



UFAM



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA**

**ANÁLISE INVESTIGATIVA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
CEPAS SELVAGENS DE *SHIGELLA* SPP. *IN VIVO* E SEU
POTENCIAL INFLAMATÓRIO.**

PAULA TAQUITA SERRA

MANAUS - AMAZONAS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA

PAULA TAQUITA SERRA

ANÁLISE INVESTIGATIVA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
CEPAS SELVAGENS DE *SHIGELLA* SPP. *IN VIVO* E SEU
POTENCIAL INFLAMATÓRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração "*Biologia de Agentes Patogênicos*".

Orientadora: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Co-Orientador: Dr. Luis André Morais Mariúba

MANAUS - AMAZONAS

2013

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

T175a Taquita Serra, Paula
ANÁLISE INVESTIGATIVA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
CEPAS SELVAGENS DE SHIGELLA SPP. IN VIVO E SEU
POTENCIAL INFLAMATÓRIO. / Paula Taquita Serra. 2013
114 f.: il. color; 29,7 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi
Coorientador: Luis André Morais Mariúba
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Shigella. 2. Cepa Clínica. 3. M90T. 4. PCR-Array. 5. Resposta
Imune. I. Orlandi, Patrícia Puccinelli II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

PAULA TAQUITA SERRA

**ANÁLISE INVESTIGATIVA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE
CEPAS SELVAGENS DE *SHIGELLA SP. IN VIVO* E SEU POTENCIAL
INFLAMATÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração "*Biologia de Agentes Patogênicos*".

APROVADA EM: 04/09/2013

BANCA EXAMINADORA

**Profa Dra. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi, Presidente
Centro de Pesquisas Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia**

**Dra. Aya Sadahiro, Membro Interno
Universidade Federal do Amazonas - UFAM**

**Dr. Valerio Monteiro Neto, Membro Externo
Centro Universitário do Maranhão - CEUMA**

*“Aos meus familiares: Aos antigos,
minha mãe Ivana e meu pai Elycio;
Aos novos, meu esposo Diogo, meus
pais Laíse e Edison, e ao Daniel”.*

Dedico

Agradecimentos

À **Deus**, agradeço sempre por me ajudar a entender os caminhos difíceis;

Ao meu futuro esposo **Diogo**, agradeço pela paciência e companheirismo. Tua luta também é a minha, e eu sei que sofremos juntos em todas as etapas do caminho;

À minha “filha” **Nina**, agradeço seu companheirismo e devoção de quatro patas que me ajudou tanto nos períodos difíceis;

A minha família antiga, minha mãe **Ivana** e meu pai **Elysio**. Agradeço por fazerem de mim a pessoa de hoje, graças a vocês nunca esqueci quem sou;

A minha família nova, **Laíse**, **Edison** e **Daniel**. Não poderia pensar em pessoas melhores, obrigada por todo apoio que vocês nos têm dado nesta nova caminhada. Não existe medida para mensurar minha gratidão;

Aos meus companheiros de mestrado **Andréa**, **Allyson**, **Edilene**, **Helaine Juliana** e **Luciana**. Era da vontade de Deus que nossas vidas se cruzassem, e tenho certeza que não teria suportado percorrer este caminho sem vocês. Obrigado pelos momentos de sanidade, pelos momentos de loucura e principalmente por terem me dado o prazer de chama-los de *amigos*;

Aos meus companheiros de laboratório **Andréia Santa-Rita**, **Joyce “Pulsefield”**, **Maria Carolina**, **Davi**, **Yury**, **Ivanildes** e **Karen**. Pelo apoio, conversas e lutas diárias;

Aos técnicos de laboratório **Paty** e **Dona Jura**, obrigada por compreender nossas necessidades e facilitar nosso dia-a-dia no laboratório;

As minhas amigas **Sara**, **Lara**, **Denise**, **Antonia** e **Júlia**. Eu sempre tive o apoio de todas vocês. Obrigada por serem a rocha que me prende no mundo real;

A minha orientadora **Dra. Patrícia Orlandi**. Percorremos um caminho longo, e meu “eu” na pesquisa foi moldado pela senhora. Muito obrigada por tudo;

Ao meu Co-Orientador **Dr. André Mariúba**. Obrigada pelos conselhos, auxílios e companheirismo. Acima disso, obrigada pela amizade;

Aos professores **Dra. Maria Cristina dos Santos** e **Dr. Paulo Afonso Nogueira**, pelos conselhos valiosos em relação ao projeto;

Ao **Dr. Dario Zamboni** e **Dr. Marcelo Pereira** da USP de Ribeirão Preto. Obrigada por todo apoio e auxílio. O conhecimento obtido foi essencial a este estudo;

Ao **Dr. Milton Moraes** e **Tiana Brito** da FIOCRUZ – RJ. Obrigada por me ajudarem a não desanimar mesmo frente a resultados negativos. O apoio de vocês foi inestimável;

Ao **Dr. Marcelo Ribeiro-Alves** da FIOCRUZ – RJ, por me ajudar a trabalhar com dados e compreendê-los. Obrigado por toda a compreensão;

A **Suelen, Maria Lucia** e **Carol** do Laboratório de Hanseníase FIOCRUZ-RJ. Vocês me forneceram apoio no momento de maior necessidade. Isso nunca será esquecido;

Ao **Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada** (PPGIBA) pela base fornecida, obrigada pelo incentivo;

A **Fundação Oswaldo Cruz** (FIOCRUZ) ILMD. Obrigada pela estrutura física e laboratorial;

A **CAPES**, agradeço pelo apoio financeiro fornecido no decorrer deste projeto.

