel denominado formazan. O formazan é então solubilizado e a densidade óptica (DO) determinada. Portanto, quanto maior a viabilidade celular, mais intensa será a coloração arroxeada e maior a DO (MOSMANN, 1983)

Os macrófagos aderentes foram obtidos conforme descrito, em seguida foram incubados em meio RPMI suplementado com 10% SFB, 50 μg/mL de penicilina e 50 μg/mL de estreptomicina, na ausência ou presença de 5 e 10 μg/mL de intimina ou 5 e 10 μg/mL de BfpA, sendo as culturas posteriormente mantidas a 37°C e 5% de CO_2 por 20 horas. Após este período foi adicionado 5 mg/mL de MTT, às culturas celulares (10% do volume), as placas foram incubadas por 4 horas a 37°C. Em

seguida os cristais de formazan foram solubilizados usando v/v de solução HCl 0,1N em álcool isopropílico e mantidas sob agitação por 2 horas. Após solubilização dos cristais, a absorbância foi lida em leitor de ELISA (Multiskan EX, Primary EIA) λ 550 nm. A viabilidade celular foi analisada comparando-se a densidade óptica das culturas que não receberam tratamento com as que foram tratadas com as proteínas. O grupo controle positivo tratado apenas com 0,1% de Triton X-100 foi incluído para provocar a morte celular, representando 100% de morte. O grupo controle negativo foi representado pelos macrófagos não tratados, sendo considerado como 100% de viabilidade.

3.7.5 Cultivo e ativação de macrófagos da linhagem J774A.1

A linhagem de macrófagos J774 são células imortalizadas derivadas de camundongo Balb/c altamente respondedor ao LPS. Estas células foram cultivadas em placa de 48 poços (Costar) (6 x 10^5 células/poço) utilizando meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Invitrogen Corporation) e 50 µg/mL de gentamicina sendo mantida a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Estas células foram usadas para avaliar a atividade da proteinase K (PK) e polimixina B (poly B) sobre as proteínas recombinantes intimina e BfpA.

3.7.6 Efeito do tratamento com polimixina B e proteinase K na atividade das proteínas recombinantes

A polimixina B é um lipopeptídeo cíclico catiônico que se liga ao lipídeo A da molécula de LPS, bloqueando o efeito biológico do LPS, enquanto a proteinase K é uma serina protease que cliva ligações peptídicas na porção carboxílica dos aminoácidos, degradando as proteínas (BIRAGYN *et al.*, 2002; PALLISER *et al.*, 2004; SANDRI *et al.*, 2008). Estas propriedades foram utilizadas para confirmar a atividade imune das proteínas recombinantes obtidas. Após 24 h de cultivo conforme item 3.7.5, as células aderentes foram estimuladas com: 1, 5 e 10 µg/mL de intimina ou BfpA pré incubadas ou não com 30 µg/mL de polimixina B ou 50 µg/mL de proteinase K para determinar o possível envolvimento da endotoxina na atividade imune das proteínas recombinantes estudadas. Para o controle da presença de endotoxina, as células foram tratadas com 100 ng/mL de LPS de *E. coli*

pré-incubado ou não com polimixina B ou proteinase K, conforme citado anteriormente. A quantidade de endotoxina utilizada foi muito superior ao encontrado nas proteínas estudadas.

Como controle de especificidade da atividade de resposta, foi incluída uma proteína não relacionada, tratando as culturas de células J774 com 10 µg/mL de albumina de soro bovino (BSA, SIGMA), correspondendo à máxima quantidade de proteína recombinante utilizada nos ensaios.

3.8 Dosagem de citocinas

Foi analisada a presença das seguintes citocinas TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 e IL-12 e da quimiocina MCP-1 no sobrenadante das culturas, utilizando o ensaio imunoenzimático (ELISA) do kit da eBioscience seguindo a orientação do fabricante.

As concentrações de TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e MCP-1 foram determinadas a partir de curvas padrões obtidas com o recombinante específico para cada uma dessas citocinas.

3.9 Análise estatística

Os resultados representam à média e o erro padrão da média (SEM) de 3-4 experimentos independentes e foram analisados pelo programa GraphPad Prism 5®. Diferenças foram consideradas significantes quando o $p<0,05$ pelo teste *t* Student não pareado.

4. RESULTADOS

4.1 Análise do sequenciamento da intimina

Os cromatogramas obtidos nos sequenciamentos realizados, utilizando oligonucleotídeos sintéticos externos e internos (**figura 9**), mostraram que na construção pFL3β a orientação (5'→ 3') da sequência está correta, no entanto, ocorreram algumas trocas nos nucleotídeos, resultando na alteração de alguns aminoácidos da proteína. Porém, ao alinhar a intimina 3β recombinante com a proteína nativa (**figura 10**) de E*scherichia coli* O111:H- disponível no GenBank sob número de acesso AB426060.1, observa-se 99% de identidade, confirmando a especificidade do produto amplificado e a presença do gene *eae* na amostra.

ATGAGAGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCCGCTAGCGCTTCGTCACAGTTGCAGGCCTGGTTACAA
CATTATGGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAGAGTGGTAATAACTTTGACGGTAGTTCACTGGACTTCTTATTACCG
TTCTATGATTCCGAAAACATGCTGGCATTTGGTCAGGTCGGGGCGCGTTACATTGACTCCCGCTTTACGGCAAAT
TTAGGTGCTGGCCAGCGTTTTTTCCTTCCTGAAAATATGTTGGGCTATAACGTCTTCATTGATCAGGATTTTTCT
GGTGATAATACCCGTTTAGGTATTGGTGGCGAATACTGGCGAGACTATTTCAAAAGTAGCGTTAACGGCTATTTC
CGCATGAGCGGCTGGCATGAGTCATACAATAAGAAAGACTATGATGAGCGCCCGGCAAATGGTTTTGATATCCGC
TTTAATGGCTATTTACCATCATATCCGGCATTAGGCGCCAAACTGATGTACGAACAGTATTATGGTGATAATGTT
GCTTTGTTTAATTCCGATAAGTTGCAGTCGAATCCTGGCGCGGCGACCGTTGGTGTAAACTACACTCCGATTCCT
CTGGTGACGATGGGGATCGATTACCGTCATGGTACGGGTAATGAAAATGATCTCCTTTACTCAATGCAGTTCCGT
TATCAGTTTGATAAACCGTGGTCTCAGCAAATCGAGCCACAGTATGTTAACGAGTTAAGAACATTATCGGGCAGC
CGTTACGATCTGGTTCAGCGTAATAACAATATTATTCTGGAGTACAAAAAGCAGGATATTCTTTCTCTGAATATT
CCGCATGATATTAATGGTACTGAACACAGTACGCAGAAGATTCAATTGATCGTTAAGAGCAAATACGGTCTGGAT
CGTATCGTCTGGGATGATAGTGCATTACGCAGTCAGGGCGGTCAGATTCAGCATAGCGGAAGCCAAAGCGCACAA
GACTACCAGGCTATTTTGCCTGCTTATGTGCAAGGTGGCAGCAATATTTATAAAGTGACCGCTCGCGCCTATGAC
CGAAATGGTAATAGTTCTAATAATGTACAGCTCACTATTACCGTTTTACCGAATGGGCAGGTTGTGGACCAGGTT
GGGGTAACGGACTTTACGGCTGATAAGACATCGGCTAAAGCGGATAACGCTGATACCATTACTTATACCGCGACG
GTTAAAAAGAATGGTGTAGCTCAGGCTAATGTCCCTGTAACATTTAGTATTGTATCCGGGACTGCAACTCTTGGG
GCAAATAGTGCCAAAACGGATGGTAACGGTAAGGCAACCGTAACGTTGAAGTCGGTTACGCCAGGACAGGTCGTC
GTGTCTGCTAAAACCGCGGAGATGACTTCGCCACTTAATGCCAATGCGGTTATATTTGTTGATCAAACCCAGGCC
AGTATTACTGAGATTAAGGCTGATAAAACAACAGCGAAGGCAGATGGTTCTGATGCGATTACCTATACTGTCAGA
GTGATGAAGGAGGGGGCACCCGTAGTAGATCAGAAAGTGACCTTTTCTAAGGATTTTGGGACCCTGAATAAGACT
GAAGCAACAACCGATCAGAATGGTTATGCTACTGTAAAATTATCATCCAATACTCCTGGCAAGGCCATTGTTAGT
GCAAAAGTGAGTGGAGTAGGTACAGAAGTTAAGGCTACTACCGTTGAGTTTTTTGTCCCGTTGAGTATTGATGGT
GATAAAGTGACCGTAATTGGTACTGGTGTCACGGGGGCTCTGCCAAAGAATTGGTTACAGTATGGTCAGGTTAAG
CTACAGGCAACAGGGGGCAATGGAAAATATACATGGAAATCCAGTAATACTAAAATTGCTTCTGTTGATAACTCG
GGAACGATAACCTTAAATGAAAAAGGGAGTGCCACAATTACTGTAGTATCTGGTGATAATCAGAGTGCGACATAT
ACAATTAATGCACCAAGCAGTATCGTAATCGCTGTGGATAAAGTTAATCGGATGACATATTCTGCTGCCGAAAAC
AAGTGTCGAGCAATTGGTGCAAATTTAGCACAGTCAAAGAGTATATTGACAGACACATATTCTAAATGGGGAGCT
GCTAATAAATATTCTTACTATTCTGGTTCTAATTCATTGACAGCTTGGATTACACAATCCTCTTCTGAGTTACAA
TCGGGCGTATCAAGTACATATGCGATCGAAGCTTAATTAGCTGAGC

Figura 9. Cromatograma do sequenciamento do gene *eae*. Inserto clonado em pQE30 e digerido com BamHI e HindIII. Em verde partes do vetor pQE30, em amarelo oligonucleotídeos utilizados para os sequenciamentos.

```
recombinante    ASSQLQAWLQHYGTAEVNLQSGNNFDGSSLDFLLPFYDSENMLAFGQVGARYIDSRFTAN 60
nativa          ASSQLQAWLQHYGTAEVNLQSGNNFDGSSLDFLLPFYDSENMLAFGQVGARYIDSRFTAN 60
                ************************************************************

recombinante    LGAGQRFFLPENMLGYNVFIDQDFSGDNTRLGIGGEYWRDYFKSSVNGYFRMSGWHESYN 120
nativa          LGAGQRFFLPENMLGYNVFIDQDFSGDNTRLGIGGEYWRDYFKSSVNGYFRMSGWHESYN 120
                ************************************************************

recombinante    KKDYDERPANGFDIRFNGYLPSYPALGAKLMYEQYYGDNVALFNSDKLQSNPGAATVGVN 180
nativa          KKDYDERPANGFDIRFNGYLPSYPALGAKLMYEQYYGDNVALFNSDKLQSNPGAATVGVN 180
                ************************************************************

recombinante    YTPIPLVTMGIDYRHGTGNENDLLYSMQFRYQFDKPWSQQIEPQYVNELRTLSGSRYDLV 240
nativa          YTPIPLVTMGIDYRHGTGNENDLLYSMQFRYQFDKPWSQQIEPQYVNELRTLSGSRYDLV 240
                ************************************************************

recombinante    QRNNNIILEYKKQDILSLNIPHDINGTEHSTQKIQLIVKSKYGLDRIVWDDSALRSQGGQ 300
nativa          QRNNNIILEYKKQDILSLNIPHDINGTEHSTQKIQLIVKSKYGLDRIVWDDSALRSQGGQ 300
                ************************************************************

recombinante    IQHGGSQSAQDYQAILPAYVQGGSNIYKVTARAYDRNGNSSNNVQLTITVLPNGQVVDQV 360
nativa          IQHGGSQSAQDYQAILPAYVQGGSNIYKVTARAYDRNGNSSNNVQLTITVLPNGQVVDQV 360
                ************************************************************

recombinante    GVTDFTADKTSAKADGIEAITYTATVKKNGVAQANVPVTFSIVSGTATLGANSARTDGNG 420
nativa          GVTDFTADKTSAKADGIEAITYTATVKKNGVAQANVPVTFSIVSGTATLGANSARTDGNG 420
                ************************************************************

recombinante    KATVTLKSATPGQVVVSAKTAEMTSPLNASAVIFVDQTQASITEIKADKTTAKADGSDAI 480
nativa          KATVTLKSATPGQVVVSAKTAEMTSPLNASAVIFVDQTKASITEIKADKTTAKADGSDAI 480
                ************************************:*******************

recombinante    TYTVRVMKEGAPVVDQKVTFSKDFGTLNKTEATTDQNGYATVKLSSNTPGKAIVSAKVSG 540
nativa          TYTVRVMKEGAPVVDQKVTFSKDFGTLNKTEATTDQNGYATVKLSSNTPGKAIVSAKVSG 540
                ************************************************************

recombinante    VGTEVKATTVEFFAPLSIDGDKVTVIGTGITGALPKNWLQYGQVKLQATGGNGKYTWKSS 600
nativa          VGTEVKATTVEFFAPLSIDGDKVTVIGTGITGALPKNWLQYGQVKLQATGGNGKYTWKSS 600
                ************************************************************

recombinante    NTKIASVDNSGVITLNEKGSATITVVSGDNQSATYTINAPGSIVIAVDKNTRVTYFDAEN 660
nativa          NTKIASVDNSGVITLNEKGSATITVVSGDNQSATYTINAPGSIVIAVDKNTRVTYFDAEN 660
                ************************************************************

recombinante    KCKSNSANLAQSKELLANIYSTWGAANKYSYYSGSNSLTAWITQSSSELQSGVSSTYAI 719
nativa          KCKTNSANLAQSKELLANIYSTWGAANKYPYYSGSKSLTAWIKQSSSELQSGVSSTYAI 719
                ***:*************************.*****:******.****************
```

Figura 10. Comparação estrutural entre intimina recombinante e intimina nativa. Alinhamento entre a sequência de aminoácidos da intimina 3β de E*scherichia coli* O111:H- disponível no GenBank sob número de acesso AB426060.1 e a sequência da aminoácidos da proteína recombinante, deduzida a partir do seqüenciamento do produto do gene *eae*. Em amarelo: aminoácidos alterados; Em negrito: região variável da intimina, que compreende aminoácidos 661 a 939.

4.2 Análise da expressão das proteínas utilizadas

4.2.1 Análise da expressão da intimina 3β

Após a confirmação da intergidade do gene *eae* pelo sequenciameno do clone pFL3β este foi induzido com IPTG e lisado em *French Press*. A expressão da proteína foi analisada por SDS-PAGE em gel a 12%. Conforme se observa na

figura 11 (canaleta 2) não houve expressão da proteína antes da adição do indutor (IPTG); e na canaleta 3, observa-se a expressão da intimina com massa molecular relativa de 80 kDa após 3 horas de indução. Tanto na fração solúvel do sobrenadante do lisado bacteriano (canaleta 4) como na fração insolúvel (canaleta 5) observa-se a presença da intimina. Apesar de mais trabalhoso optou-se pela purificação da proteína a partir da fração insolúvel, pois deste modo, um maior rendimento protéico pode ser obtido.

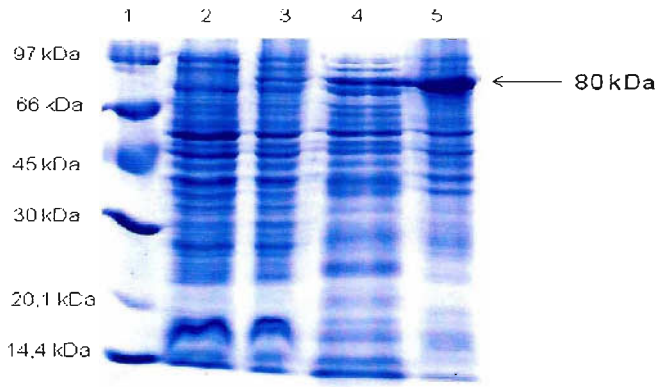

Figura 11. Perfil eletroforético da expressão do clone recombinante pFL3β em gel SDS-PAGE (12%) corado com *Comassie Blue* R250. **1.** Padrão de peso molecular (LMW); **2.** Cultivo bacteriano não induzido; **3.** Cultivo bacteriano após indução por IPTG (proteína de massa molecular relativa de 80 kDa); **4.** Sobrenadante do lisado bacteriano (fração solúvel); 5. Sedimento do lisado bacteriano (fração insolúvel).

Para a purificação da intimina foi utilizada a fração insolúvel do cultivo bacteriano. O sobrenadante da fração insolúvel, previamente tratado com ureia, foi diluído em tampão de lise contendo imidazol e adsorvido à resina de afinidade metálica carregada com níquel. Para eliminação das proteínas contaminantes, a resina foi lavada sucessivamente utilizando-se o tampão de lavagem contendo concentrações crescentes de imidazol. Posteriormente, as frações contendo a proteína purificada, após a eluição com imidazol foram reunidas e dialisadas em PBS (**figura 12**).

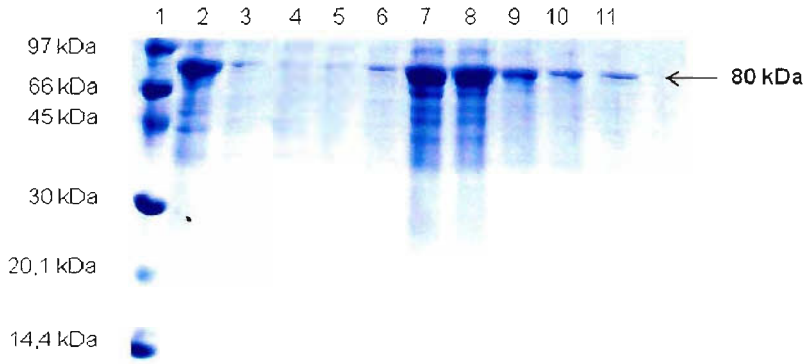

Figura 12. Perfil eletroforético após purificação da intimina por SDS-PAGE a 12%, corado com Comassie *Blue* R250. **1.** Padrão de peso molecular (LMW); **2.** Sedimento bacteriano solubilizado em ureia 8M; **3 a 6.** Lavagem coluna de níquel com tampões de lavagem com 10, 20, 40 e 50 mM de imidazol; **7 a 11.** Eluição da proteína com 500 mM de Imidazol. A seta indica a localização da proteína recombinante purificada no gel.