“...Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer, mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher...”

William Shakespeare

RESUMO

Introdução: Shigelose é uma disenteria bacilar causada pela *Shigella*, um patógeno Gram negativo e intracelular. Um dos modelos animais mais comuns para avaliar a resposta imune da *Shigella* é a infecção pulmonar em camundongos devido a fácil manipulação e similaridade com as respostas intestinais. Neste estudo, nós levantamos a hipótese de como cepas clínicas isoladas de pacientes com shigelose possuem expressão de resposta imune diferencial quando comparados com cepas padrões (M90T). Nossa principal proposta foi analisar quatro cepas de *Shigella* clínicas com diferentes genes de virulência e a cepa padrão M90T quanto as respostas imunes após invasão murina em 24 e 48h. **Métodos:** Cepas clínicas de *Shigella* foram selecionadas pela presença de genes de virulência específicos por PCR. *Primers* relacionados ao sistema imune foram desenvolvidos. As cepas clínicas e a padrão foram submetidas à análise de expressão gênica pelo Fluidigm (*Bioamark Platform*). Os resultados foram analisados em programa estatístico R. **Resultados:** Nós agrupamos os mRNA em cinco grupos: Pró Inflamatórios (CXCL15, IL-1 β , IL-6, IFN- β , TNF- α), Anti Inflamatórios (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), Resposta Inata (NOD 1, NOD 2, TLR4 e TLR9), Resposta adaptativa (Th1-like, IFN- γ , IL-17A e IL-17B) e Macrófago (NOS, H2 -A β 1, H2-E β , H2-K1, MHC-like 2). Como principais resultados, todas as amostras clínicas demonstraram uma expressão mRNA em 24h de infecção que foi gradativamente aumentado após 48h, enquanto a cepa padrão M90T teve a regulação oposta com taxas de mRNA em 48h, sugerindo grandes diferenças entre as respostas a cepas clínicas e a padrões bem caracterizados. A cepa clínica #5 não alterou a expressão de mRNA em 24 e 48h nos genes da resposta adaptativa, sugerindo baixas taxas de invasão e controle do hospedeiro nas etapas iniciais da infecção. A cepa clínica #11 demonstrou alta atividade macrofágica devido a maior expressão de IFN- γ e NOS. A cepa #14 e #27 demonstraram um possível potencial de proteção Th1 devido a alta expressão mRNA para MHC-like II e Th1 quando comparado a outras cepas e o controle positivo. A presença de alta expressão de IL-17 na cepa #27 relação com células Th17. O potencial imunológico da cepa #27 pode ter relação com as enterotoxinas (*shET1A*, *shET1B* e *shET2*). A presença do conjunto completos destas enterotoxinas foi confirmado na cepa #27 por PCR. **Conclusão:** As diferenças entre cepas clínicas e padrões foram evidentes neste estudo. Cepa clínica 27 parece ser uma ótima candidata para estudos futuros e pode prover novas perspectivas para as diferenças de invasão e resposta imune vista nos hospitais.

Palavras-chave: *Shigella*; Cepa Clínica; M90T; PCR-Array; Resposta Imune.

ABSTRACT

Introduction: Shigellosis is a bacillary dysentery caused by *Shigella*, a gram-negative intracellular human pathogen. One of most common animal models to evaluate *Shigella*'s immune response is mice pulmonary infection due easy manipulation and similar gut responses. At this study, we have hypothesized how clinical strains isolated from Shigellosis patients had differential immune response expression when compared to standards strains (M90T). Our main proposition was analyze four clinical *Shigella* strains with distinct virulence genes and M90T immune responses at murine invasion after 24 and 48h infection. **Methods:** *Shigella* Clinical Strains were selected through presence of specific virulence genes by PCR. *Primers* related to immune system were designed. Clinical strains and M90T *Shigella* were submitted to expression at Fluidigm (*Bioamark Platform*). Results were analyzed in statistical software R. **Results:** We grouped analyzed mRNA in five gene sets: Pro Inflammatory (CXCL15, IL-1 β , IL-6, IFN- β , TNF- α), Anti Inflammatory (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), Innate Response (NOD 1, NOD 2, TLR4 e TLR9), Adaptive Response (Th1-like, IFN- γ , IL-17A e IL-17B) and Macrophage (NOS, H2 -A β 1, H2-E β , H2-K1, MHC-like 2). As main results, all clinical strains displayed a moderate mRNA expression in 24h infection which gets higher in 48h, while M90T standard had opposite regulation with lower mRNA rates in 48h infection, suggesting major differences between well characterized standards and clinical strains. Clinical strain #5 did not alter mRNA expression in 24 and 48h at adaptive immune response genes, suggesting low invasion rates and host control at initial steps of infection. Clinical strain #11 demonstrates high macrophage activity by superior expression levels of IFN- γ and NOS. Strains #14 and #27 suggest potential of Th1 protection through high MHC-like II and Th1 mRNA expression when compared to all other strains and standard control. Presence of IL-17 high expression in strain #27 demonstrates a possible relation with Th17 cells. The immunological potential of strain #27 may have relationship with *Shigella* enterotoxins (*shET1A*, *shET1B*, and *shET2*). Enterotoxins presence was confirmed by PCR and results shows this complete set is absent in all other strains studied. **Conclusion:** The differences between clinical strains and standards were evident at this study. Clinical strain 27 appears as a great candidate to future studies and may provide new perspectives about differences among invasion and immune response seen in the clinical practice.

Keywords: *Shigella*; Clinical Strains; M90T; PCR-Array; Immune Response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Incidência de Shigellose por região geográfica (1984-2005). Países que contribuíram para os dados de incidência: China, Tailândia, Egito, Bangladesh e Brasil.	20
Figura 02: Desenho esquemático do mecanismo de invasão da <i>Shigella</i>	23
Figura 03: Mapa da localização da Ilha de Patogenicidade da <i>Shigella flexneri</i> de 30kb necessária para a entrada celular (em vermelho) e escape de macrófagos (em verde)	24
Figura 04: Desenho esquemático da ação do Sistema de Secreção Tipo 3 (T3SS)	25
Figura 05: Esquema da invasão e disseminação lateral pela <i>Shigella</i> , em evidência os genes bacterianos regulados.....	26
Figura 06: Desenho experimental do estudo.....	30
Figura 07: Placa de 96 reações de expressão gênica do Fluidigm	35
Figura 08: Camundongos Balb/C após 48h de infecção em evidência a alteração da pelagem, inoculação realizada em dezembro de 2012	42
Figura 09: Equipamento homogeneizador de tecido Power Gen 125 da Fisher Scientific.....	43
Figura 10: Contagem bacteriana de alíquotas de pulmão após 24h de infecção	44
Figura 11: Contagem bacteriana de alíquotas de pulmão após 48h de infecção	44
Figura 12: Comparação entre a contagem bacteriana após 24 e 48h de infecção ..	45
Figura 13: Camundongos Balb/C após 48h de infecção em evidência a alteração da pelagem	47
Figura 14: Camundongos Balb/C após 48h de infecção em evidência os olhos	48
Figura 15: Poder.....	50
Figura 16: Gel desnaturante com produto da extração de RNA pelo método de Trizol [®]	51
Figura 17: Quadro de cores representando a variação da expressão gênica das amostras.....	53
Figura 18: Representação gráfica da média de expressão geral dos <i>primers</i> agrupados no Cluster 1	54
Figura 19: Representação gráfica da média de expressão geral dos <i>primers</i> agrupados no Cluster 2	54

Figura 20: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Pró-Inflamatórios.....	57
Figura 21: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Anti-Inflamatórios.....	58
Figura 22: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Imunidade Inata.....	59
Figura 23: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Imunidade Adaptativa.....	60
Figura 24: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Macrófago	61
Figura 25: Gráficos exemplificando a amplificação inespecífica e específica	62
Figura 26: Representação da porcentagem de amplificação entre os genes de virulência de <i>Shigella</i>	63
Figura 27: Representação da Média de Δ CT entre as amostras de <i>Shigella</i>	64
Figura 28: Representação número de amplificações por Grupo/Tempo	65
Figura 29: Desenho esquemático da modulação da resposta imune por M90T.....	76
Figura 30: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 5	77
Figura 31: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 11	78
Figura 32: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 14	79
Figura 33: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 27	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Descrição das amostras selecionadas para o estudo.....	36
Tabela 02: Lista dos genes cromossomais selecionados e <i>primers</i> desenvolvidos .	37
Tabela 03: Lista dos genes plasmidiais selecionados e <i>primers</i> desenvolvidos.....	38
Tabela 04: Lista dos genes regulatórios selecionados e <i>primers</i> desenvolvidos.....	39
Tabela 05: Lista dos genes da resposta do camundongo selecionados e <i>primers</i> desenvolvidos.....	40

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

APC	Célula Apresentadora de Antígeno
B2M	Beta-2-microglobulina
BLAST	<i>“Basic Local Alignment Search Tool”</i>
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
ΔCT	<i>“Delta Cycle Threshold”</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H	Hora
H2 - Aβ1	Histocompatibilidade 2 antígeno A β 1
H2 - Eβ	Histocompatibilidade 2 antígeno E β
H2 – K1	Histocompatibilidade 2 região K1
EDTA	<i>“Ethylenediaminetetraacetic acid”</i>
GAPDH2	Gliceraldeído 3-Fosfato Deidrogenase
IC	Intervalo de Confiança
IFN-β	Interferon-beta
IFN-γ	Interferon-gama
IL	Interleucina

LB	Luria Bertani
M	Molar
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	<i>“National Center for Biotechnology Information”</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
mM	Milimolar
NOD	Domínio de Ligação Nucleotídica
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
PAI	Ilha de Patogenicidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-Array	Reação em Cadeia da Polimerase em Array
PCR-Real Time	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
pH	Potencial Hidrogeniônico