A intimina recombinante purificada em coluna de *Níquel-Sepharose* (GE Healthcare, Reino Unido) apresentou massa molecular relativa de 80 kDa e rendimento estimando em 75,2 mg/L pelo Nanorop®. Ou seja, a partir de 500 mL de cultura induzida, obteve-se 20 mL de intimina na concentração final de 1,88 mg/mL. Esta proteína purificada (pool das frações 9, 10 e 11) foi utilizada em todos os ensaios de ativação de macrófago.

A intimina purificada a partir do produto de expressão do clone pFL3β foi analisada por *immunoblotting* utilizando-se a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-intimina (MENEZES *et al.*, 2010) com a membrana de nitrocelulose contendo o conteúdo protéico após a purificação de intimina. Observa-se na **figura 13** (canaleta 2) o componente de massa molecular de 80 kDa referente à intimina 3β. Neste trabalho a intimina 3β será denominada apenas como intimina.

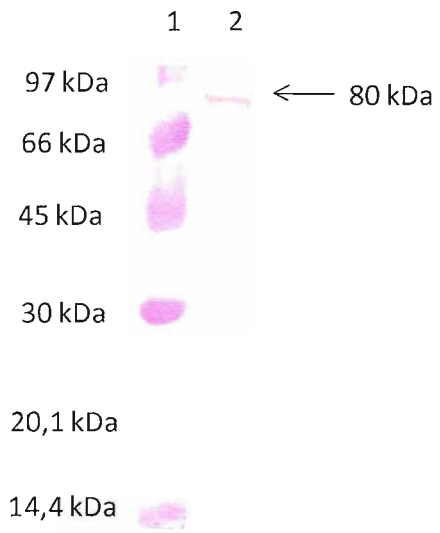

Figura 13. Identificação do componente de massa molecular de 80 kDa pela fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-intimina. Membrana de nitrocelulose contendo as frações proteicas do processo de purificação de intimina, foi incubada com fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-intimina, seguida da reação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. **1.** Marcador de Peso Molecular (PM); **2.** Extrato das frações protéicas após purificação.

4.2.2 Análise da expressão da bundlina (BfpA)

A proteína bundlina (BfpA) purificada foi analisada por *immunoblotting* utilizando-se o soro policlonal de coelho anti-BfpA (NARA *et al.*, 2010). Observa-se na **figura 14** (canaleta 2) um componente de massa molecular aparente de 20 kDa correspondente a molécula de BfpA.

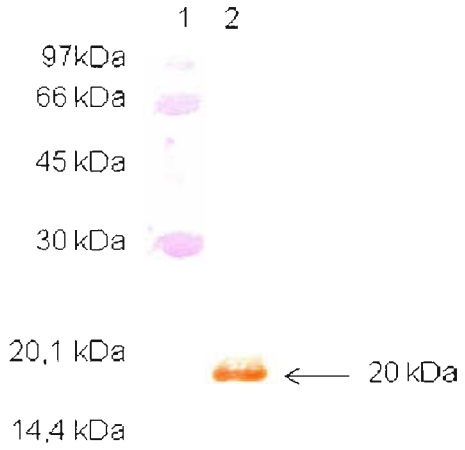

Figura 14. Identificação da proteína do BfpA com soro de coelho anti-BfpA. Membrana de nitrocelulose contendo as frações proteicas do BfpA purificado, foi incubada com soro de coelho anti-BfpA seguida de soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. **1.** Marcador de Peso Molecular (PM); **2.** Proteína BfpA.

4.3 Análise da viabilidade dos macrófagos derivados de medula de camundongo C_3H/HeJ após estímulo com intimina e BfpA.

Inicialmente foi avaliado se o tratamento com as duas maiores concentrações de intimina e BfpA (5 e 10 µg/mL) teria efeito citotóxico sobre as culturas de macrófagos derivados de medula óssea de camundongo C_3H/HeJ. Para esta análise utilizou-se o teste de viabilidade por MTT.

Observa-se na **figura 15** que os grupos tratados ou não com intimina ou BfpA, independente da concentração de proteína utilizada, tiveram os mesmos níveis de absorbância. Sugerindo que estas proteínas não induziram citotoxicidade e as células estavam viáveis. Outro controle realizado foi a concentração de células utilizadas por poço, todos os grupos, tratados ou não apresentaram homogeneidade em sua absorbância. A coloração com MTT se dá em função da solubilização dos cristais de formazan pela enzima desidrogenase mitocondrial presente apenas em células viáveis, o que foi comprovado uma vez que as culturas tratadas com 0,1% de Triton X-100 apresentaram 100% de citotoxicidade.

Decidiu-se utilizar a linhagem de camundongos C_3H/HeJ nos ensaios por serem considerados hiporespondedores ao LPS devido a mutação no gene *Tlr4*^{lps} afetando o domínio citoplasmático do receptor TLR4 e, impedindo a transdução de sinais intracelulares (POLTORAK *et al.*, 1998). Assim, facilitando a interpretação do papel de intimina e BfpA. Os macrófagos derivados de medula óssea serão denominados apenas de macrófagos (Mϕ) neste trabalho.

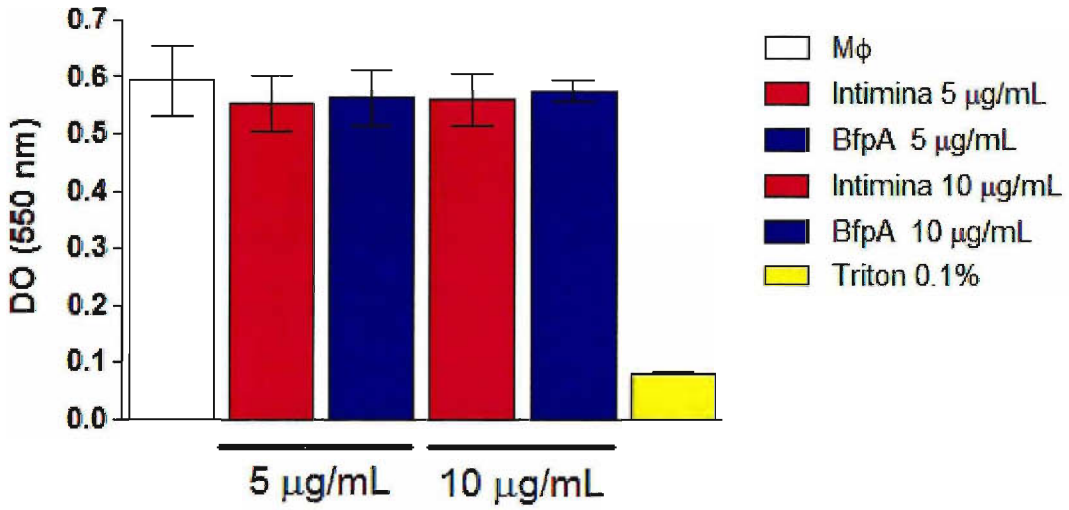

Figura 15. Viabilidade de macrófagos de camundongos C_3H/HeJ. Mϕ (6 x 10^5 células) foram estimuladas por 20 h com intimina e BfpA (5 e 10 µg/mL). Para controle de citotoxicidade foi usado 0,1% de Triton X-100. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT.

4.4 Ação da intimina e BfpA sobre macrófagos de camundongos C_3H/HeJ

4.4.1 Produção de TNF-α

A **figura 16** mostra a produção de TNF-α em resposta a diferentes concentrações de intimina (A) e BfpA (B) onde observou-se que todas as concentrações de intimina e BfpA (0,5-10 µg/mL) induziram a síntese de TNF-α de maneira dose dependente. Os valores médios obtidos para intimina foram de 46,02 a 1110,79 pg/mL e para BfpA de 102,66 a 1383,47 pg/mL, todos estatisticamente significantes e superiores ao nível basal onde encontramos 27,83 pg/mL. A diferença foi significativa quando comparou-se o grupo que recebeu 0,5 µg/mL de intimina com aqueles que não foram estimulados ($p<0,05$). Entretanto, a produção

de TNF-α foi mais significativa, quando comparamos os grupos que receberam 1, 5 e 10 µg/mL de intimina com aqueles que não foram estimulados (p<0,0001). As culturas estimuladas com 0,5; 1; 5; 10 µg/mL de BfpA mostraram diferença significativa em relação ao grupo controle, para todos os grupos, independente da concentração de proteína utilizada (p<0,0001).

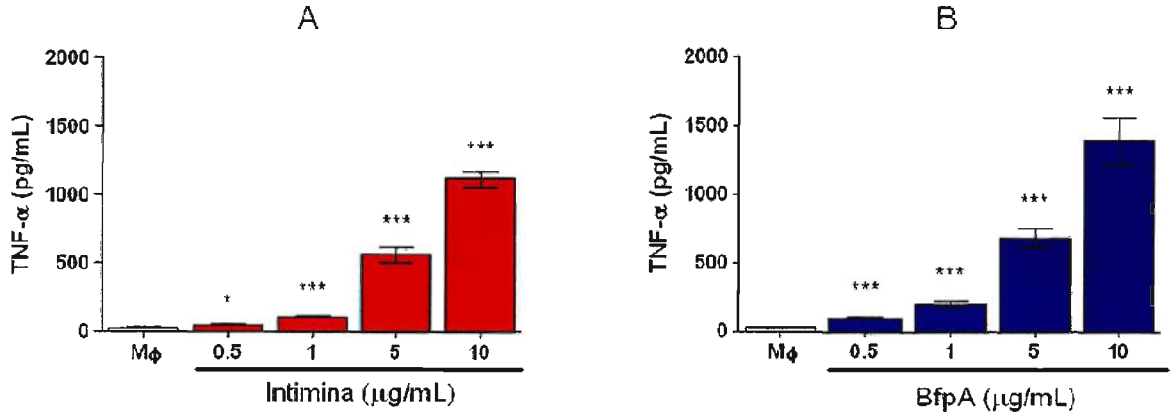

Figura 16. Detecção da produção de TNF-α em resposta ao estímulo com intimina ou BfpA. Mϕ (6 x 10^5 células) foram estimulados por 20 horas com 0,5; 1; 5 e 10 µg/mL de intimina (A) ou BfpA (B). A síntese de TNF-α foi analisada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Dados representam a média ± SEM de três a quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores *p<0,05, **p< 0.001 ou ***p< 0.0001 foram considerados significantes.

4.4.2 Produção de IL-6

A análise da secreção de IL-6 pode ser vista na **figura 17** e observa-se que para intimina, a síntese de IL-6 ficou entre 127 - 4621 pg/mL enquanto que para BfpA entre 469 - 3943 pg/mL, sendo a produção superior ao nível basal onde detectou-se 66 pg/mL de IL-6. A produção de IL-6 em resposta ao estímulo com 0,5 e 1 µg/mL de BfpA foi semelhante sendo respectivamente 469 e 488 pg/mL, para 5 e 10 µg/mL de BfpA foi produzido 1677 e 3943 pg/mL respectivamente.

Pela análise estatística quando comparou-se o grupo que não recebeu estímulo com os tratados com 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL de intimina os valores foram significativos apenas para os estímulos de 1, 5 e 10 µg/mL (p<0,0001). A mesma avaliação estatística entre os grupos estimulados com 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL de BfpA com os macrófagos não estimulados mostrou-se significante (p<0,0001). Estes

dados confirmam a capacidade destes fatores de virulência de EPEC na indução da ativação de macrófagos.

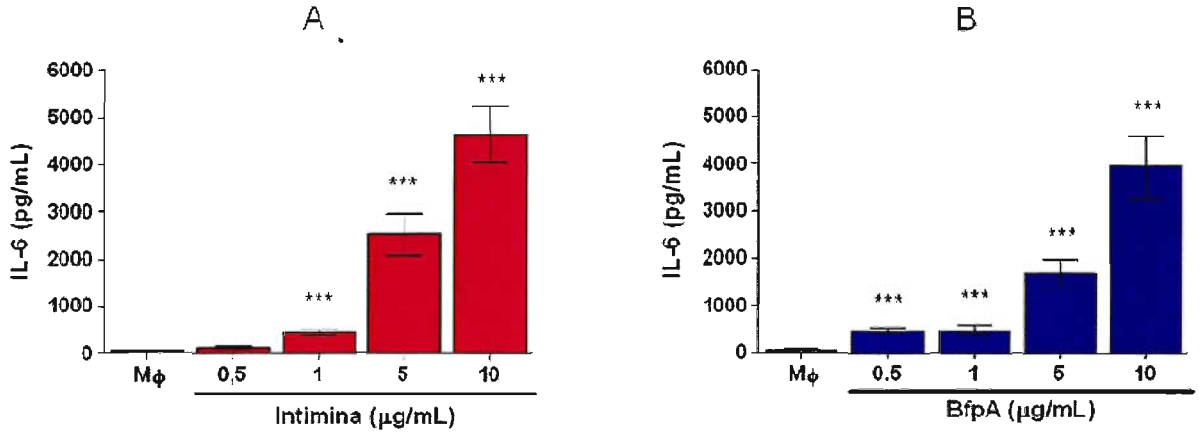

Figura 17. Detecção da produção de IL-6 em resposta ao estímulo com intimina ou BfpA. Mϕ (6 x 10^5 células) foram estimulados por 20 h com 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL de intimina (A) ou BfpA (B). A produção de IL-6 foi avaliada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Dados representam a média ± SEM de três a quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores ***p< 0.0001 foram considerados significantes.

4.4.3 Produção de IL-12 p40

Inicialmente avaliou-se a presença da subunidade p40 em nosso modelo pela maior facilidade de detecção. A adição de intimina ou de BfpA (0,5, 1, 5 e 10 µg/mL) às culturas de macrófagos estimulou a produção de IL-12p40 (**figura 18**) mostrando um caráter dependente de concentração para ambas proteínas a partir de 1 µg/mL. Em média, a produção de IL-12 induzida pelo estímulo com intimina foi entre 413 a 4395 pg/mL e para BfpA entre 734 a 4799 pg/mL, enquanto os macrófagos controles que não receberam tratamento produziram 362 pg/mL. Ao se comparar o grupo tratado com intimina e o grupo controle não tratado, observaram-se valores estatisticamente significativos apenas para os estímulos com 1, 5 e 10 µg/mL (p<0,0001).

No estímulo com BfpA houve semelhança no nível de IL-12p40 com 0,5 µg/mL e 1,0 µg/mL com concentração dessa citocina de 733 e 793 pg/mL respectivamente. Células estimuladas com 5 e 10 µg/mL desta proteína produziram

respectivamente 3105 e 4799 pg/mL. A análise estatística mostrou que houve diferença entre os grupos tratados com BfpA e grupos controles não tratados independente da concentração de proteína utilizada nos ensaios ($p<0,0001$). Isto mostra que os fatores de virulência intimina e BfpA podem estimular a produção de IL-12p40, citocina fundamental para a ligação da imunidade inata e adaptativa.

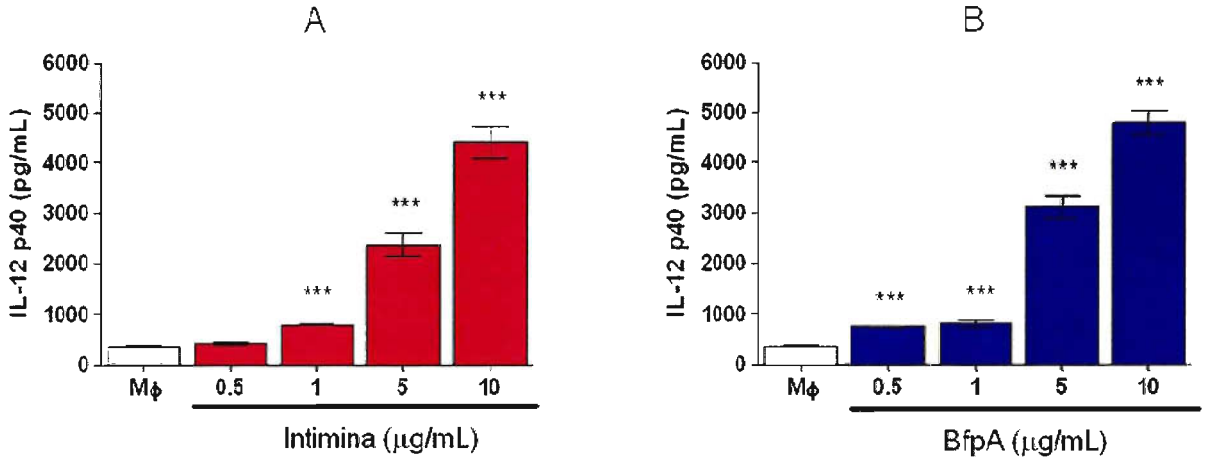

Figura 18. Detecção da síntese de IL-12p40 em resposta ao estímulo com intimina ou BfpA. Mϕ (6 x 10^5 células) foram estimulados por 20 h com 0,5, 1, 5 e 10 μg/mL de intimina (A) ou BfpA (B). A produção de IL-12p40 foi avaliada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de três a quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores ***$p< 0.001$ foram considerados significantes.

4.4.4 Produção de IL-1β

Ao analisar-se a capacidade da intimina e BfpA de estimularem a síntese de IL-1β notou-se que nenhuma das concentrações utilizadas foi capaz de induzir a síntese desta citocina. Os valores obtidos foram inferiores ao limite de detecção da curva padrão que foi de 7 pg/mL. Não se detectou problema com o *kit* utilizado uma vez que a curva padrão e controle positivo usando macrófagos derivados de medula óssea de camundongo C57BL/06 estimuladas com 1 μg/mL de LPS de *E. coli* induziu a produção média de 13,64 pg/mL deste mediador.