PMN	Células Polimorfonucleares
POP	Protocolo Operacional Padrão
RNA	Ácido Ribonucleico
T3SS	Sistema de Secreção Tipo III
Tampão TE	Tampão Tris-EDTA
Th1	Linfócitos T Helper 1
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador-beta
TLR	Receptores Semelhantes à Toll
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TNF-β	Fator de Necrose Tumoral-beta
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
2D	Duas Dimensões

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 <i>Shigella spp</i>	19
2.2 Mecanismos de Invasão da <i>Shigella spp.</i> e Respostas Imunológicas do Hospedeiro	21
2.3 Fatores de virulência da <i>Shigella spp.</i>	24
2.4 Modelos Animais para Estudos Imunológicos com <i>Shigella spp.</i>	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Cepas Bacterianas	29
4.2 Desenho Experimental.....	29
4.3 Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal	30
4.4 Seleção e Desenvolvimento dos Iniciadores.....	30
4.5 Modelo Animal.....	32
4.5.1 Inoculação Intranasal em Camundongos Balb/C	32
4.6 Amplificação no Equipamento Fluidigm – PCR-Array	33
4.6.1 Extração e Purificação do mRNA.....	33
4.6.2 Síntese do cDNA	34
4.6.3 Diluição dos Iniciadores e Pré-Amplificação das Amostras	34
4.6.4 Montagem das Amostras em Placa do Fluidigm e Amplificação.....	34
4.7. Análise dos Resultados.....	35
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO	66
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS e PERSPECTIVAS FUTURAS	76
CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	98
Anexo 01 – Aceite Comitê de Ética em Experimentação Animal	98

Anexo 02 – Aceite Comitê de Ética em Pesquisa.....	99
Anexo 03 – POP Desenho de <i>Primer</i>.....	100
Anexo 04 – Artigo de Revisão.....	106

INTRODUÇÃO

A *Shigella* é uma bactéria gram-negativa e intracelular, responsável pelo desencadeamento da Shigellose, uma doença diarréica caracterizada pela presença de muco e sangue. O gênero compreende quatro espécies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei* (sorogrupos A, B, C e D, respectivamente), assim caracterizadas com base nas diferenças de seus antígenos de superfície (SANSONETTI, 2001).

Desde sua descoberta, em 1898, vários estudos têm sido realizados para desvendar os mecanismos por trás da virulência deste gênero e as respostas no hospedeiro. Estudos sobre prevalência, sorotipagem e resistência a antibióticos tem sido realizados em várias regiões do Brasil, porém para a região Norte, estes estão limitados aos estados do Pará (BASTOS et al., 2012; BASTOS e LOUREIRO, 2010; LINHARES, 1992) e Rondônia (SILVA et al., 2008; ORLANDI et al., 2001).

Durante os anos de 2007 a 2009 nosso grupo de pesquisa realizou um grande estudo epidemiológico envolvendo a coleta de fezes de 1500 crianças com quadro diarreico severo, atendidas em Hospitais Públicos de Manaus - AM. Dentre os patógenos identificados, 36 isolados foram positivos para *Shigella*, sendo que identificação sorológica mostrou que a *S. flexneri* foi a espécie mais frequente (65%), seguida pela *S. sonnei* (20%), *S. boydii* (12.5%) e *S. dysenteriae* (2.5%).

A tipagem molecular dos genes de virulência destas amostras revelou uma associação da subunidade da proteína *shET-1B* com complicações relacionadas a desidratação e do gene *ipaH* com febre e presença de sangue nas fezes. O fator de virulência mais frequentemente encontrado foi o *ipaBCD*, seguido do *ipaH*. Esta relação da sintomatologia dos pacientes com a presença de determinados fatores de virulência encontrados neste estudo, nos levou a questionar se haveria variabilidade na resposta do hospedeiro frente a estas cepas clínicas e quais genes de virulência estariam expressos durante este processo invasivo (CRUZ et al., 2014).

Muitos estudos visando esta abordagem imunológica são realizados com cepas padrão, uma vez que elas possuem o seu genoma bem caracterizado, possibilitando fácil reprodutibilidade. Para a *Shigella*, um dos principais padrões utilizados é a *S. flexneri* 5a M90T, cepa com a qual os conhecimentos sobre a virulência e perfil invasivo deste gênero foi descoberto (SELGE et al., 2010; SCHNUPF e SANSONETTI, 2012; KONRADT et al., 2011; SPERANDIO et al., 2008;

MANTIS et al., 1996). Porém, há ausência de estudos que utilizem cepas clínicas com esta finalidade.

Este estudo se propôs a avaliar a influência de diferentes perfis de virulência de cepas selvagens de *Shigella* em modelo murino, levando em consideração tanto os mecanismos que são utilizados pela bactéria, quanto à resposta do hospedeiro a este patógeno.

Levando em conta este panorama, tivemos como objetivo desenhar um perfil de ação das *Shigellas* selvagens co-relacionadas a resposta do hospedeiro.