4.4.5 Produção de IL-10

Na **figura 19** observa-se que apenas as concentrações de 5 e 10 µg/mL de intimina e BfpA, estimularam a síntese de IL-10 pelos macrófagos, sendo esta dose dependente. Macrófagos estimulados com 5 µg/mL de intimina ou de BfpA produziram respectivamente 348 e 288 pg/mL de IL-10, enquanto o estímulo com 10 µg/mL de intimina induziu a síntese de 814 pg/mL em comparação a 747 pg/mL após estímulo com 10 µg/mL BfpA. As células controle não estimuladas produziram 66,2 pg/mL. Observou-se que a ativação com 10 µg/mL de intimina mostrou-se mais potente na indução da síntese de IL-10 em relação a mesma dose de BfpA.

Houve diferença estatística entre os grupos não estimulados com aqueles que receberam 5 e 10 µg/mL de intimina ou BfpA ($p<0,0001$). Estes dados mostram que se estes fatores de virulência forem produzidos em quantidades superiores a 5 µg/mL podem exercer atividade anti-inflamatória a fim de controlar o processo inflamatório estabelecido inicialmente durante a infecção por EPEC.

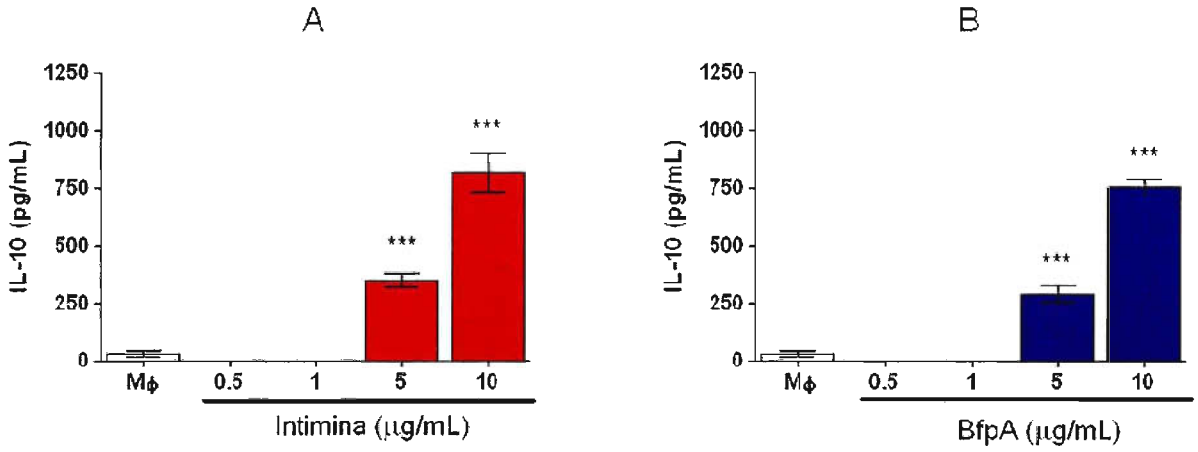

Figura 19. Detecção da produção de IL-10. Mϕ (6 x10^6 células) foram estimulados por 20 horas com 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL de intimina (A) ou BfpA (B). A produção de IL-10 foi avaliada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de três a quatro experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores ***$p< 0.0001$ foram considerados significantes.

4.4.6 Produção de MCP-1

A detecção da síntese da quimiocina MCP-1 pode ser vista na **figura 20** e observa-se que tanto a intimina como BfpA nas diferentes concentrações testadas (1 - 10 µg/mL) induziram a produção deste fator quimiotático. Os valores médios de MCP-1 obtido durante a ativação dos macrófagos com intimina foi entre 774 a 6796 pg/mL enquanto para BfpA foi de 1014 a 7865 pg/mL. Células não ativadas produziram em média 520 pg/mL. Houve diferença significante quando se comparou as células não tratadas com os grupos que receberam 0,5 µg/mL de intimina ($p<0,05$), enquanto para o tratamento com 1, 5 e 10 µg/mL de intimina essa diferença foi maior ($p<0,0001$).

Para os estímulos com 0,5 µg/mL de BfpA a significância entre grupo controle e experimental foi de $p<0,001$ enquanto para todas as demais concentrações foi de $p<0,0001$.

Os dados obtidos mostram que os fatores de virulência de EPEC intimina e BfpA podem contribuir para o processo inflamatório induzindo a produção de quimiocina MCP-1, podendo influenciar na migração de células e liberação de mediadores inflamatórios para o local do processo inflamatório.

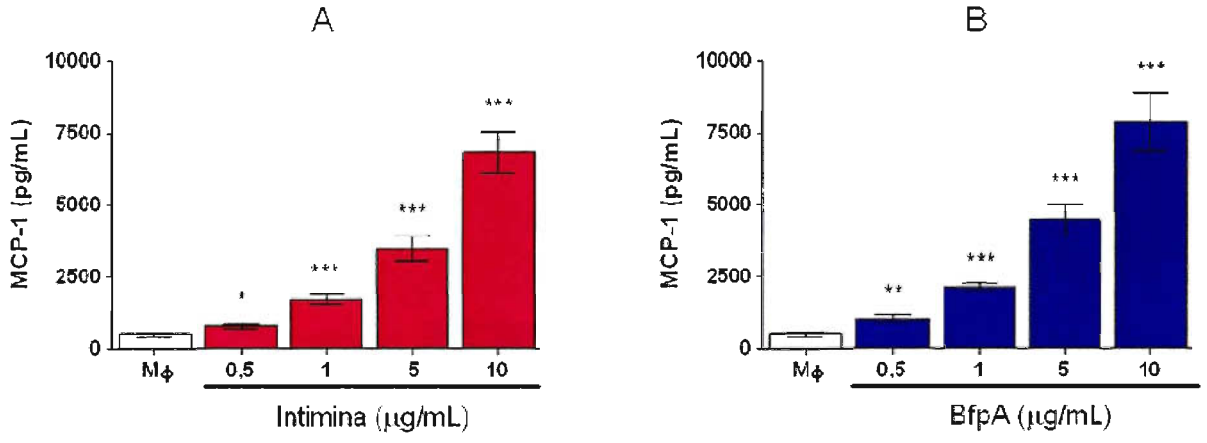

Figura 20. Detecção da produção da quimiocina MCP-1. Mϕ (6 x10^6 células) foram estimulados por 20 horas com 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL de intimina (A) ou BfpA (B). A produção de MCP-1 foi avaliada no sobrenadante das culturas pelo ensaio de ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de um experimento realizado em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores *$p<0,05$, **$p< 0.001$ ou ***$p< 0.0001$ foram considerados significantes.

4.5 Investigando o efeito da combinação de intimina e BfpA na ativação de macrófagos de camundongos C_3H/HeJ

4.5.1 Produção de TNF-α

Avaliou-se em seguida se a presença concomitante de intimina e BfpA modificaria o estímulo dos macrófagos anteriormente encontrada. Notou-se que apenas 10 µg/mL de intimina ou BfpA induziu a produção de níveis semelhantes de TNF, sendo 1110 pg/mL com intimina e 1383 pg/mL com BfpA, não havendo diferença estatística significante entre estes grupos.

A adição exógena de intimina + BfpA não promoveu aumento significativo na síntese de TNF-α sendo detectado 1523 pg/mL desta citocina, valor próximo ao obtido no tratamento com as proteínas individuais (**figura 21**). Não se observou diferença significativa entre os grupos que receberam o tratamento individual com aqueles onde as proteínas foram combinadas.

Os resultados mostram que a presença simultânea dos dois fatores de virulência não tem ação sinérgica sobre a ativação dos macrófagos quanto a indução da síntese de TNF-α.

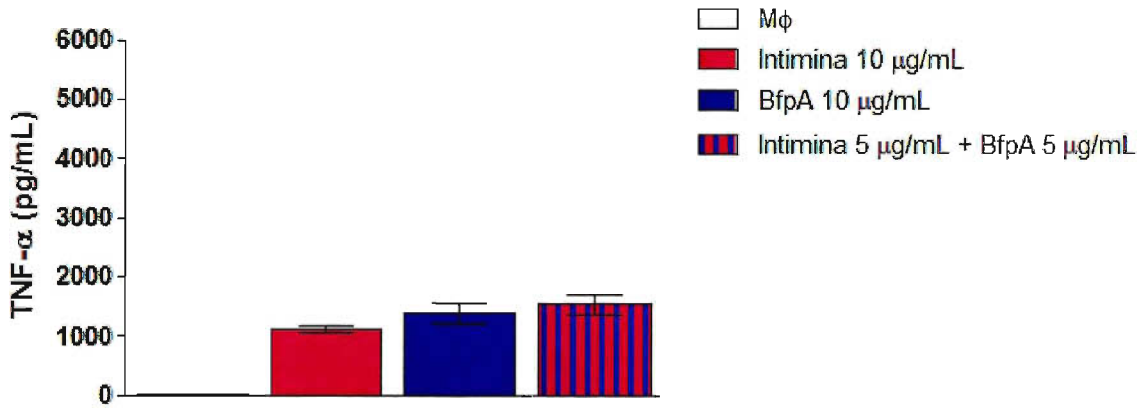

Figura 21. Detecção da síntese de TNF-α. Mϕ (6 x10^5 células) foram estimulados com intimina (10 µg/mL), BfpA (10 µg/mL) ou intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL) simultaneamente. Após 20 h o sobrenadante foi obtido para dosagem de TNF-α por ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student.

4.5.2 Produção de IL-6

Em seguida a mesma abordagem foi utilizada para determinar a produção de IL-6. A **figura 22** mostra que o tratamento dos macrófagos individualmente com 10 µg/mL de intimina ou de BfpA estimulou níveis semelhante de IL-6, sendo 4621 pg/mL e 3943 pg/mL de citocina respectivamente, não havendo diferença estatística entre estes grupos. O mesmo ocorreu quando se comparou o estímulo com intimina e a adição simultânea de intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL) sendo produzido 5641 pg/mL de IL-6. No entanto notou-se pequena diferença significativa ($p<0,05$) quando se comparou o grupo tratado com BfpA e o efeito somatório das duas proteínas.

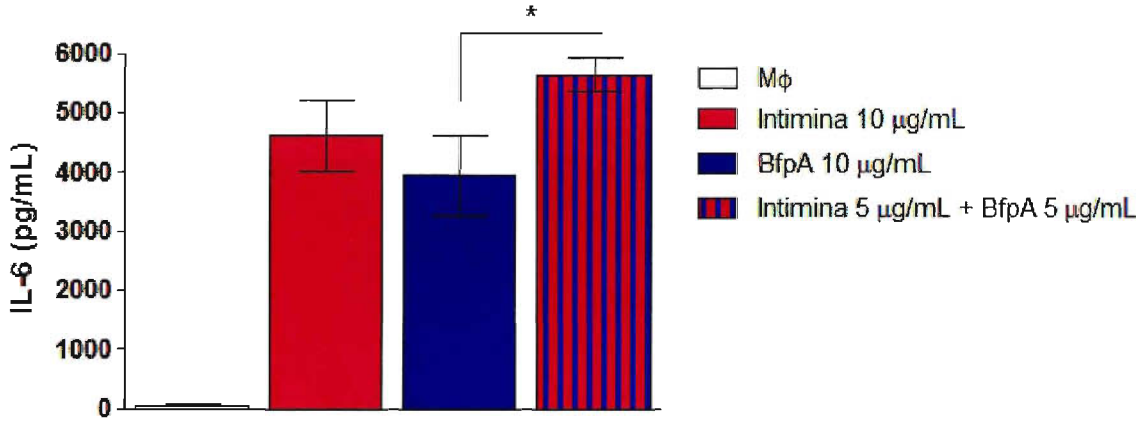

Figura 22. Detecção da síntese de IL-6. Mϕ (6 x10^5 células) foram estimulados com intimina (10 µg/mL), BfpA (10 µg/mL) ou intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL). Após 20 h o sobrenadante foi obtido para dosagem de IL-6 por ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores *$p< 0,05$ foram considerados significantes.

4.5.3 Produção de IL-12p40

A **figura 23** mostra que o nível de IL-12p40 produzido após a ativação dos macrófagos apenas com intimina ou BfpA (10 µg/mL) foi de 4395 pg/mL e 4799 pg/mL respectivamente. A adição de intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL) induziu a produção de 4430 pg/mL, não modificando os dados obtidos no tratamento com as proteínas individuais. Os dados mostram que a ativação de macrófagos

simultaneamente com os dois fatores de virulência não potencializou a síntese de IL-12p40 no início da resposta imune inata.

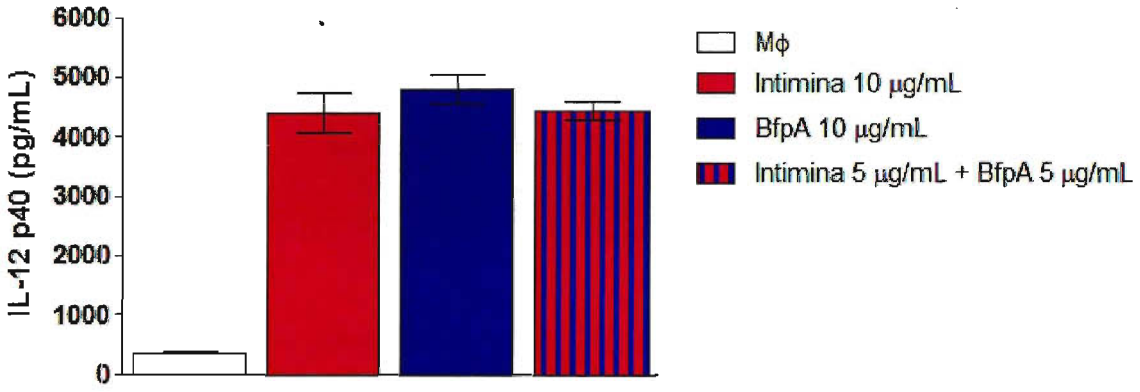

Figura 23. Detecção da síntese de IL-12p40. Mϕ (6 x10^5 células) foram estimulados com intimina (10 µg/mL), BfpA (10 µg/mL) ou intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL). Após 20 h o sobrenadante foi obtido para dosagem de IL-12p40 por ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student.

4.5.4 Produção de IL-10

Os dados obtidos após a ativação dos macrófagos com 10 µg/mL de intimina ou de BfpA mostraram que a síntese de IL-10 foi de 814 pg/mL e 747 pg/mL respectivamente, não havendo diferença estatística significativa entre estes dois estímulos. Já, após a associação intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL), houve aumento do mediador antiinflamatório IL-10 sendo produzido 1218 pg/mL desta citocina. Houve diferença significativa ao comparar-se a associação das duas proteínas com os estímulos individuais de intimina ($p<0,05$) e de BfpA ($p<0,001$) (**figura 24**). Isto sugere que durante uma infecção por EPEC a produção de IL-10 dependente da concentração dos fatores de virulência presentes no local no momento da infecção.

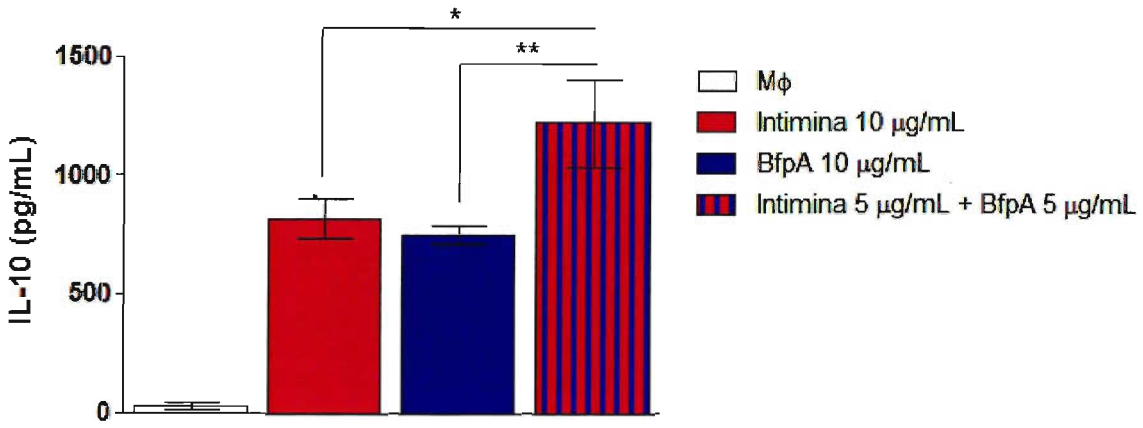

Figura 24. Detecção da produção de IL-10. Mϕ (6 x 10^5 células) foram estimulados com intimina (10 µg/mL), BfpA (10 µg/mL) ou intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL). Após 20 h o sobrenadante foi obtido para dosagem de IL-10 por ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores *p<0,05 e **p< 0.001 foram considerados significantes.

4.5.5 Produção de MCP-1

Os resultados da **figura 25** mostram que intimina e BfpA na concentração de 10 µg/mL induziram níveis semelhantes da quimiocina MCP-1 sendo de 6796 pg/mL e 7864 pg/mL respectivamente, não havendo diferença significante entre estes grupos. Quando se associou intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL) a produção desta quimiocina foi semelhante ao estímulo individual com intimina ou BfpA sendo produzido 6746 pg/mL de MCP-1. Isto significa que a combinação destes dois fatores de virulência não exerce efeito diferenciado na síntese desta quimiocina.