Acreditamos que o conhecimento do comportamento de cepas com diferentes perfis de virulência e o efeito destas *in vivo* é de essencial importância para o conhecimento da patogenia de uma doença. Além disto, diferenças entre cepas padrões e selvagens devem ser investigadas em relação as suas formas de atuação e utilização de mecanismos específicos para a caracterização de cepas regionais e desenvolvimento de vacinas efetivas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Shigella* spp.

As doenças diarreicas destacam-se como uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, particularmente nos países em desenvolvimento onde vivem dois terços da população mundial (ARAYA et al., 1986; SANSONETTI, 2001).

De acordo com o “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*”, as células bacterianas do gênero *Shigella* apresentam-se como bastonetes retos, de morfologia similar aos outros membros da família Enterobacteriaceae. Estes microrganismos são patógenos intracelulares, gram-negativos, imóveis, não formam esporos, anaeróbios facultativos, com metabolismo fermentativo e oxidativo.

Descrita pela primeira vez, por Shiga, no Japão em 1898, por ocasião de uma grave epidemia de disenteria (GORDON et al., 1965), o gênero consiste em quatro espécies: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei* (MURRAY et al., 1998). Essas espécies são designadas como subgrupos A, B, C e D, contendo cada um deles 15, 8, 18 e 1 sorotipos antigênicos específicos, respectivamente, caracterizados pelo antígeno somático O (ANSARUZZAMAN et al., 1995; COIMBRA et al., 1999) e por padrões de restrição em rRNA (COIMBRA et al., 2001). Em geral *S. sonnei* e *S. boydii* causam uma diarreia mais branda que as espécies de *S. flexneri* e *S. dysenteriae* (RAM et al., 2008).

O gênero *S. flexneri* é o mais comumente encontrado em países em desenvolvimento, com os sorotipos 1b, 2a, 3a, 4a e 6. Nos países desenvolvidos, são encontrados *S. flexneri* 2a e *S. sonnei* (KOTLOFF et al., 1999); *S. boydii* possui seus casos limitados à Índia e a *S. dysenteriae* é considerada rara e permanece ausente nos estudos atuais (SANSONETTI, 2006).

A Shigellose é endêmica em muitos países em desenvolvimento. Dos 80 milhões de casos de diarreia sanguinolenta e 700 mil mortes por ano, cerca de 99% ocorrem em países em desenvolvimento, com maior parte dos casos (aproximadamente 70%) e mortes (cerca de 60%) em crianças menores de 5 anos de idade (WHO, 2005).

A grande maioria dos casos ocorre em áreas onde as condições higiênic-sanitárias são precárias ou inexistentes e a rota fecal/oral efetiva. Nestes locais,

problemas relacionando doenças infecciosas e a má-nutrição, são responsáveis por altas taxas de mortes de recém-nascidos e de graves atrasos de crescimento. Com a diminuição da resistência a outras infecções, a criança poderá entrar em um ciclo vicioso de infecções e de má nutrição que com o tempo pode tornar-se fatal (NIYOGI, 2005; RAM et al., 2008).

Apesar de ser associada a países em desenvolvimento, surtos de Shigellose também são descritos em países desenvolvidos, como em creches na Inglaterra (MAGUIRE et al., 1998), hortaliças como alface e salsa (Europa e Estados Unidos) (NAIMI et al., 2003; KAPPERUD et al., 1995) e contato com água contaminada em Oregon, Estados Unidos (KENEE et al., 1994).

Em uma revisão realizada por Ram et al. (2008) foi elaborado um levantamento sobre a incidência de *Shigella* em países com média a baixos índices de desenvolvimentos entre os anos de 1984 a 2005. Os estudos abordaram 11 estudos populacionais de sete países (**Figura 01**).

Neste estudo, o Brasil foi caracterizado como região de média incidência com 10 a 100 casos a cada 1000 habitantes. Em 2005, a *S. sonnei* foi a mais frequentemente isolada, esta predominância de *S. sonnei* sob *S. flexneri* reflete a expansão econômica a qual o Brasil vem passando (RAM et al., 2008).