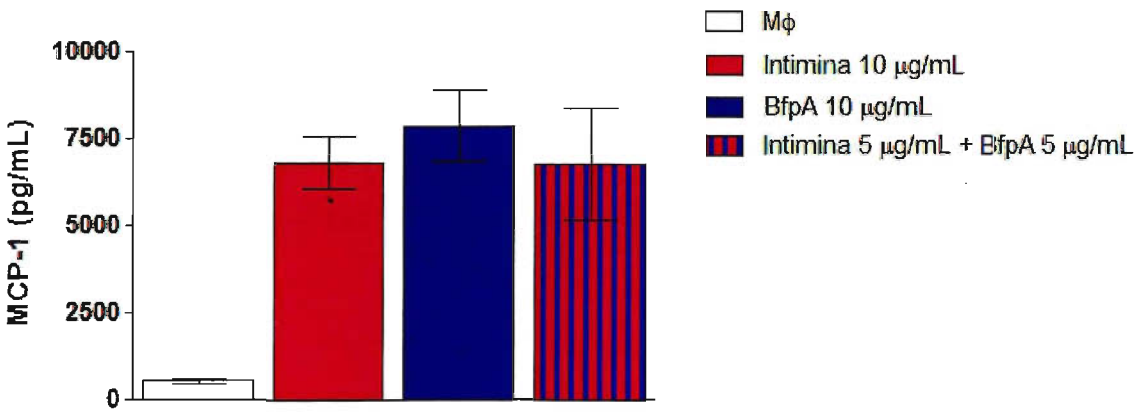

Figura 25. Detecção da síntese de quimiocina MCP-1. Mϕ (6 x10^5 células) foram estimulados com intimina (10 µg/mL), BfpA (10 µg/mL) ou intimina + BfpA (5 µg/mL + 5 µg/mL). Após 20 h o sobrenadante foi obtido para dosagem de MCP-1 por ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student.

4.6 Resposta dos macrófagos da linhagem J774 ao estímulo com LPS na presença de polimixina B ou proteinase K

A linhagem de macrófagos J774 é originária de camundongos Balb/c e responde a baixas concentrações de LPS, em função disto, essa foi utilizada como modelo para avaliar a participação do LPS de *E. coli* na resposta induzida pelas proteínas recombinantes intimina e BfpA.

Para estabelecer o modelo utilizou-se 100 ng/mL de LPS associado ou não a polimixina B (30 µg/mL) ou proteinase K (50 µg/mL) e determinou-se a presença de TNF-α, uma das principais citocinas geradas pela presença do LPS e que contribui para os danos provocados durante o processo de sepse.

A **figura 26A** mostra que 100 ng/mL de LPS estimularam acentuada produção de TNF-α o que correspondeu a 5665 pg/mL e o grupo não estimulado que produziu 63 pg/ml ($p < 0,0001$). A incubação do LPS com polimixina B promoveu redução drástica na síntese de TNF-α tendo sido detectado 226 pg/mL e altamente significante em relação ao grupo que recebeu apenas LPS ($p < 0,0001$). Ao contrário do observado anteriormente, na **figura 26B**, a incubação de 100 ng de LPS com proteinase K manteve a capacidade deste mediador em estimular as células J774 e induzir a produção de grande quantidade de TNF-α o que correspondeu a 4728 pg/mL de citocina comparado a 5665 pg/mL induzido apenas por LPS. Confirmando

que a polimixina B de fato bloqueia os efeitos biológicos do LPS e que a proteinase K apenas quebra as ligações peptídicas entre os aminoácidos de uma proteína.

Estes resultados mostram que este sistema pode ser utilizado como alternativa para investigar a participação do LPS na resposta induzida pelas proteínas recombinates de EPEC intimina e BfpA, uma vez que reproduz o descrito na literatura.

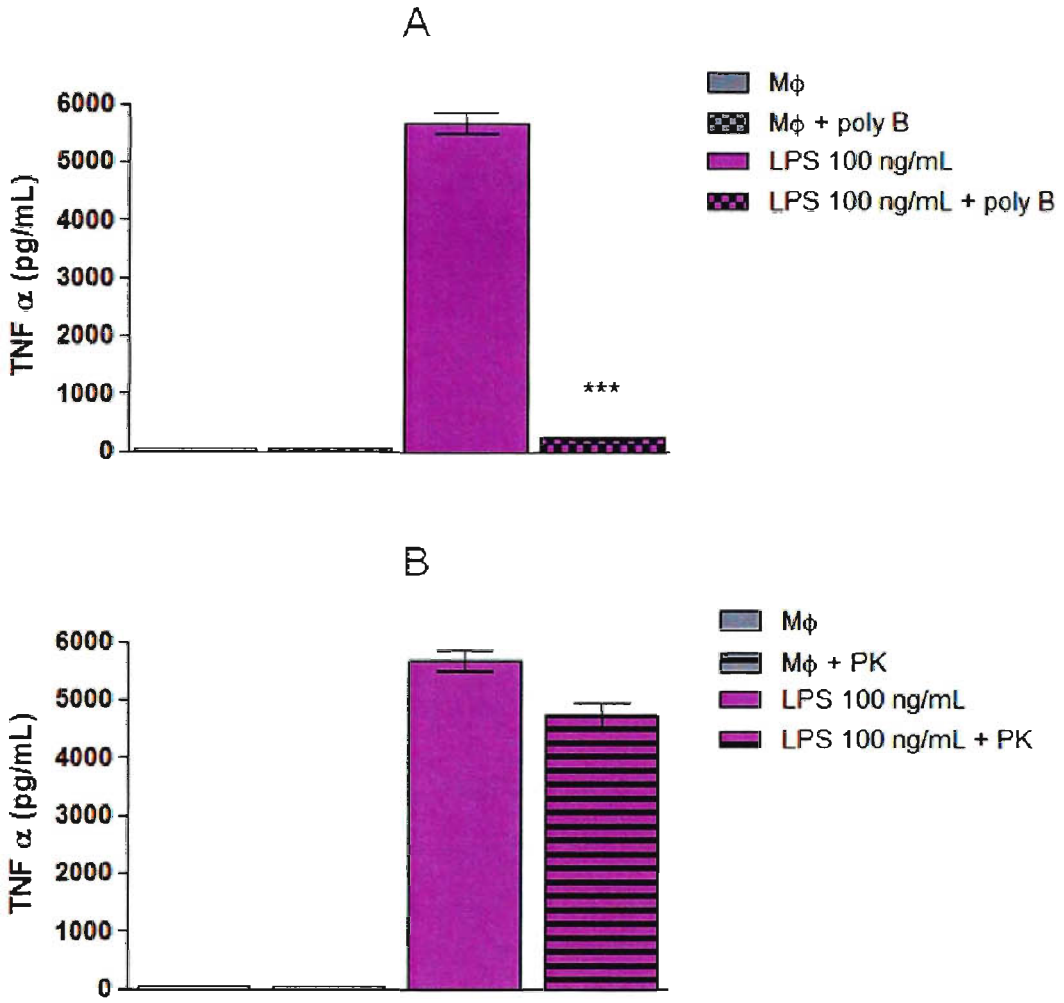

Figura 26. Detecção da resposta dos macrófagos da linhagem J774 ao LPS após tratamento com polimixina B e proteinase K. Mϕ J774 (6 x10^5 células) foram estimulados por 20 h com LPS (100 ng/mL) na presença ou ausência de polimixina B, 30 µg/mL (A) ou proteinase K, 50 µg/mL. O sobrenadante foi obtido para dosagem de TNF-α pelo ensaio com ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde o valor ***$p < 0.0001$ foi considerado significante.

4.7 Participação do LPS de *E. coli* na resposta induzida por intimina e BfpA

4.7.1 Tratamento com polimixina B

Uma das preocupações com o uso de proteinas recombinantes é a presença de traços de LPS, o que pode mascarar a resposta provocada pelas proteínas obtidas. Em função disto usou-se o sistema citado no item anterior com polimixina B e proteinase K para testar a especificidade da resposta das proteinas de EPEC intimina e BfpA.

Ao analisar-se a influência do pré-tratamento da intimina e BfpA com polimixina B (**figura 27 A e B**) observou-se que os macrófagos da linhagem J774 produziram grande quantidade de TNF-α após estímulo com 1, 5 e 10 µg/mL de intimina ou BfpA, sendo encontrado 155, 718 e 1529 pg/mL respectivamente de TNF-α no estímulo com intimina e 322, 900 e 1831 pg/mL após ativação com BfpA nas mesmas condições, sendo o efeito dose dependente, todos com valores significantes em relação ao grupo não tratado ou tratado apenas com polimixina B ($p < 0,0001$).

A especificidade da resposta para intimina e BfpA foi testada estimulando-se os macrófagos desta linhagem com outra proteína não relacionada, 10 µg/mL de albumina de soro bovino (BSA), o que representa a máxima concentração de proteína recombinante dos ensaios. Neste ensaio avaliou-se a produção de TNF-α e notou-se que BSA não estimulou a produção desta citocina (89 pg/mL), valor próximo ao obtido com as células não estimuladas que sintetizaram 63 pg/mL de TNF-α. Estes dados comprovam que intimina e BfpA apresentam uma resposta específica na síntese de TNF-α.

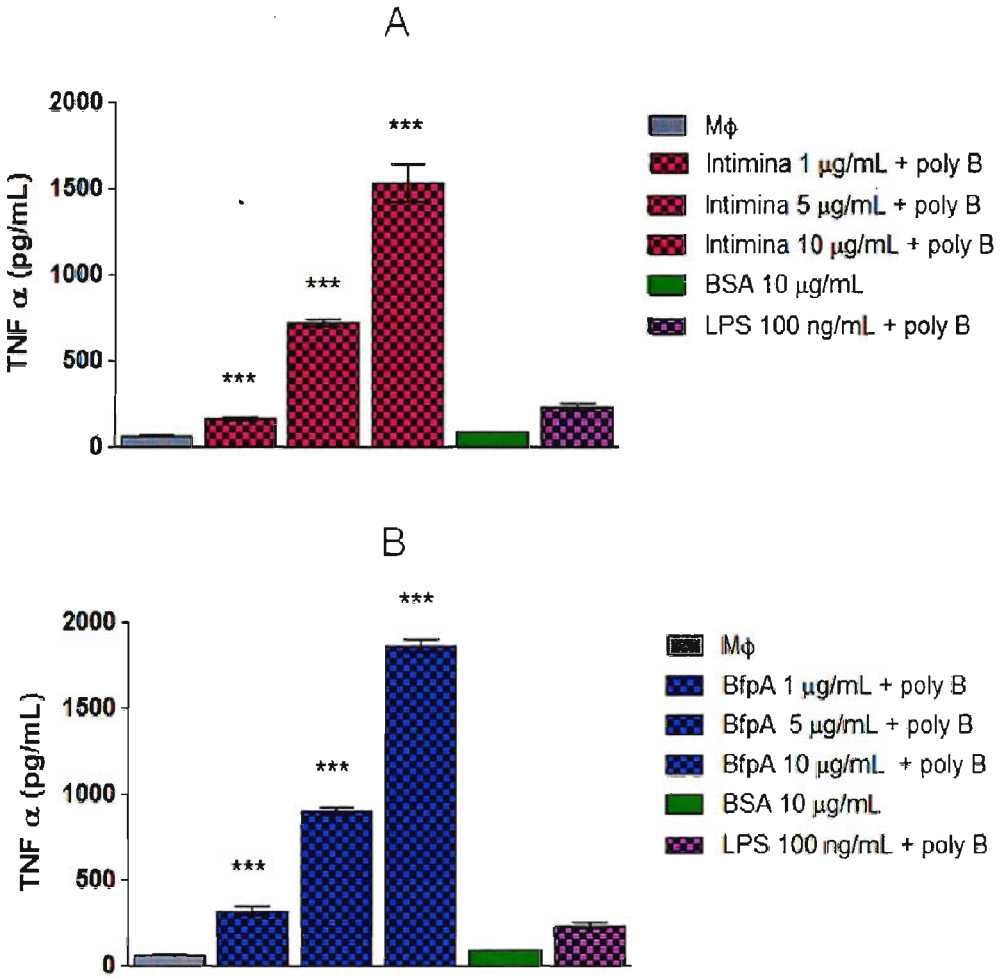

Figura 27. Detecção da produção de TNF-α por macrófagos de linhagem J774 após estímulo com intimina e BfpA pre-tratadas com polimixina B ou BSA. Mϕ J774 (6 x 10^5 células) foram estimulados por 20 h com 1, 5 e 10 µg/mL de intimina (A) ou BfpA (B) pré tratados com polimixina B, 30 µg/mL (POLYB). O sobrenadante foi obtido para dosagem de TNF-α pelo ensaio de ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores ***$p < 0.0001$ foram considerados significantes.

4.7.2 Tratamento com proteinase K

Ao avaliar-se a influência do tratamento da intimina e BfpA com proteinase K (PK), **figura 28 A** notou-se que a produção de TNF-α para intimina (1, 5 e 10 µg/mL), antes do tratamento foi de 443,27, 3228,6 e 6589,5 pg/mL de TNF-α respectivamente, sendo inibida pelo tratamento com proteinase K. Após este

tratamento encontrou-se 98, 115 e 130 pg/mL ($p<0,0001$). Estes valores foram próximos ao obtido com as células não tratadas.

O tratamento de BfpA (1, 5 e 10 µg/mL) com proteinase K (**figura 28 B**) teve o mesmo comportamento descrito para intimina. A alta produção de TNF-α antes do tratamento com proteinase K que correspondeu a 671, 3888 e 6793 pg/mL respectivamente da citocina, foi reduzido a 109, 116 e 122 pg/mL de TNF-α ($p<0,0001$), sendo estes valores próximos ao encontrado nos controles em tratamento. Estes dados diferem do obtido com LPS (100 ng/mL) após tratamento com proteinas K onde não houve redução significativa na produção de TNF-α.

Desta forma estes dados comprovam a natureza proteíca do estímulo responsável pela ativação dos macrófagos e produção de TNF-α, mediado pelas proteinas recombinantes intimina e BfpA cuja atividade foi degradada por proteínase K ocasionando a inibição da síntese desta citocina.

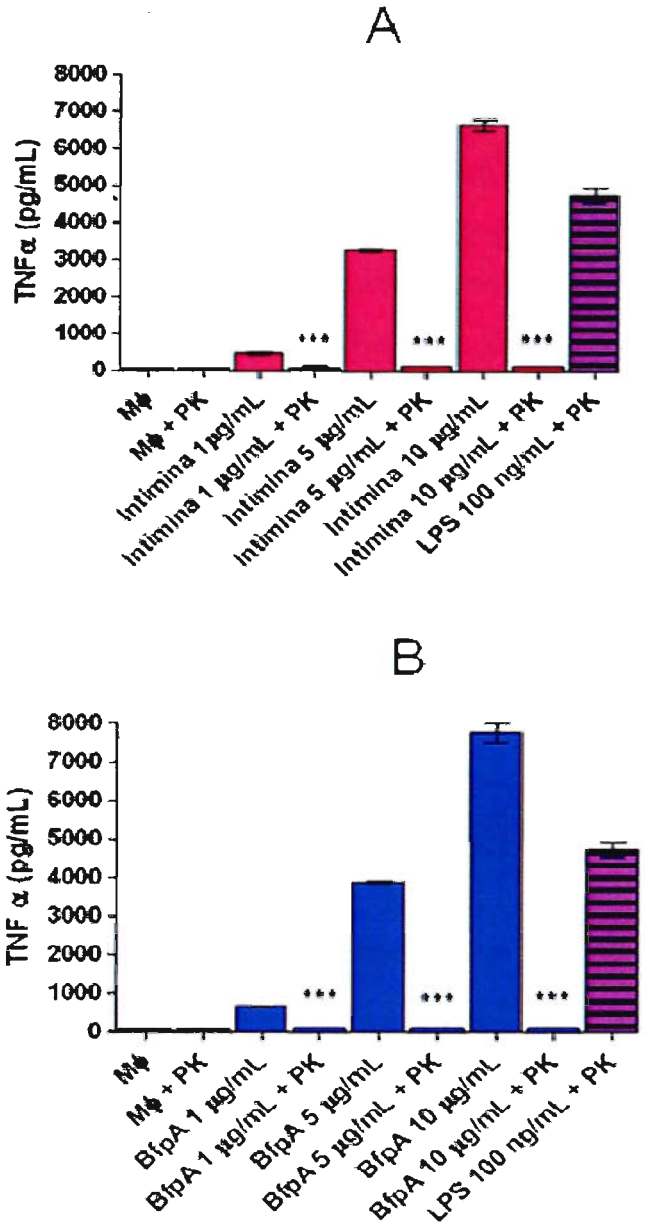

Figura 28. Detecção da produção de TNF-α por macrófagos de linhagem J774 após estímulo com intimina e BfpA pré-tratados com proteinase K. Mϕ J774 (6 x 10^5 células) foram estimulados por 20 h com 1, 5 e 10 µg/mL de intimina 3β (A) ou BfpA (B) pré-trados ou não com proteinase K (PK), 50 µg/mL. O sobrenadante foi obtido para dosagem de TNF-α pelo ensaio de ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste *t* de Student onde os valores ***$p < 0.0001$ foram considerados significantes.

4.8 Análise comparativa da produção de TNF-α por macrófagos de camundongo C_3H/HeJ e de linhagem J774

Camundongos C_3H/HeJ (tlr4 $^{-/-}$) possuem alteração no gene para TLR4 tornando-os deficientes na resposta para LPS. Ao contrário, macrófagos da linhagem J774 são bons respondedores para LPS conforme mencionado anteriormente. Analisou-se a possível utilização do receptor TLR4 pelas proteínas recombinantes intimina e BfpA, comparando a produção de TNF-α nestes dois modelos que diferem na sensibilidade a endotoxina. Neste ensaio comparou-se macrófagos medulares de camundongos C_3H/HeJ estimulados com as proteínas recombinantes (1, 5 e 10 µg/mL) com as células J774 estimuladas com as proteínas recombinantes pré-tratadas com polimixina B.

Observou-se que macrófagos J774 estimulados com intimina ou com BfpA tratadas com polimixina B induziram o mesmo padrão de resposta imune para TNF-α encontrado com os macrófagos de camundongos C_3H/HeJ, estimulados com as proteínas sem tratamento. Os níveis de TNF-α detectados foram muito próximos entre os modelos (**figura 29 A e B**).