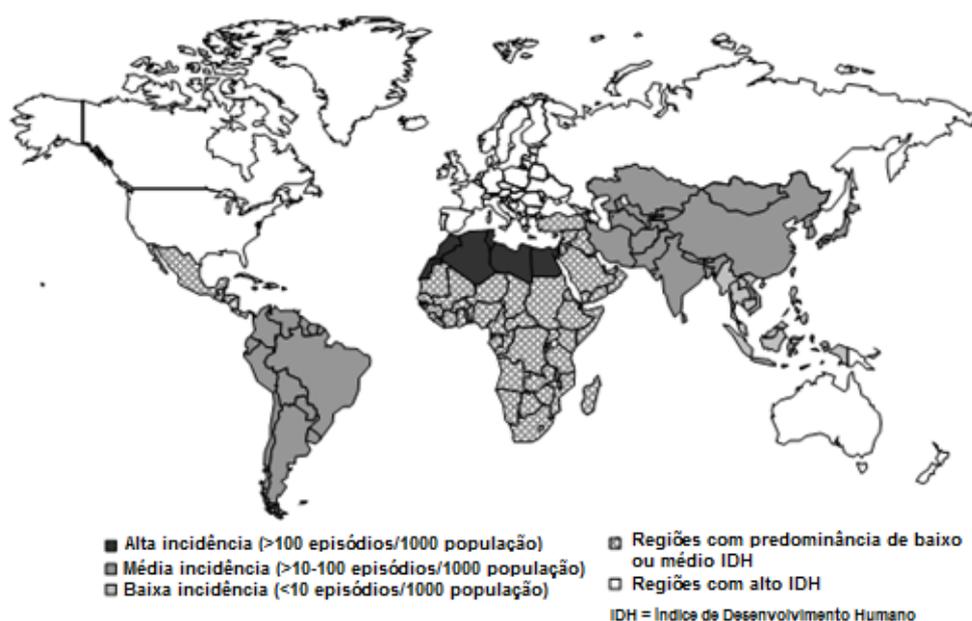


Figura 01: Incidência de Shigellose por região geográfica (1984-2005). Países que contribuíram para os dados de incidência: China, Tailândia, Egito, Bangladesh e Brasil. **Fonte:** Adaptado de Ram et al., 2008.

No Brasil, numerosos estudos foram realizados sobre a etiologia das diarreias infantis, principalmente entre populações do sul do país (ANGELINI et al., 2009; MEDEIROS et al., 2001; MURRAY e LOPEZ, 1997; LIMA et al., 1992; GOMES et al., 1991; SCHORLING et al., 1990). Porém, nas regiões Norte e Nordeste, os estudos são mais escassos.

No Nordeste, um estudo foi realizado no Ceará com 26 amostras de *S. flexneri* coletadas de 1989 a 1993, encontrando associação com multirresistência a antibióticos em grande parte das amostras (SIDRIM et al., 1998)

No Norte, três estudos realizados no Pará merecem destaque: Um estudo com grupos indígenas onde foram isoladas espécies de *Shigella*, entre outros enteropatógenos (LINHARES, 1992); A caracterização de resistência de cepas isoladas entre 1990 a 2000, identificando a *S. flexneri* como a mais frequente e a presença de cepas multirresistentes (BASTOS e LOUREIRO, 2010); A frequência de sorotipos de *S. flexneri* isolados de 1979 a 2009, colocando a *S. flexneri* 2a como a mais frequentemente isolada (BASTOS et al., 2012).

Ainda na região Norte, o gênero *Shigella* foi descrito em Porto Velho, como sendo o terceiro agente etiológico de diarreia infantil com uma frequência em torno de 8% dos casos nas populações infantis periféricas (ORLANDI et al., 2001). Em estudos posteriores estes casos foram caracterizados com relação ao sorotipo e genes de virulência tendo a *Shigella flexneri* como a mais frequente e os genes *ipaH* e *ipaBCD* presentes em quase todos os isolados (SILVA et al., 2008).

Na região Amazônica, durante o período de 2007 a 2009 foi realizado um estudo epidemiológico no qual de 1500 crianças atendidas com quadro diarreico grave em Hospitais Públicos de Manaus – AM, 36 isolados (2,4%) foram positivos para *Shigella*, com a frequência de sorotipos: *S. flexneri* (65%), *S. sonnei* (20%), *S. boydii* (12.5%) e *S. dysenteriae* (2.5%) (de Souza, et al., 2013, em publicação).

2.2. Mecanismos de Invasão da *Shigella* spp. e Respostas Imunológicas do Hospedeiro

O mecanismo de patogenicidade de *Shigella* é tipicamente por processo invasivo, ao nível do íleo e cólon (PIECKERING, 1979). As cepas de *Shigella*

possuem resistência natural ao ácido do estômago em certas fases do crescimento. Estudos *in vitro* demonstraram uma taxa de sobrevivência de 10% em 2h de exposição a pH 2,5 (GORDEN e SMALL, 1993). Esta capacidade tem relação com a baixa taxa de inóculo (10-100 UFC) necessária para desencadear a doença em humanos, motivo pelo qual a Shigellose é considerada altamente infecciosa (JENNISON e VERMA, 2007; KOTLOFF et al., 1999).

Este fenótipo também pode ser expresso em situações de anaerobiose como a encontrada posteriormente no cólon. Assim a *Shigella* pode passar ileso pelo ácido do estômago em uma forma latente e alcançar o intestino delgado, cujo pH oscila entre levemente básico a neutro, onde ela retoma o seu crescimento (JENNISON e VERMA, 2004).

O processo invasivo inclui, assim, basicamente a interiorização das células epiteliais, a multiplicação intracelular e disseminação para células adjacentes e tecidos conectivos. A infecção é tipicamente aguda e a sistematização é rara (GROSS et al., 1984). Quando uma quantidade suficiente de células contíguas são lisadas, há uma erosão superficial na parede do intestino, ou uma ulceração. Os neutrófilos que se acumulam em grandes quantidades na mucosa, são eliminados nas fezes (JENNISON e VERMA, 2004).