Os valores médios de TNF-α obtidos em macrófagos de camundongo C_3H/HeJ foram entre 109 a 1110 pg/mL para intimina e entre 183 a 1383 pg/mL para BfpA. A produção de TNF-α foi superior ao nível basal (27,83 pg/mL) e estatisticamente significante ($p<0,0001$).

Nos macrófagos da linhagem J774 os valores obtidos após tratamento com polimixina foram de 155 a 1529 pg/mL para intimina e entre 322 a 1832 pg/mL para BfpA. Observou-se que os valores encontrados foram próximos entre os dois modelos. Notou-se para todos os estímulos que houve diferença estatística significativa ao comparar os grupos estimulados com os controles não estimulados ($p<0,0001$) .

Os dados apresentados indicam que intimina e BfpA são capazes de ativar macrófagos durante a resposta imune inata, independente da ação direta sobre o receptor TLR4.

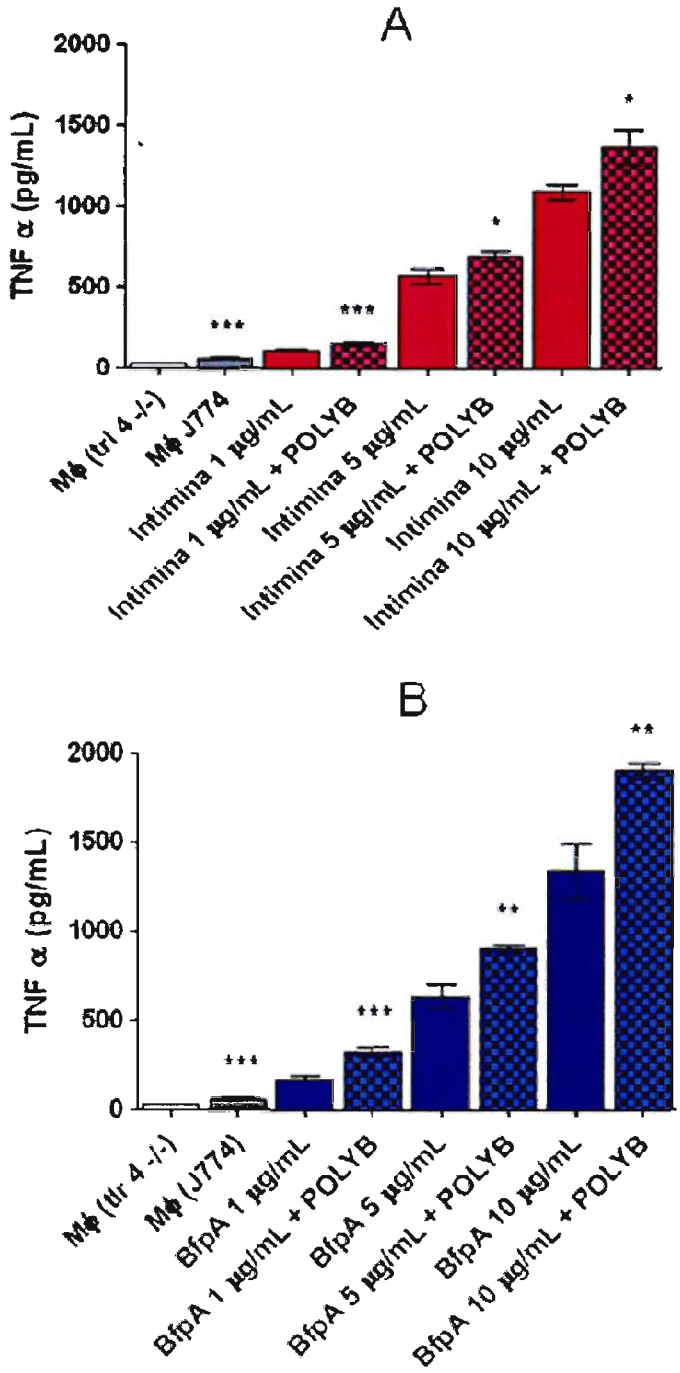

Figura 29. Detecção da produção de TNF-α por macrófagos de camundongos C_3H/HeJ comparado a linhagem J774 após estímulo com intimina e BfpA pré-tratados ou não com polimixina B. Mϕ (tlr4 $^{-/-}$) (6 x10^5 células) ou Mϕ J774 (6 x10^5 células) foram estimulados com intimina 3β (A) ou BfpA (B) pré-trados ou não com polimixina B, 30 µg/mL. O sobrenadante foi obtido após 20 horas para dosagem de TNF-α pelo ensaio de ELISA. Os resultados são representativos da média ± SEM de dois experimentos independentes, realizados em triplicata. Dados analisados pelo teste *t* de Student onde os valores *p<0,05, **p<0,001 ou ***p< 0.0001 foram considerados significativos.

4.9 Nível de sensibilidade dos macrófagos de camundongo C_3H/HeJ ao LPS

Durante os experimentos utilizou-se macrófagos derivados de medula óssea murina de camundongo C_3H/HeJ ($tlr4^{-/-}$) hiporesponsivo a LPS, para minimizar possíveis traços de LPS nas proteínas sintetizadas.

A máxima concentração de proteína utilizada nos experimentos foi 10 µg/mL isto correspondeu, pelo teste LAL entre 0,6 a 6,2 ng de endotoxina/µg de proteína (0,12 - 1,2 UE/µg de proteína) ou 6,25 a 62,5 ng/mL (1,25 - 12,5 UE/mL) em 10 µg/mL de proteína. Em função disto, testou-se a sensibilidade das células destes animais quanto a produção de TNF-α quando usamos 2,5; 5, 10 e 50ng/mL de LPS de *E. coli*.

Ao analisar-se a **figura 30** observou-se que apenas concentrações de LPS acima de 50 ng/mL (aproximadamente 10 UE) estimularam a produção de TNF-α (363 pg/mL) em níveis superiores ao basal (13 pg/mL). Quantidades de LPS inferiores não induziram significante liberação deste mediador, onde encontrou-se de 20 a 53 pg/mL, valores próximos ao basal celular.

Baseado nestes dados, apenas quando usou-se 10 µg/mL de intimina e BfpA poderia se ter algum efeito aditivo de LPS na liberação de TNF-α, considerando que o valor de 50 ng/mL de LPS corresponde a aproximadamente a maior concentração de endotoxina nas proteínas (62,5 ng/mL). Assim, a presença de LPS contribuiria no máximo com 1/4 da resposta de TNF-α induzida pela máxima dose de intimina e BfpA (10 µg/mL), nestas condições a resposta majoritaria seria devido as proteínas intimina e BfpA. Em concentrações de proteína recombinantes inferiores (0,5; 1 e 5 µg/mL de intimina e BfpA) os macrófagos desta linhagem já não respondem a traços de LPS sendo a liberação de TNF-α atribuída a ativação dos macrófagos por intimina e BfpA.

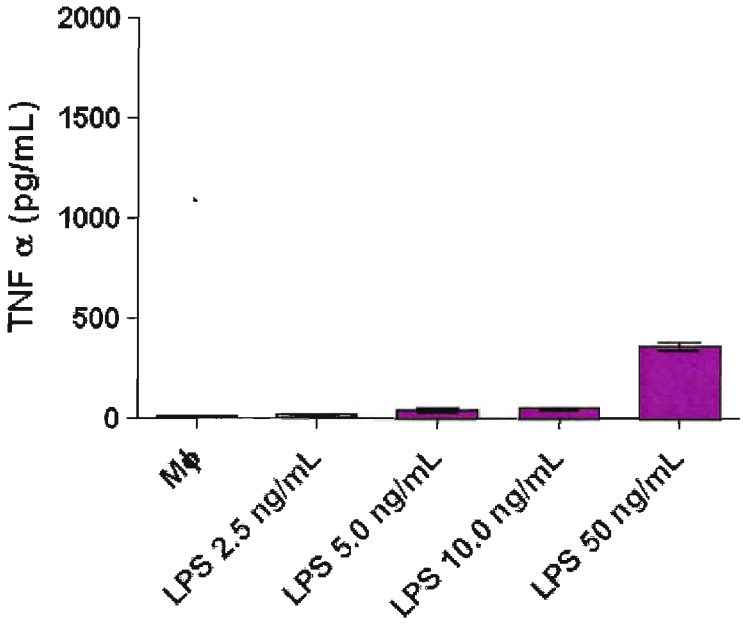

Figura 30. Detecção da sensibilidade dos macrófagos de camundongos C_3H/HeJ a baixas concentrações de LPS. Mϕ (6 x 10^5 células) foram estimulados com LPS de *E. coli* (2,5; 5; 10; 50 ng/mL). Após 20 horas o sobrenadante foi colhido para dosagem de TNF-α.

5. DISCUSSÃO

Na infecção por EPEC ocorre grave disfunção da barreira epitelial, e uma das consequências é a inflamação. Moon *et al.* (1983) ao avaliarem cortes histológicos do intestino de animais infectados por EPEC observaram intensa infiltração de células inflamatórias na lâmina própria, além da destruição da barreira epitelial. Na literatura, é bem descrito a interação entre as proteínas efetoras de EPEC com as células epiteliais e os processos iniciais da interação bactéria com a célula hospedeira. Entretanto, poucos estudos analisam a produção de citocinas em infecções por EPEC. Estes poucos dados estão relacionados principalmente a produção de IL-8 em cultura de linhagem celular. A análise das citocinas produzidas constitui uma parte importante da resposta imune e representa a tentativa do hospedeiro em lidar com determinado microrganismo (RAMIREZ *et al.*, 2005).

A resposta inata ocorre minutos após o contato e ativação das células por agentes estranhos e a extensão desta reação varia de acordo com o agente patogênico. A função efetora desta resposta se dá principalmente através das células fagocíticas e NK (*natural killer*) que produzem substâncias com atividade microbicida direta, além da síntese de citocinas e quimiocinas que recrutam células inflamatórias para o local da infecção e posteriormente orienta a resposta imune adaptativa.

Macrófagos teciduais são originários da medula óssea e durante o processo inflamatório são os principais responsáveis pelo controle da resposta imune local, definindo o perfil de resposta imune a ser desenvolvido.

Em função disto, este trabalho analisou a capacidade de dois fatores de virulência envolvidos na patogênese de EPEC, intimina e BfpA, em induzir a produção de mediadores inflamatórios após contato com macrófagos *in vitro*.

Macrófagos de camundongo C_3H/HeJ são hiporrespondedores ao LPS pelas alterações na expressão do receptor TLR4 presente na superfície das células. Isto torna este modelo importante para estudos onde se procura investigar o papel de proteínas na indução da resposta imune, pois, minimiza possíveis interferências de resíduos de LPS presente nas amostras de proteínas recombinantes. Desta forma, este modelo foi empregado para estudar o papel da intimina e BfpA na ativação de macrófagos *in vitro*.

Com o objetivo de analisar o potencial imune da intimina e do BfpA foi avaliado a capacidade dessas proteínas de estimularem a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-12), ou antiinflamatória (IL-10) e a quimiocina (MCP-1) e se o efeito encontrado na produção desses mediadores apresentaria uma relação dose dependente e, ainda, se a associação desses fatores de virulência induziria um efeito sinérgico. Além disto, foi analisado o possível envolvimento do LPS nesta ativação imune.

A ativação de mecanismos de imunidade inata tem papel fundamental no controle de infecções estando diretamente ligada à resposta imune adquirida desenvolvida pelo hospedeiro. Estas informações poderão servir de subsídio para tentar compreender o papel dessas proteínas na resposta imune gerada por EPEC.

Para o desenvolvimento do presente trabalho inicialmente foi confirmado se o clone bacteriano recombinante estava expressando a intimina 3β. Assim, foi realizado o sequenciamento do inserto. Confirmou-se que o clone pFL3β mostrou 99% de homologia entre a proteína recombinante e a proteína nativa de *Escherichia coli* O111:H-. Algumas alterações entre os aminoácidos, principalmente na região variável foram observadas, no entanto, essa variação de aminoácidos também ocorre na natureza, indicado pelos diferentes tipos e subtipos de intimina descritos. Portanto, a proteína utilizada nos experimentos de ativação de macrófagos foi a intimina 3β a qual, pode reproduzir *in vitro* a interação intimina-macrófago com maior homologia à molécula da intimina inteira que possui 939 aminoácidos e peso molecular de 94 kDa. A diferença entre a intimina 3β recombinante de aproximadamente 80 kDa e a intimina nativa seria a falta de 200 aminoácidos da região N-terminal (região periplasmática da bactéria) e 24 últimos aminoácidos da região C-terminal (região que se liga ao receptor Tir). Analisando a intimina 3β recombinante, pode-se afirmar que esta possui a sequência de aminoácidos da região externa da intimina nativa, que seria exatamente a sequência de aminoácidos que vai interagir com as células fagocíticas, o que está de acordo com os objetivos do trabalho.

A expressão das proteínas recombinantes foi confirmada por *immunoblotting,* evidenciando a presença da intimina (80 kDa) e do BfpA (20 kDa). Portanto, as proteínas de interesse, intimina e BfpA purificadas, estavam prontas para serem utilizadas na próxima etapa do trabalho.

Iniciou-se os ensaios verificando a toxicidade de intimina e BfpA para as células, por ensaio de viabilidade celular com MTT. Pela reprodutibilidade das DOs obtidas tanto com macrófagos estimulados ou não com as proteínas recombinantes confirmou-se que não houve variação no número de células utilizadas nos experimentos e que a intimina e o BfpA não foram tóxicas para os macrófagos. A funcionalidade do ensaio foi confirmada, pois houve 100% de lise das células quando estas foram tratadas com 0,1 % de Triton X-100.

Há na literatura poucos trabalhos que descrevem o efeito da intimina e do BfpA sobre a ativação de macrófagos, no que concerne a produção de mediadores inflamatórios. Estas células são fundamentais para o início dos mecanismos de defesa inata, já que estão localizadas logo abaixo da mucosa intestinal e são fundamentais na resolução do processo inflamatório, pois liberam mediadores imunes que promovem a migração celular para o foco inflamatório além de apresentarem antígenos para os linfócitos locais (SMITH *et al.*, 2011). Em função disto, foi escolhido como modelo de ativação *in vitro* a ser utilizado neste trabalho.

Mesmo não sendo o único fator secretado durante a reação inflamatória desenvolvida por EPEC, somente a IL-8 foi extensivamente estudada em cultura de células epiteliais (RAMIREZ *et al.*, 2005). Extendendo esta informação decidiu-se dosar algumas citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1, IL-6, e IL-12), antiinflamatória (IL-10) e a quimiocina (MCP-1), utilizando diversas concentrações de intimina e de BfpA (0,5 – 10 μg/mL), para definir a capacidade imunogênica destes dois fatores de virulência.

Os dados analisados mostraram que ambas as proteínas recombinantes estimularam a produção de mediadores pró-inflamatórios, TNF-α, IL-6 e IL-12 assim como IL-10 que é antiinflamatório, além de quimiocina MCP-1. Todos estes de maneira dose dependente. Entretanto, a síntese de IL-1β não foi detectada.

O receptor NOD-like (NLR) regula o processamento e secreção de IL-1β, por via dependente da ativação de caspase-1 (SUTTERWALA; FLAVELL, 2009). Macrófagos deficientes em NLR4 (membro da família NLR) infectados com *Salmonella typhimurium* apresentaram defeito na capacidade de ativar caspase-1 e consequentemente de secretar IL-1β e IL-18, mostrando-se mais suscetível à infecção (MARIATHASAN *et al.*, 2004; LARA-TEJERO *et al.*, 2006; SUTTERWALA; FLAVELL, 2009). Apesar de não se ter analisado a influência direta do receptor NLR, os dados obtidos sugerem que intimina e BfpA, por não induzirem a secreção

de IL-1β em macrófagos, podem não utilizar a via de sinalização por NLR. A ativação de caspase-1 não só controla a síntese de IL-1β como leva a apoptose celular. A ativação de macrófagos por intimina e BfpA não estimulou a síntese de IL-1β assim como não provocou morte celular, demonstrando que pode não ter ocorrido ativação desta via mediada pelo receptor NLR ou esta foi inibida, não permitindo que houvesse ativação da caspase-1.

Em infecções por *Pseudomonas aeruginosa*, foi comprovado que esta bactéria inibe a ativação de NLR usando este mecanismo para evasão da resposta imune. O fato da *P. aeruginosa* ter evoluído o mecanismo de inibição para NLR4 ao utilizar a molécula efetora ExoU para inibição da ativação de caspase-1, sugere que esta via pode ser importante para a defesa do hospedeiro contra infecções por bactérias Gram-negativas (SUTTERWALA *et al.*, 2007; SUTTERWALA; FLAVELL, 2009). Não se sabe exatamente como a intimina e o BfpA controlam a produção de IL-1β, nem como atuam regulando a caspase-1, estes mecanismos poderão ser melhor investigados no futuro.

A interação entre macrófagos e microrganismos ou seus produtos, induz a secreção de mediadores pró-inflamatórios incluindo IL-1β, IL-6, IL-12 e TNF-α (MAHIDA, 2000). A IL-1β tem atividade hematopoiética, estimula o neutrófilo na secreção de IL-2 e seu receptor, além de ativar linfócito B e interferir em várias outras funções. IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que influência a resposta imune específica. Há evidências desta citocina estar associada à presença de TNF-α e IL-1β, que são produzidas durante a imunidade inata (KIMURA *et al.*, 2007). IL-12 é a principal citocina com capacidade de estimular células NK e, potencializar a função de linfócitos T citotóxicos, aumentando a defesa contra microrganismos intracelulares. Esta citocina também influência a resposta imune específica, sendo capaz de iniciar a resposta tipo Th1 que controla infecções. TNF-α é indutor de resposta imune local e sistêmica mobilizando neutrófilos, favorecendo o aumento da expressão de moléculas de adesão, o que amplifica a resposta quimiotática durante o processo inflamatório, auxiliando na contenção de infecções. Desta forma IL-1β, IL-6, IL-12 e TNF-α possuem papel fundamental na resposta imune inata podendo limitar o crescimento bacteriano e aumentar os mecanismos de imunidade inata (BORISH; STEINKE, 2003).

O fato da intimina e do BfpA estimularem a síntese de alguns mediadores pró-inflamatórios comprova que ambas são moléculas imunogênicas capazes de

estimular uma resposta imune inata e podem colaborar para o estabelecimento da imunidade adquirida posteriormente. O poder imunogênico da intimina e do BfpA também foram demonstrados por Parissi-Crivelli *et al.* (2000) ao investigarem a presença de anticorpos contra intimina e BfpA no colostro de mães e no soro de crianças com seis meses de idade no México, detectando a presença desses anticorpos, IgA no colostro e IgG no soro. Confirmando os resultados obtidos por Cravioto *et al.* (1991), que detectaram IgA anti-intimina no colostro de mães as quais tiveram contato prévio com EPEC. Em 2003, Almeida *et al.* ao imunizarem galinhas com a proteína recombinante BfpA, produziram anticorpos IgY anti-BfpA. Essa imunoglobulina purificada inibiu o crescimento bacteriano e a formação do padrão de adesão localizado (LA), em cultura de células HeLa infectadas com EPEC (EAF^+), comprovando que anticorpos anti-BfpA participam do controle da infecção.

O microambiente criado durante a inflamação é importante para a contenção da infecção. Porém, além de tóxico para os microrganismos, os produtos gerados podem também ser tóxicos para o hospedeiro, quando há excessiva produção de mediadores inflamatórios. A regulação do processo inflamatório envolve equilíbrio entre as citocinas pró e antiinflamatórias. A presença de citocina antiinflamatória como a IL-10, pode controlar o processo inflamatório para que não ocorram danos ao hospedeiro durante uma infecção aguda intensa provocada pela liberação de grande quantidade de produtos microbianos. Dessa forma, o processo inflamatório precisa ser regulado para evitar maiores danos às células do hospedeiro.

Para se compreender melhor a participação dos fatores de virulência intimina ou BfpA neste equilíbrio durante a infecção causada por EPEC, macrófagos foram estimulados com concentrações crescentes de intimina ou BfpA (0,5, 1, 5 e 10 µg/mL), sendo avaliado a síntese de IL-10. Os dados obtidos mostram que apenas concentrações mais elevadas destas proteínas, acima de 5 e 10 µg/mL, foram capazes de induzir a produção de IL-10. Isto sugere que em situações onde houver infecção mais intensa com maior produção destas proteínas, os macrófagos podem sintetizar IL-10 para controlar o processo inflamatório provocado pela infecção por EPEC ou por injúria devido a outros componentes desta bactéria.

Os macrófagos possuem grande plasticidade quanto a suas funções efetoras e isto depende da regulação de diferentes vias de sinalização. Sinais moleculares importantes são gerados durante o reconhecimento antigênico podendo provocar

mudanças fenotípicas desta população de células durante sua fase de ativação celular (MOSSER, 2003).

A produção de quimiocinas por macrófagos ou outros tipos celulares é fundamental para o recrutamento de neutrófilos, macrófagos, células NK e linfócitos para o sítio da infecção ou injúria tecidual. Poucos receptores para quimiocinas na superfície da célula já são suficientes para induzirem o efeito biológico quimiotático (FORTE, 2007). Há várias famílias de quimiocinas produzidas durante o processo inflamatório. Optou-se por avaliar a presença de MCP-1 (proteína quimiotática de macrófagos), membro da família das quimiocinas (CC) que participa na infiltração de monócitos, macrófagos e linfócitos durante o processo inflamatório.

Os dados obtidos mostram que os fatores de virulência de EPEC intimina e BfpA podem contribuir para o processo inflamatório, induzindo a produção de quimiocina MCP-1, influenciando na migração de células para o local onde ocorre o processo inflamatório, podendo aumentar a liberação de mediadores inflamatórios importantes para o controle da infecção ou reparação tecidual.

Os resultados obtidos nos ensaios de dose resposta, analisados em conjunto, demonstram que o aumento das citocinas pró-inflamatórias e quimiocina é proporcional ao aumento da concentração dos fatores de virulência intimina e BfpA presentes. Observou-se que o padrão de secreção de citocina antiinflamatória diferiu do obtido para as citocinas pró-inflamatórias. A secreção de IL-10 foi dependente de altas concentrações de intimina e de BfpA (5,0 µg/mL e 10 µg/mL), enquanto a produção de citocinas pró-inflamatórias, ocorreu mesmo em menores doses (0,5 e 1 µg/mL) de estímulo e também após o uso de concentrações mais elevadas (5 e 10 µg/mL) destes fatores de virulência. Sendo condizente ao modo como o organismo conduz a resposta imune, o aumento da multiplicação bacteriana leva a um quadro clínico exacerbado devido à maior produção de mediadores inflamatórios, na tentativa do organismo em se defender e sanar a infecção. A produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória, representa uma tentativa do organismo em evitar uma resposta imune descontrolada. Por isso, produzida apenas quando as concentrações de intimina e BfpA estão elevadas. Portanto, os resultados sugerem uma característica do organismo na condução de uma infecção instaurada, o que provavelmente explica a dose resposta na ativação dos macrófagos.

Intimina e BfpA são fatores de virulência envolvidos na patogênese de EPEC, cujo papel na resposta imune ainda não foi completamente elucidado. Estes componentes bacterianos ao serem reconhecidos e interiorizados por macrófagos podem usar compartimentos intracelulares ou mesmo estratégias distintas de sinalizações que auxiliam o organismo na definição do processo inflamatório.

Outra abordagem deste trabalho consistiu na investigação do efeito exercido pela presença concomitante de intimina e BfpA. Analisou-se se isto poderia favorecer ou não a atividade individual de cada proteína e o quanto poderia refletir na imunidade inata gerada. Para esta análise utilizou-se os mesmos parâmetros de resposta imune pró ou antiinflamatória avaliados com as proteínas individualmente.

Avaliou-se nestes ensaios o efeito individual de 10 µg/mL de intimina ou 10 µg/mL de BfpA e a associação 5 µg/mL de intimina + 5 µg/mL de BfpA, o que estabeleceu concentração protéica final de 10 µg/mL. Os dados apresentados mostram que durante a ativação dos macrófagos com as duas proteínas associadas, não houve diferença significativa em relação a produção dos mediadores pró-inflamatórios secretados pelas proteínas individualmente. Entretanto houve potencialização da produção de IL-10, mediador antiinflamatório, após a combinação da intimina com BfpA. Estes dados reforçam o conceito de que durante a infecção por EPEC, quando há presença de acentuada concentração destas proteínas, ocorre intensa resposta inflamatória e síntese de IL-10 pelos macrófagos a fim de equilibrar e definir a resposta imune a ser gerada posteriormente.

O fato de intimina e BfpA, não terem efeito somatório que resulte em ação potencializada é desconhecido. Ao analisar-se os dados epidemiológicos observou-se que EPECt foi o agente bacteriano mais comum em epidemias diarréicas em crianças no passado (TOLEDO *et al.*, 1983; GOMES *et al.*, 1989; FAGUNDES-NETO *et al.*, 1996; ABE *et al.*, 2009) enquanto que, atualmente a EPECa representa o patotipo de *Escherichia coli* diarreiogênica mais prevalente (ABE *et al.*, 2009). Considerando que a ausência de expressão do BFP caracteriza EPECa, isso leva-se a sugerir que provavelmente a perda da expressão de BFP nas EPECa pode ter sido causada pela necessidade da bactéria de se adaptar ao hospedeiro e consequentemente sobreviver, sendo evolutivamente mais vantajoso, uma vez que a resposta imune pode ser menos intensa na ausência de BfpA. Assim, a bactéria extracelular, pode sobreviver por mais tempo no hospedeiro, devido a menor indução na geração da resposta imune. Por outro lado, em EPECt a presença de

ambos fatores de virulência pode, apesar de não ter efeito sinérgico, ainda assim induzir a produção de maior quantidade de mediadores resultando em uma inflamação mais intensa, com patologia mais grave. Apesar de se saber que a patologia é dada por vários fatores, neste trabalho explorou-se apenas o papel do BfpA e da intimina.

Segundo Simmons *et al.* (2003) a produção de citocinas é fundamental para geração de uma resposta imune protetora contra patógenos que causam lesão A/E.

Embora a inflamação seja, sem dúvida, o efeito imediato da infecção por EPEC, estudos recentes sugerem que a infecção por EPEC pode atenuar a resposta inflamatória em células epiteliais do hospedeiro (SHARMA *et al.*, 2006). Outro trabalho realizado por Ramirez *et al.* (2005) mostrou que a infecção de coelhos com cepa selvagem de REPEC promoveu um aumento na expressão do RNA-m para IL-10 pelos enterócitos da mucosa e a infecção com mutantes de intimina potencializou ainda mais essa expressão. Sugerindo que a intimina pode controlar a expressão de IL-10 por mecanismos ainda não definidos. No entanto, os enterócitos de animais infectados expressaram as citocinas pró-inflamatórias TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-8 ao contrário do observado na infecção com o mutante em intimina.

Avaliando-se os resultados apresentados, juntamente com os dados publicados, há indícios que após a colonização da mucosa intestinal por EPEC, existe um ambiente imunológico favorável para a resposta imune tipo Th1 (RAMIREZ *et al.*, 2005), sendo IL10 posteriormente produzida; e essa produção deve controlar a síntese de TNF-α, IL-6 e IL-12 em monócitos e macrófagos (HUBERT *et al*, 2007).

O microambiente da infecção por EPEC é complexo, vários outros parâmetros devem ser levados em consideração, uma vez que outros componentes bacterianos estão presentes e neste trabalho, analisou-se apenas o efeito imune de duas proteínas intimina e BfpA sobre macrófagos que certamente contribuem para a patogênese da bactéria.

Um problema comum com a obtenção de proteínas recombinantes é a presença de traços de LPS capaz de mascarar a resposta imune induzida pela proteína. Mesmo utilizando nos ensaios, macrófagos oriundos de camundongos $C_3H/HeJ(tlr4^{-/-})$, que possuem mutação no receptor TLR-4, e possui resposta reduzida ao LPS, mesmo assim, realizou-se uma série de ensaios para definir a contribuição do LPS nos experimentos.

A faixa de endotoxina encontrada para intimina e para BfpA, na máxima dose de proteína usada nos experimentos (10 µg/mL), corresponde entre 1,25 - 12,5 UE/mL ou 6,25 a 62,5 ng/mL.

Tentativas de remoção dos traços de LPS das proteínas no início dos ensaios foram realizadas utilizando coluna de gel de polimixina B, no entanto este protocolo tornou-se inviável, pois ocorreu uma grande perda de proteínas (dados não mostrados). Em função disto usou-se outro protocolo para investigar a participação do LPS na resposta imune obtida nos ensaios anteriores. Para estes experimentos, utilizou-se a linhagem de macrófagos J774, originárias de camundongos Balb/c, com alta sensibilidade a endotoxina e uma abordagem já estabelecida na literatura para neutralização dos traços de LPS presente nas proteínas com polimixina B *in vitro* (COOPERSTOCK, 1974). Por este protocolo, concluíu-se que a atividade imune observada com os recombinantes pode ser atribuída à proteína e não ao lipopolissacarídeo.

Confirmou-se a alta sensibilidade dos macrófagos J774 ao estímulo com 100 ng/mL de LPS, sendo esta atividade neutralizada pelo tratamento com polimixina B. Esta concentração de LPS é muito superior ao presente nas amostras. Além disto, o tratamento do LPS com proteinase K não modificou a produção de TNF-α induzida por LPS, sendo os níveis desta citocina semelhante entre os grupos estimulados e tratados ou não com proteinase K.

Quando se tratou as proteínas recombinantes intimina e BfpA com polimixina B, os macrófagos J774 mantiveram a capacidade de produzir altos níveis de TNF-α, já o tratamento dos recombinantes com proteinase K inibiu a produção de TNF-α, comprovando que a atividade imune se deu em função da atividade das proteínas intimina e BfpA e não de endotoxinas como já descrito por outros autores. Cardoso *et al.* (2007) avaliaram a produção de TNF-α por macrófagos após estímulo com proteínas recombinantes de *Schistosoma mansoni* produzidas em *Escherichia coli* e demonstraram que a polimixina B foi capaz de neutralizar o efeito do LPS presente nas proteínas. Também Sandri *et al.* (2008) testaram a ação de polimixina B e de proteinase K sob a atividade da proteína recombinante rhSAA e do LPS, dosando óxido nítrico (NO). A associação entre polimixina B e proteína não afetou a produção de NO, porém a adição da polimixina ao LPS inibiu totalmente a produção de NO. Por outro lado, o tratamento da proteína recombinante com proteinase K aboliu a síntese de NO por rhSAA, mas não pelo LPS. Os resultados destes

autores, indiretamente sugerem que a proteína, mas não o LPS é responsável pela produção de NO. Embora avaliando-se diferentes mediadores, estes resultados são semelhantes ao obtido no presente trabalho.

Dois aspectos reforçam que a resposta imune elicitada pode ser atribuída a intimina e ao BfpA: 10 µg/mL de intimina ou de BfpA, foi a concentração máxima utilizada nos ensaios, estas preparações contêm traços de LPS, inferior a 100 ng/mL de endotoxina que foi neutralizada por polimixina B, e mesmo assim, estes fatores de virulência foram capazes de induzir a produção de TNF-α. Soma-se a isto o fato da intimina e do BfpA não mais ativarem macrófagos após o tratamento com proteinase K, que por ser uma serina protease, cliva ligações peptidicas degradando as proteínas.

Por outro lado, notou-se que a neutralização dos recombinantes com polimixina B durante o estímulo das células J774, mostrou semelhante padrão de resposta de TNF-α obtida com os animais C_3H/HeJ ($tlr4^{-/-}$) hiporespondedores ao LPS. Além disso, os macrófagos destes camundongos não produziram níveis significativos de TNF-α quando estimulados com concentrações de LPS inferiores a 50 ng/mL e a quantidade de citocina nesta dose ainda assim foi muito inferior ao obtido com intimina e BfpA. Portanto a resposta majoritária obtida com 10 µg/mL de recombinante se deve predominantemente a atividade da intimina e BfpA.

Ao comparar-se o conteúdo de endotoxina presente nas proteínas estudadas com os valores encontrados nas monografias definidas pela Farmacopéia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA, 2010), verificou-se que o conteúdo aceitável de endotoxina, determinado pelo método *in vitro*, varia, dependo do produto biológico. Por exemplo, para a vacina da influenza o valor é de 100 UE/dose (0,5 mL) sendo 200 UE/mL, já a para vacina anti-rábica o valor é de 25 UE/dose (0,5 mL), o que significa 50 UE/mL. Dessa forma, o conteúdo presente nas proteínas recombinantes utilizadas nos ensaios é aceitável.

Atualmente vários trabalhos têm demonstrado a importância da ativação de TLR4 durante a resposta inata para melhorar a resposta efetora de proteínas, principalmente em sistemas de imunização. Ohashi *et al.* (2000), ao utilizarem o mesmo sistema com macrófagos de medula de camundongo C_3H/HeJ ($tlr4^{-/-}$), demonstraram que há necessidade do TLR4 funcional para obter resposta a proteína de choque, rhHsp60. Em outro estudo, Sandri *et al.* (2008) ao trabalharem com macrófagos peritoneais de C_3H/HeJ ($tlr4^{-/-}$), sugerem que a produção de NO em

resposta a proteína de fase aguda (SAA) foi dependente de TLR4. Assim, este trabalho inicia possíveis estudos quanto a utilização de TLR4 pelo BfpA e pela intimina. Em resumo, os resultados obtidos no presente trabalho permitem inferir que:

- Intimina e BfpA recombinantes não foram tóxicos para as células.

- Ambas as moléculas são imunogênicas, capazes de estimular uma resposta imune inata e podem colaborar para o estabelecimento da imunidade adquirida.

- Apenas concentrações mais elevadas destas proteínas (5 e 10 µg/mL) foram capazes de induzir a produção de IL-10.

- Não houve efeito somatório entre as proteínas utilizadas ao observar a produção de citocinas pró-inflamatórias.

- Houve potencialização da produção de IL-10, mediador antiinflamatório, após a combinação da intimina com BfpA.

- Confirmou-se a alta sensibilidade dos macrófagos J774 ao estimulo com 100 ng/mL de LPS.

- O tratamento do LPS com proteinase K não modificou a produção de TNF-α.

- O tratamento das proteínas recombinantes intimina e BfpA com polimixina B, manteve a capacidade dos macrófagos J774 a produzir altos níveis TNF-α.

- O tratamento das proteínas recombinantes intimina e BfpA com proteinase K não induziu a ativação dos macrófagos.

- A neutralização dos recombinantes com polimixina B nas células J774, mostrou semelhante padrão de resposta de TNF-α obtida com os animais C_3H/HeJ ($tlr4^{-/-}$) hiporespondedores a LPS.

- Os macrófagos de camundongos C_3H/HeJ ($tlr4^{-/-}$) não produziram níveis significativos de TNF-α quando estimulados com concentrações de LPS inferiores a 50 ng/mL e a quantidade de citocina nesta dose ainda assim foi muito inferior ao obtido com intimina e BfpA.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que intimina e BfpA são potentes ativadores de macrófagos durante a resposta imune inata estimulando de maneira dose dependente a produção de mediadores pró-inflamatórios, TNF-α, IL-6 e IL-12, antiinflamatório IL-10 e a quimiocina MCP-1, sendo estes, importantes fatores no desenvolvimento da resposta imune durante a infecção e, podendo colaborar para o controle da infecção por EPEC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBA, K.; SINFIELD, R.; HART, C.A.; GARNER, P. Pathogens associated with persistent diarrhoea in children in low and middle income countries: systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v.9, n.88, p.1-15, 2009.