No processo invasivo, a *Shigella* adere à membrana da célula do epitélio intestinal, e em seguida invade a mucosa do epitélio através das células M (Células epiteliais membranosas), especializadas na transcitose de macromoléculas e microrganismos e susceptíveis a invasão. Estas células sofrem um desarranjo no citoesqueleto facilitando o escape da bactéria às células fagocíticas presentes nos agregados linfóides localizados abaixo do epitélio (HATHAWAY e KRAEHENBUHL, 2000; WASSEF et al., 1989).

Após a invasão, as *Shigellas* são liberadas na lâmina própria, onde elas são fagocitadas por macrófagos residentes. A *Shigella*, no entanto, possui a capacidade de escapar dos macrófagos através de um mecanismo mediado por proteínas de seu plasmídeo de invasão (*ipa*). Como resposta, os macrófagos liberam IL-1 β e IL-8 produzindo uma resposta inflamatória acentuada e provocando recrutamento dos neutrófilos (PHALIPON e SANSONETTI, 2007).

Esta resposta celular inicial aumenta acentuadamente à medida que o número de bactérias e invasões subsequentes ocorram, sendo responsável pela manifestação clínica da doença. Esta resposta leucocitária é uma parte crucial à

patogênese da *Shigella*. Os neutrófilos que se acumulam em grandes quantidades na mucosa, são eliminados nas fezes (JENNISON e VERMA, 2004; SANSONETTI, 2001; SUZUKI e SASAKAWA, 2001; JENSEN et al., 1998) (**Figura 02**).

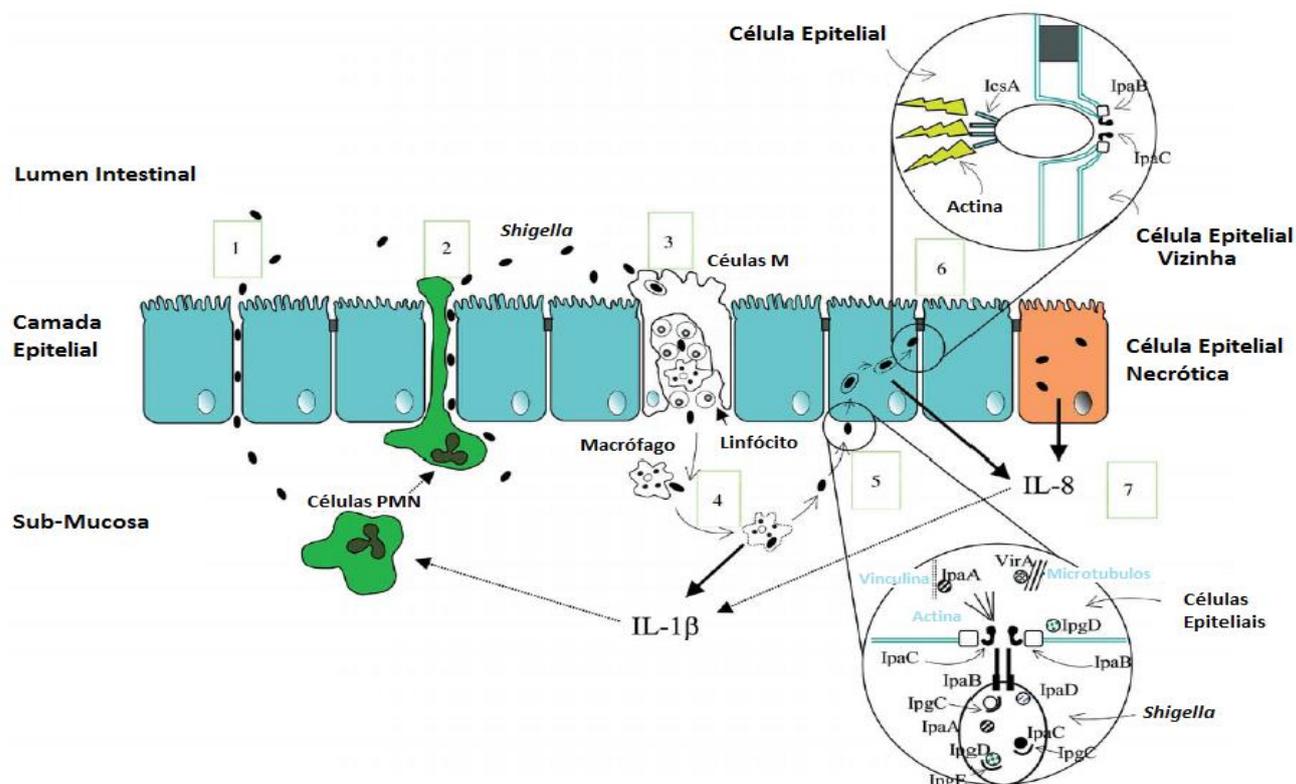


Figura 02: Desenho esquemático do mecanismo de invasão da *Shigella*.

Fonte: Adaptado de Jennison e Verma, 2004.