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p.23-26.

ABE, C.M.; BLANCO, M.; DHAB, I.G.; BLANCO, J.E.; BLANCO, J.; FRANZOLIN, M.R.; TADDEI, C.R.; PIAZZA, R.M.F.; MARTINEZ, M.B.; ELIAS, W.P. Characterization of eae1 EAF_ stx_ fecal *Escherichia coli* strains isolated in Salvador, Bahia, Brazil. In: AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. GENERAL MEETING, 107., Toronto, 2007. **Abstract**. Washington: American Society for Microbiology, 2007. B111.

ABE, C.M.; TRABULSI, L.R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M.R.; TADDEI, C.R.; MARTINEZ, M.B.; PIAZZA, R.M.; ELIAS, W.P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.64, n.4, p.357-365, 2009.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v.406, n.6797, p.782-787, 2000.

ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONCALVES, A.G.; TRABULSI, L.R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection if intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.662-668, 1998a.

AFSET, J.E.; BEVANGER, L.; RØMUNDSTAD, P.; BERGH, K. Association of atypical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) with prolonged diarrhoea. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1137-1144, 2004.

AKIRA, S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. **Proceedings of the Japan Academy, Series B: Physical and Biological Sciences**, v.85, n.4, p.143-156, 2009.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v.124, n.4, p.783-801, 2006.

ALMEIDA, C.M.C.; QUINTANA-FLORES, V.M.; MEDINA-ACOSTA, E.; SCHRIEFER, A.; BARRAL-NETTO, M.; DIAS DA SILVA, W. Egg Yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic *Escherichia coli*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.57, p.573-582, 2003.

ALTHMAN, R.; PHILLPOT, D. Innate immunity via Toll-like receptors and NOD proteins. **Current Opinion in Microbiology**, v.7, p.25-32, 2004.

AUNG, H.T.; SCHRODER, K.; HIMES, S.R.; BRION, K.; VAN ZUYLEN, W.; TRIEU, A.; SUZUKI, H.; HAYASHIZAKI, Y.; HUME, D.A.; SWEET, M.J.; RAVASI, T. LPS regulates proinflammatory gene expression in macrophages by altering histone deacetylase expression. **FASEB Journal**, v.20, n.9, p.1315-1327, 2006.

BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J.B.; GOMES, T.A.; XU, J.; PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infection and Immunity,** v. 76 , n. 1, p. 361-368, 2008.

BANCHEREAU, J.; BRIERE, F.; CAUX, C.; DAVOUST, J.; LEBECQUE, S.; LIU, Y.J.; PULENDRAN, B.; PALUCKA K. Immunobiology of dendritic cells. **Annual Review of Immunology**, v.18, p.767-811, 2000.

BATCHELOR, M.; KNUTTON, S.; CAPRIOLI, A.; HUTER, V.; ZANIAL, M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3822–3827, 1999.

BEG, A.A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. **Trends in Immunology**, v.23, p.509-512, 2002.

BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIS, A.; THORPE, R., eds. **Citokines**. San Diego: Academic Press, p.335-360, 1998.

BIEBER, D.; RAMER, S.W.; WU, C.Y.; MURRAY, W.J.; TOBE, T.; FERNANDEZ, R.; SCHOOLNIK, G.K. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.280, p.2114–2118, 1998.

BIRAGYN, A.; RUFFINI, P.A.; LEIFER, C.A.; KLYUSHNENKOVA, E.; SHAKHOV, A.; CHERTOV, O.; SHIRAKAWA, A.K.; FARBER, J.M.; SEGAL, D.M.; OPPENHEIM, J.J.; KWAK, L.W. Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by β-defensin 2. **Science**, v.298, 1025–1029, 2002.

BLACK, R.E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H.L.; LAWN, J.E.; RUDAN, I.; BASSANI, D.G.; JHA, P.; CAMPBELL, H.; WALKER, C.F.; CIBULSKIS, R.; EISELE, T.; LIU, L.; MATHERS, C. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **Lancet**, v.375, p.1969-1987, 2010.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DHABI, G.; ALONSO, M.P.; GONZALEZ, E.A.; BERNARDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin) producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae- ξ). **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.2, p.645-651, 2004.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; MORA, A.; COIRA M.A.; MADRID, C.; JUARÉZ, A.; BERNÁRDEZ, M.I.; GONZÁLES, E.A.; BLANCO, J. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **International Microbiology**, v.9, p.103-110, 2006.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DAHBI, G.; MORA, A.; ALONSO, M.P.; VARELA, G.; GADEA, M.P.; SCHELOTTO, F.; GONZÁLEZ, E.A.; BLANCO, J. Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimins variants (muB and xiR/beta2B). **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1165-1174, 2006.

BLANK, T.E.; ZHONG, H.; BELL, A.L.; WHITTAM, T.S.; DONNENBERG, M.S. Molecular variation among type IV pilin (bfpA) genes from diverse enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Infection and Immunity**, v.68, n.12, p.7028-7038, 2000.

BLASIUS, A.L.; BEUTLER, B. Intracellular toll-like receptors. **Immunity**, v.26, p.305-315, 2010.

BORISH, L.C.; STEINKE, J.W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.111, p.5460-5475, 2003.

BRITISH Pharmacopoeia. 6.ed. London: The Sationery Office, 2010. p. 3287 – 3331. Disponível em: www. pharmacopoeia.gov.uk.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador in Salvador – Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, v. 6, p. 839-844, 2007.

CAMPEBELL, R.C.; PEIRÓ, J.R.; ROSA, P.C.S.; VALADÃO, C.A.A.; BECHARA, G.H. *Escherichia coli* lipopolisacharide (LPS) induced endotoxemia in horses: effects of anti-inflammatory drugs on seric and peritoneal tumor necrosis factor alpha (TNF-α) concentrations. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.4, p.837-843, 2007.

CAMPELLONE, K.G.; SANTANA, F.; CALVA, E.; PUENTE, J.M. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Molecular Microbiology**, v.43, p.1227-1241, 2002.

CAMPOS, L.C.; WHITTAM, T.S.; GOMES,T.A.T.; ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infection and Immunity**, v.62, n.8, p.3282-3288, 1994.

CARDOSO, L.S.; ARAUJO, M.I.; GÓES, A.M.; PACÍFICO, L.G.; OLIVEIRA, R.R.; OLIVEIRA, S.C. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. **Microbial Cell Factories**, v.6, p.1-6, 2007.

CARIO, E. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.24, p.725–732, 2008.

CHEN, X.L.; ZHANG, Q.; ZHAO, R.; DING, X.; TUMMALA, P.E.; MEDFORD, R.M. Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.305, p.573-580, 2003.

CHINA, B.; JACQUES, E.; DEVRIN, A.C.; PIRSON, V.; MAINIL, J. Heterogenicity of the eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with humans strains. **Research in Microbiology**, v.150, p.323-332, 1999.

CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.E.; WILLIAMN, P.H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli,* a global pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.365-378, 2003.

CLEARY, J.; LAI, L.C.; SHAW, R.K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adehesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v.150, p.527-38, 2004.

COOPERSTOCK, M.S. Inactivation of endotoxin by polymyxin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.6, p.422-425, 1974.

CORR, S.C.; GAHAN, C.C.; HILL, C. M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. **FEMS Immunology an Medical Microbiology**, v.52, n.1, p.2-12, 2008.

CRAIG, L.; LI, J. Type IV pili: paradoxes in form and function. **Current Opinion in Structural Biology**, v.18, n.2, p.267–277, 2008.

CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; VILLAFA´N, H.; RUIZ, J.; DEL VEDOVO, S.; NEESER, J.R. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. **Journal of Infectious Diseases**, v.163, p.1247–1255, 1991.

CREASEY, E.A.; DELAHAY, R.M.; BISHOP, A.A.; SHAW, R.K.; KENNY, B.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. CesT is a bivalent enteropathogenic *Escherichia coli* chaperone required for translocation of both Tir and Map. **Molecular Microbiology**, v.47, n.1, p.209-221, 2003a.

DANIELL, S.J.; TAKAHASHI, N.; WILSON, R.; FRIEDBERG, D.; ROSENSHINE, I.; BOOY, F.P.; SHAW, R.K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G.; AIZAWA, S. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli.* **Cell Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 865-871, 2001.

DANN, S.M.; SPEHLMANN, M.E.; HAMMOND, D.C.; IIMURA, M.; HASE, K.; CHOI, L.J.; HANSON, E.; ECKMANN, L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. **Journal of Immunology**, v.180, n.10, p.6816-6826, 2008.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Current Opinion in Microbiology**, v.8, n.1, p.28–34, 2005.

DENG, W.; Li, Y.; HARDWIDGE, P.R.; FREY, E.A.; PFUETZNER, R.A.; LEE, S.; GRUENHEED, S.; STRYNAKDA, N.C.J.; PUENTE, J.L.; FINLAY, B.B. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. **Infection and Immunity**, v.73, p.2135-2146, 2005.

DIACOVICH, L.; GORVEL, J.P. Bacterial manipulation of innate immunity to promote infection. **Nature**, v.8, p.117-128, 2010.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli.* **Infection and Immunity**, v.60, p.3953-3961, 1992.

DONNENBERG, M.S.; GIRON, J.A.; NATARO, J.P.; KAPER, J.B. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular Microbiology**, v.6, p.3427-3437,1992.

DULGUER, M.V.; FABBRICOTTI, S.H.; BANDO, S.Y.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative E. coli heat-stable enterotoxin and diarrhea. **Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.1685–1694, 2003.

EDWARDS, J.P.; ZHANG, X.; FRAUWIRTH, K.A.; MOSSER, D.M. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, n.6, p.1298-1307, 2006.

ELLIOTT, S.J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J.A.; SHIN, S.; MELLIES, J.L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S.W.; MCDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence

factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.68, n.11, p.6115-6126, 2000.

FAGUNDES-NETO, U.; SCHMITZ, L.G.; SCALETSKY, I.C.A. Acute diarrhea due to enteropathogenic *Escherichia coli*: epidemiological and clinical features in Brasília, Brazil. **International Journl of Infectious Diseases**, v.1, p.65–69, 1996.

FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Escherichia coli infections and malnutrition. **Lancet**, v.356, p.S27, 2000.

FORTE, W.C.N. **Imunologia**: do básico ao aplicado. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.162.

FRANKEL, G.; CANDY, D.C.; EVEREST, P.; DOUGAN, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1835-1842, 1994.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J.B.; KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli:* more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v.30, p.911-921, 1998.

FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.B.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p.359-363, 2005.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets: Inflammation & Allergy**, v.4, p.281-286, 2005.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infection and Immunity**, v.73, n.5, p.2573-2585, 2005.

GE, Y.; EZZELL, R.M.; WARREN, H.S. Localization of endotoxin in the rat intestinal epithelium. **Journal of Infectious Diseases**, v.182, p.873-881, 2000.

GEA-SORLÍ, S.; CLOSA, D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics**, v.1, n.5, p.107-111, 2010.

GEBERT, A.; STEIINMETZ, I.; FASSBENDER, S. Antigen transport into Peyer's patches: increased uptake by constant numbers of M cells. **Americn Journal of Pathology**, v.164, n.1, p.65-72, 2004.

GERSUK, G; HIRAOKA, A; MARR, K.A. Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium. **Journal of Immunology Methods**, v.299, p.99-106, 2004.

GIRON, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.254, p.710-713, 1991.

GIRÓN, J.A.; HO, A.S.; SCHOOLNIK, G.K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.7391–7403, 1993.

GÓMEZ-DUARTE, O.G.; KAPER, J.B. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eae*A expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.63, n.5, p.1767-1776, 1995.

GOMES, T.A.; IRINO, K.; GIRÃO, D.M.; GIRÃO, V.B.; GUTH, B.E.; VAZ, T.M.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A. Emerging enteropathogenic Escherichia coli strains? **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.1851–1855, 2004.

GOMES, T.A.T.; RASSI, V.; MACDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.164, p.331-337, 1991.

GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; WACHSMUTH, I.K.; BLAKE, P.A.; TRABULSI, L.R. Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infants with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v.160, p.131–135, 1989.

GOOSNEY, D.L.; DEVINNEY, R.; PFUTZNER, R.A.; FREY, E.A.; STRYNADKA, N.C.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. **Current Biology**, v.10, p.735-738, 2000.

GORDON, S. Alternative activation of macrophage. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.23-35, 2003.

GORDON, S.; TAYLOR, P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nature Reviews Immunology**, v.5, p.953–964, 2005.

GRÜTZ, G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. **Journal of Leukocyte Biology**, v.77, p.3-15, 2005.

GRUENHEID, S.; DEVINNEY, R.; BLADT, F.; GOOSNEY, D.; GELKOP, S.; GISH, G.D.; PAWSON, T.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. **Nature Cell Biology**, v.3, p.856-859, 2001.

HEDBERG, C.; SAVARINO, S.; BESSER, J.; PAULUS, C.; THELEN, V.; MYERS, L.; CAMERON, D.N.; BARRET, T.J.; KAPER, J.B.; OSTERHOLM, M.T. An outbreak of foodborne illness caused by Escherichia coli O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. **Journal of Infectious Diseases**, v.176, p.1625-1628, 1997.

HIBINO, T.; LOZA-COLL, M.; MESSIER, C.; MAJESKE, A.J.; COHEN, A.H.; TERWILLIGER, D.P.; BUCKLEY, K.M.; BROCKTON, V.; NAIR, S.V.; BERNEY, K.; FUGMANN, S.D.; ANDERSON, M.K.; PANCER, Z.; CAMERON, R.A.; SMITH, L.C.; RAST, J.P. The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. **Developmental Biology**, v.300, p.349–365, 2006.

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

HUGHES, D.T.; SPERANDIO, V. Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, n.2, p.111-120, 2008.

HUME, D.A.; ROSS, I.L.; HIMES, S.R.; SASMONO, R.T.; WELLS, C.A.; RAVASI. The mononuclear phagocytes system revisited. **Journal of Leukocyte Biology**, v.72, p.621-627, 2002.

HUME, D.A.; UNDERHILL, D.M.; SWEET, M.J.; OZINSKY, A.O.; LIEW, F.Y.; ADEREM, A. Macrophages exposed continuously to lipopolysaccharide and other agonists that act via toll-like receptors exhibit a sustained and additive activation state. **BMC Immunology**, v.2, p.11, 2001.

HUMPHRIES, R.M.; ARMSTRONG, G.D. Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli to the small intestine epithelium. **Future Microbiology**, v.5, n.11, p.1645-1661, 2010.

HYLAND, R.M.; SUN, J.; GRIENER, T.P.; MULVEY, G.L.; KLASSEN, J.S.; DONNENBERG, M.S.; ARMSTRONG, G.D. The bundling pilin of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. **Cell Microbiology**, v.10, n.1, p.177-187, 2008.

ITO, K.; IIDA, M.; YAMAZAKI, M.; MORIYA, K.; MOROISHI, S.; YATSUYANAGI, J.; KURAZONO, T.; HIRUTA, N.; RATCHTRACHENCHAI, O.-A. Intimin types determined by heteroduplex mobility assay of intimin gene (*eae*) – positive *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1038-1041, 2007.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. **Sience**, v.327, p.291-295, 2010.

JANA, S.; DEB, J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, p.289–298, 2005.

JARVIS, K.G.; GIRON, J.A.; JERSE, A.E.; MCDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.7996–8000, 1995.

JERSE, A.E.; YU, J.; TALL, B.D.; KAPER, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue

culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, p.7839-7843, 1990.

JORES, J.; ZEHMKE, K.; EICHBERG, J.; RUMER, L.; WIELER, L.H. Description of a novel intimin variant (type zeta) in the bovine O84:NM verotoxin-producing *Escherichia coli* strain 537/89 and the diagnostic value of intimin typing. **Experimental Biology and Medine**, v.228, p.370-376, 2003.

KALMAN, D.; WEINER, O.D.; GOOSNEY, D.L.; SEDAT, J.W.; FINLAY, B.B.; ABO, A.; BISHOP, J.M. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. **Nature Cell Biology**, v.1, n.6, 389–391, 1999.

KAPER, J.B. Defining EPEC. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.130-133, 1996.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.123–140, 2004.

KENNY, B.; DeVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHEID, D.J.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v.91, n.4, p.511-520, 1997.

KENNY, B.; WARAWA, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. **Infection and Immunity,** v. 69, p. 1444-1453, 2001.

KHURSIGARA, C.; ABUL-MILH, M.B.; LAU, B.; GIRON, J.A.; LINGWOOD, C.A.; FOSTER, D.E. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle- forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. **Infection and Immunity**, v.69, p.6573–6579, 2001.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLEN, M.J.; NISAN, I.; NEVES, B.C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO Journal**, v.17, p.2166-2176, 1998.

KNUTTON, S.; SHAW, R.K.; ANANTHA, R.P.; DONNEMBERG, M.S.; ZORGANI, A.A. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic

alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Molecular Microbiology**, v.33, p.499-509, 1999.

KIMURA, A.; NAKA, T.; KISHIMOTO, T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin. 17-producing T helper cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.29, p.12099-12104, 2007.

LARA-TEJERO, M.; SUTTERWALA, F.S.; OGURA, Y.; GRANT, E.P.; BERTIN, J.; COYLE, A.J.; FLAVELL, R.A.; GALÁN, J.E. Role of the caspase-1 inflammasome in *Salmonella typhimurium* pathogenesis. **Journal of Experimental Medicine**, v.203, n.6, p.1407–1412, 2006.

LEAMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEBEIS, S.L.; SHERMAN, M.A.; KALMAN, D. Protective and destructive innate immune responses to enteropathogenic *Escherichia coli* and related A/E pathogens. **Future Microbiology**, v.3, n.3, p.315-328, 2008.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases,** v.155, p.377-389, 1987.