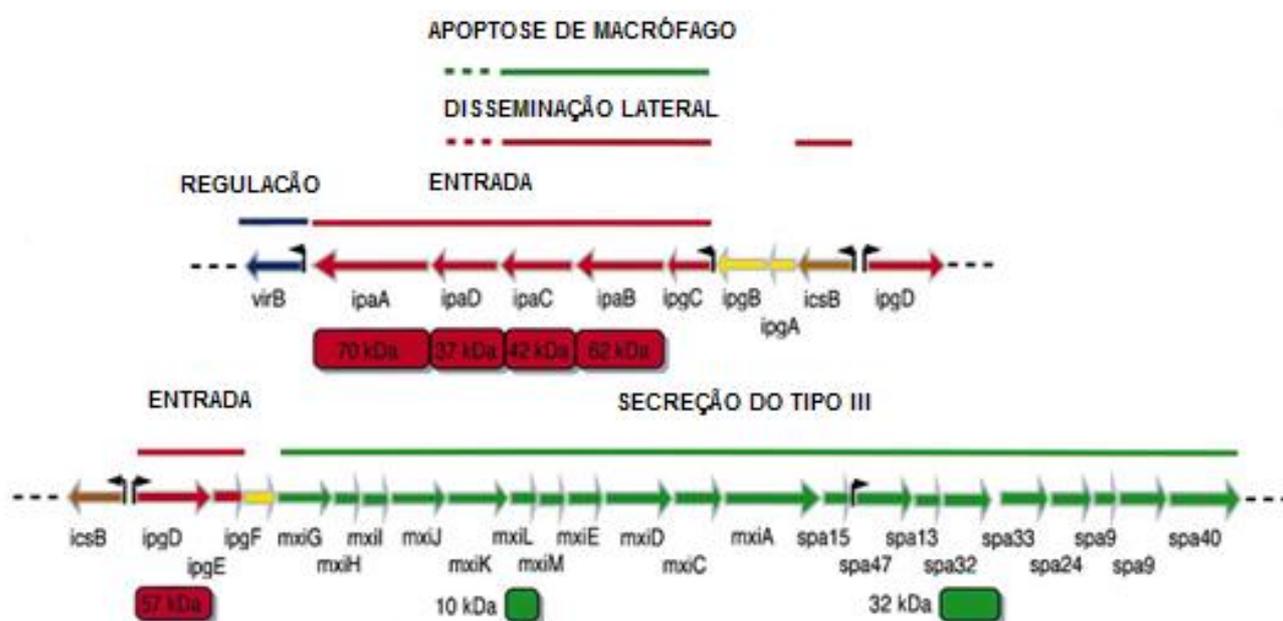
A *Shigella* intracelular também induz a liberação de IL-8 pelas células epiteliais que juntamente com a IL-1 β liberada por macrófagos induzem as células PMN (Células Polimorfonucleares, Neutrófilos) a migrarem para as camadas epiteliais do lúmen. Estas células possuem um papel no controle da infecção, confinando as bactérias extracelulares na mucosa e prevenindo a invasão do tecido e disseminação lateral. Isto causa o afastamento da área lateral pelo rompimento das junções oclusivas das células epiteliais, deixando-as expostas e amplificando a invasão por *Shigella* (PHALIPON e SANSONETTI, 2007) (**Figura 02**).

A imunidade inata gerada pela *Shigella* é caracterizada pela indução de inflamação aguda com grande recrutamento neutrofílico, podendo persistir por meses. Em humanos, análise de expressão de citocinas em fase aguda demonstrou grande regulação de pró-inflamatórios IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e TNF- β ; e anti-inflamatórios: IL-10 e TGF- β (RAQUIB et al., 1995). Além disso, podem também ser

encontrados IFN- γ e IL-4 em menor quantidade. Todas estas citocinas estão relacionadas, além dos sintomas clínicos, com o controle da infecção (PHALIPON e SANSONNETI, 2007; JENNISON e VERMA 2004).

2.3. Fatores de virulência da *Shigella* spp.

A entrada e disseminação lateral em uma infecção por *Shigella* são eventos regulados por proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS) que por sua vez são codificados, entre outros, pelos genes plasmidiais. O Locus *Mix-spa* é o principal representante da Ilha de Patogenicidade (PAI) da *Shigella flexneri*, sendo sua presença necessária e suficiente para a invasão e escape do sistema imune (MARVIS et al., 2002; SANSONETTI, 2001) (**Figura 03**).



SHIGELLA FLEXNERI (30KB) "ILHA DE PATOGENICIDADE" NO PLASMÍDEO DE VIRULÊNCIA

Figura 03: Mapa da localização da Ilha de Patogenicidade da *Shigella flexneri* de 30kb necessária para a entrada celular (em vermelho) e escape de macrófagos (em verde).

Fonte: Adaptado de Sansonetti, 2001.

Os genes pertencentes à Ilha de Patogenicidade da *Shigella* são ativados após o primeiro sinal indutor que ocorre no contato com a célula alvo levando a formação de profusões ao redor da bactéria que são lisados por *IpaB* e *IpaD*. *IpaC* polimeriza actina, *IpgD* dissocia a membrana do esqueleto de actina, *VirA* desestabiliza os microtubulos e *IpaA* formam um complexo com vinculina, despolimerizando a actina (**Figura 04**) (SANSONETTI, 2001; DEMERS et al., 1998; HIGH et al., 1992; VAN NHIEU e ISBERG, 1991).