LIMA, F.A. Estudo da imunogenicidade de intimina de *Escherichia coli* enteropatogênica. São Paulo, 2004. 82p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.

LOMMEL, S.; BENESCH, S.; ROTTNER, K.; FRANZ, T.; WEHLAND, J.; KUHN, R. Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASPdefective cells. **EMBO Reports**, v.2, n.9, 850–857, 2001.

LUO, Y.; FREY, E.A.; PFUENTZNER, R.A.; CREAGH, A.L.; KNOECHEL, D.G.; HAYNES, C.A.; FINLAY, B.B.; STRYNADKA, C.J. Cristal srtuture of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin- receptor complex. **Nature**, v.405, p.1073-1077, 2000.

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

MAHIDA, Y.R. The key role of macrophage in immunopathogenesis of BID. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.6, n.1, p.21-23, 2000.

MALLADI, V.; PUTHENEDAM, M.; WILLIAMS, P.H.; BALAKRSHNAN, A. Enteropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteins induce iNOS activation of NF-κB and MAP kinases. **Inflammation**, v.28, p.345-353, 2004.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European Journal of Immunology**, v.37, p.14-16, 2007.

MARIATHASAN, S.; NEWTON, K.; MONACK, D.M.; VUCIC, D.; FRENCH, D.M.; LEE, W.P.; ROOSE-GIRMA, M.; ERICKSON, S.; DIXIT, V.M. Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. **Nature**, v.430, p.213–218, 2004.

MARIC, I.; HOLT, P.G.; PERDUE, M.H.; BIENENSTOCK, J. Class II MHC antigen (Ia)-bearing dendritic cells in the epithelium of the rat intestine. **Journal of Immunology**, v.156, p.1408–1414, 1996.

MARTINEZ, F.O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.451-483, 2009.

MCDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.1664–1668, 1995.

MELLIES, J.L.; ELLIOTT, S.J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli:* identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Molecular Microbiology**, v.33, n.2, p.296-306, 1999.

MENEZES, M.A.; ROCHA, L.B.; KOGA, P.C.; FERNANDES, I.; NARA, J.M.; MAGALHÃES C.A.; ABE, C.M.; AYALA, C.O.; BURGOS, Y.K.; ELIAS, W.P.; CASTRO, A.F.; PIAZZA, R.M. Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n.3, p.878-887, 2010.

MIGGIN, S.M.; O'NEILL, L.A. New insights into the regulation of TLR signaling. **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, n.2, p.220-226, 2006.

MILLER, H.; ZHANG, J.; KUOLEE, R.; PATEL, G.B.; CHEN, W. Intestinal M cells: the fallible sentinels? **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.10, p.1477-1486, 2007.

MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANNELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v.41, p.1340-1351, 1983.

MORA, A.; BLANCO, M.; YAMAMOTO, D.; DAHBI, G.; BLANCO, J.E.; LÓPEZ, C.; ALONSO, M.P.; VIEIRA, M.A.; HERNANDES, R.T.; ABE, C.M.; PIAZZA, R.M.; LACHER, D.W.; ELIAS, W.P.; GOMES, T.A.; BLANCO, J. HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. **International Microbiology**, v.12, n.4, p.243-51, 2009.

MORENO, A.C.R.; FERNANDES-FILHO, A.; GOMES, T.A.T.; RAMOS, S.T.S.; MONTEMOR, L.P.G.; TAVARES, V.C.; SANTOS-FILHO, L.; IRINO, K.; MARTINEZ, M.B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.66, p.50–57, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MOSSER, D.M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.73, p.209-212, 2003.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Natural Immunity**, v.8, p.958-969, 2008.

MYLONAS, K.J.; NAIR, M.G.; PRIETO-LAFUENTE, L.; PAAPE, D.; ALLEN, J.E. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be reprogrammed to enable microbial killing. **Journal of Immunology**, v.182, p.3084-3094, 2009.

NAHRENDORF, M.; SWIRSK, I.F.K.; AIKAWA, E.; STANGENBERG, L.; WURDINGER, T.; FIGUEIREDO, J.L.; LIBBY, P.; WEISSLEDER, R.; PITTET, M.J. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. **Journal of Experimental Medicine**, v.204, 3037–3047, 2007.

NARA, J.M.; CIANCIARULLO, A.M.; CULLER, H.F.; BUERIS, V.; HORTON, D.S.P.Q.; MENEZES, M.A.; FRANZOLIN, M.R.; ELIAS, W.P.; PIAZZA, R.M.F. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.35-43, 2009.

NATARO J.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.142–210, 1998.

NATARO, J.P.; SCALETSKY, I.C.A.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; TRABULSI, L.R. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.48, p.378-383, 1985.

NETER, E.O.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R.M.; GORZYNSKI, E.A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v.16, n.6, p.801–808, 1955.

NIESS, J.H.; REINECKER, H.C. Lamina própria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.21, p.687-691, 2005.

NIESS, J.H.; REINECKER, H.C. Dendritic cells: the commanders-in-chief of mucosal immune defenses. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.22, p.354-360, 2006.

NOUGAYRÈDE, J.P.; FERNANDES, P.J.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell Microbiology**, v.5, n.6, p.359-372, 2003.

NUNES, E.B.; SARIDAKIS, H.O.; IRINO, K.; PELAYO, J.S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.499–504, 2003.

OCHOA, T.J.; BARLETTA, F.; CONTRERAS, C.; MERCADO, E. New insights into the epidemiology of *Escherichia coli* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.102, n.9, p.852-856, 2008.

OHASHI, K.; BURKART, V.; FLOHE, S.; KOLB, H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the Toll-like receptor- 4 complex. **Journal of Immunology**, v.164, p.558–561, 2000.

ORLANDI, P.P.; MAGALHÃES, G.F.; MATOS, N.B.; SILVA, T.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P.A.; SILVA, L.H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.4, p.507-517, 2006.

OSHIUMI, H.; MATSUO, A.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. Pan-vertebrate toll-like receptors during evolution. **Current Genomics**, v.9, p.488-493, 2008.

OSWALD, E.; SCHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorragic and enteropathogenic *Escherichia coli:* characterization of a new intimin variant. **Infection and Immunity**, v.68, p.64-71, 2000.

PALLISER, D.; HUANG, Q.; HACOHEN, N.; LAMONTAGNE, S.P.; GUILLEN, E.; YOUNG, R.A.; EISEN, H.N. A role for Toll-like receptor 4 in dendritic cell activation and cytolytic CD8+T cell differentiation in response to a recombinant heat shock fusion protein. **Journal of Immunology**, v.172, p.2885–2893, 2004.

PARISSI-CRIVELLI, A.; PARISSI-CRIVELLI, J.M.; GIRÓN, J.A. Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p.2696–2700, 2000.

PELAYO, J.S.; SCALETSKY, I.C.; PEDROSO, M.Z.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J.A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L.R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **Journal of Medical Microbiology**, v.48, p.41–49, 1999.

PÉROLA, O.; MAGALHÃES, P.O.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.; PENNA, T.C.V.; PESSOA Jr., A. Methods of endotoxin removal from biological preparations: a review. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v.10, n.3, p.388-404, 2007.

PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. **Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.1496-1500, 2000.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HEJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v.282, n.5396, p.2085-2088, 1998.

PORTER, M.E.; MITCHELL, P.; FREE, A.; SMITH, D.G.; GALLY, D.L. The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.2, p.458-472, 2005.

RANDOLPH, G.J.; OCHANDO, J.; PARTIDA-SÁNCHEZ, S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. **Annual Review of Immunology**, v.26, p.293-316, 2008.

RAMIREZ, K.; HUERTA, R.; OSWALD, E.; GARCIA-TOVAR, C.; HERNANDEZ, J.M.; NAVARRO-GARCIA, F. Role of EspA and Intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit Enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. **Infection and Immunity**, v.73, n.1, p.103-113, 2005.

RAMOS, H.C.; RUMBO, M.; SIRARD, J.C. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. **Trends in Microbiology**, v.12, n.11, p.509-517, 2004.

RENDÓN, M.A.; SALDAÑA, Z.; ERDEM, A.L.; MONTEIRO-NETO, V.; VÁZQUEZ, A.; KAPER, J.B.; PUENTE, J.L.; GIRÓN, J.A. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.104, n.25, p.10637-10642, 2007.

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

ROBINS-BROWNE, R.M.; BORDUN, A.M.; TAUSCHEK, M.; BENNETT-WOOD, V.R.; RUSSEL, J.; OPPEDISANO, F.; LISTER, N.A.; BETTELHEIM, K.A.; FAIRLEY, C.K.; SINCLAIR, M.I.; HELLARD, M.E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.1797-1805, 2004.

RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I.C.; CAMPOS, L.C.; GOMES, T.A.T.; WHITTAM, T.S.; TRABULSI, L.R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infection and Immunity**, v.64, p.2680-2686, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V.H.; CALVA, E.; PUENTE, J.L. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli.* **Journal of Bacteriology**, v.183, n.9, p.2823-2833, 2001.

SANDRI, S.; RODRIGUEZ, D.; GOMES, E.; MONTEIRO, H.P.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? **Journal of Leukocyte Biology**, v.83, p.1174-1180, 2008.

SANSONETTI, P.J.; ARONDEL, J.; CANTEY, J.R.; PRÉVOST, M.C.; HUERRE, M. Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. **Infection and Immunity**, v.64, n.7, p.2752-2764, 1996.

SAVKOVIC, S.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. **Infection and Immunity**, v.64, p.4480-4487, 1996.

SCALETSKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R. Distintive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v.45, p.534-536, 1984.

SCALETSKY, I.C.A.; PEDROSO, M.Z.; OLIVA, C.A.G.; CARVALHO, R.L.B.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence–like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infection and Immunity**, v.67, p.3410-3415, 1999.

SCHINDLER, H.; LUTZ, M.B.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **Journal of Immunology**, v.166, p.3075-3082, 2001.

SCHRIEFER, A.; MALTEZ, J.R.; SILVA, N.; STOECKLE, M.Y.; BARRAL-NETTO, M.; RILEY, L.W. Expression of a pilin subunit BfpA of the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in an *aro*A live *Salmonella* vaccine strain. **Vaccine**, v.17, p.770-778, 1999.

SHARMA, R.; TESFAY, S.; TOMSON, F.L.; KANTETI, R.P.; VISWANATHAN, V.K.; HECHT, G. Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.290, p.685–694, 2006.

SIMMONS, C.P.; CLARE, S.; GHAEM-MAGHAMI, M.; UREN, T.K.; RANKIN, J.; HUETT, A.; GOLDIN, R.; LEWIS, D.J.; MACDONALD, T.T.; STRUGNELL, R.A.; FRANKEL, G.; DOUGAN, G. Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. **Infection and Immunity**, v.71, p.5077–5086, 2003.

SIRCILI, M.P.; WALTERS, M.; TRABULSI, L.R.; SPERANDIO, V. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. **Infection and Immunity**, v.72, n.4, p.2329-2337, 2004.

SMITH, H.; SCOTLAND, S.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic Escherichia coli infections in the United Kingdom. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.45-49, 1996.

SMITH, P.D.; SMYTHIES, L.E.; SHEN, R.; GREENWELL-WILD, T.; GLIOZZI, M.; WAHL, S.M. Intestinal macrophages and response to microbial encroachment. **Nature,** v.4, n.1, 2011.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J.L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J.B. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, n.26, p.15196-15201, 1999.

STONE, K.D.; ZHANG, H.Z.; CARLSON, L.K.; DONNENBERG, M.S. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Molecular Microbiology**, v.20, p.325-337, 1996.

STOUT, R.D.; JIANG, C.; MATTA, B.; TIETZEL, I.; WATKINS, S.K.; SUTTLES, J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. **Journal of Immunology**, v.175, p.342-349, 2005.

SUTTERWALA, F.S.; FLAVELL, .R.A. NLRC4/IPAF: a CARD carrying member of the NLR family. **Clinical Immunology**, v.130, n.1, p.2-6, 2009. [3th Al-Ain International Immunology Meeting].

SUTTERWALA, F.S.; MIJARES, L.A.; LI, L.; OGURA, Y.; KAZMIERCZAK, B.I.; FLAVELL, R.A. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. **Journal of Experimental Medicine**, v.204, p.3235–3245, 2007.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **International Immunology**, v.17, p.1-14, 2005.

TARR, C.L.; WHITTAM, T.S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of the pathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.479-487, 2002.

TEMBLAY, J.N.; BERTELLI, E.; ARQUES, J.L.; REGOLI, M.; NICOLETTI, C. Production of IL-12 by Peyer patch-dendritic cells is critical for the resistance to food allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.120, n.3, p.659-665, 2007.

TING, J.P.; LOVERING, R.C.; ALNEMRI, E.S.; BERTIN, J.; BOSS, J.M.; DAVIS, B.K.; FLAVELL, R.A.; GIRARDIN, S.E.; GODZIK, A.; HARTON, J.A.; HOFFMAN, H.M.; HUGOT, J.P.; INOHARA, N.; MACKENZIE, A.; MALTAIS, L.J.; NUNEZ, G.; OGURA, Y.; OTTEN, L.A.; PHILPOTT, D.; REED, J.C.; REITH, W.; SCHREIBER, S.; STEIMLE, V.; WARD, P.A. The NLR gene family: a standard nomenclature. **Immunity**, v.28, n.3, p.285-287, 2008.

TOLEDO, M.R.F.; ALVARIZA, M.C.B.; MURAHOVSCHI, J.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infection and Immunity**, v.39, p.586–589, 1983.

TOSI, M.F. Innate immune responses to infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.116, p.241-249, 2005.

TRABUSI, L.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.508-513, 2002.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistence and adaptative immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.133-146, 2003.

TURVEY, S.E.; BROIDE, D.H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.125, p.24-32, 2010.

ULSHEN, M.H.; ROLLO, J.L. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism. **New England Journal of Medicine**, v.302, n.2, p.99-101, 1980.

VALLANCE, B.A.; FINLAY, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.16, p.8799-8806, 2000.

VIDAL, J.E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARRO-GARCÍA, F. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Salud Pública de México**, v.49, n.5, p.376-386, 2007.

VIEIRA, M.A.M.; ANDRADE, J.R.; TRABULSI, L.R.; ROSA, A.C.; DIAS, A.M.; RAMOS, S.R.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A.T. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of nonenteropathogenic E. coli (EPEC) serogroups that carry eae and lack the EPEC

adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.762–772, 2001.

VILJANEN, M.; PELTOLA, T.; JUNNILA, S.; OLKKONEN, L.; JARVINEN, H.; KUISTILA, M.; HUOVINEN, P. Outbreak of diarrhoea due *Escherichia coli* O11:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. **Lancet**, v.336, p.381-384, 1990.

YU, J.; KAPER, J.B. Cloning and characterization of the eae gene of enterohemorragic *Escherichia coli* O157:H7. **Molecular Microbiology**, v.6, p.411-417, 1992.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.4-8, 2007.

WHALE, A.D.; HERNANDES, R.T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHÜLLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIEIRA, M.A.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A.D.; GOMES, T.A.; HAYASHI, T.; FRANKEL G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 – a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.153, p.1743-1755, 2007.

WITTIG, B.; ZEITZ, M. The gut as an organ of immunology. **International Journal of Colorectal Disease**, v.18, n.3, p.181-187, 2003.

ZACHOVA, K.; KRUPKA, M.; CHAMRAD, I.; BELAKOVA, J.; HORYNOVA, M.; WEIGL, E.; SEBELA, M.; RASKA, M. Novel modification of growth medium enables efficient *E. coli* expression and simple purification of an endotoxin-free recombinant murine Hsp70 protein. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.7, p.727–733, 2009.

ZHANG, W.L.; KOHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SEURBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.4486-4492, 2002.

ZHOU, X.; GIRON, J.A.; TORRES, A.G.; CRAWFORD, J.A.; NEGRETE, E.; VOGEL, S.N.; KAPER, J.B. Flagelin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukine-8 production in T84 cells. **Infection and Immunity**, v.71, p.2120-2129, 2003.

8. ANEXOS

Anexo A. Comissão de Ética

Anexo B. Currículo Lattes

Anexo C. Ficha do Aluno

Anexo A. Comissão de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/26/2010

São Paulo, 13 de abril de 2010.

Ilmo(a). Sr(a)
Daniela Bastos Mourão
Orientador: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 12 de abril de 2010, apreciou o projeto "Estudo da resposta inflamatória de 'Escherichia coli' enteropatogênica mediada por intimina, 'bundle-forming pilus' (BFP)" (Protocolo CEUA nº 271) apresentado por Vossa Senhoria, e resolveu apenas tomar ciência do mesmo, tendo em vista que o experimento já foi aprovado pela Comissão de Ética do Instituto Butantan, cujo certificado de aprovação deverá ser apresentado no depósito da tese.

Entretanto, caso algum procedimento do experimento com os animais venha acontecer nesta Faculdade, esta Comissão deverá reapreciar o projeto, antes do início do uso dos animais, bem como, deverá ser comunicada qualquer alteração no projeto ou intercorrência na utilização dos animais.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, nº 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 - Fax (11) 3091-3677 - e-mail: majo@usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN
Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo da resposta inflamatória de *Escherichia coli* enteropatogênica mediada por intimina, *bundle-forming pilus* (BFP), flagelina e lipopolissacarídeos (LPS)", protocolo nº **537/08,** sob a responsabilidade de Roxane Maria Fontes Piazza e Daniela Bastos Mourão, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de **08/10/2008.**

We certify that the research entitled "Study of the inflammatory response of enteropathogenic *Escherichia coli* mediated by intimin, *bundle-forming pilus* (BFP), and flagelin lipopolissacaride (LPS) ", protocol nº 537/08, under the responsability of Roxane Maria Fontes Piazza and Daniela Bastos Mourão, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 10/08/2008.

Vigência do Projeto: 10/2008 – 10/2010	**Nº de animais/espécie**
	15 / camundongo C3H/HeJ - fêmea

São Paulo, 10 de outubro de 2008.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan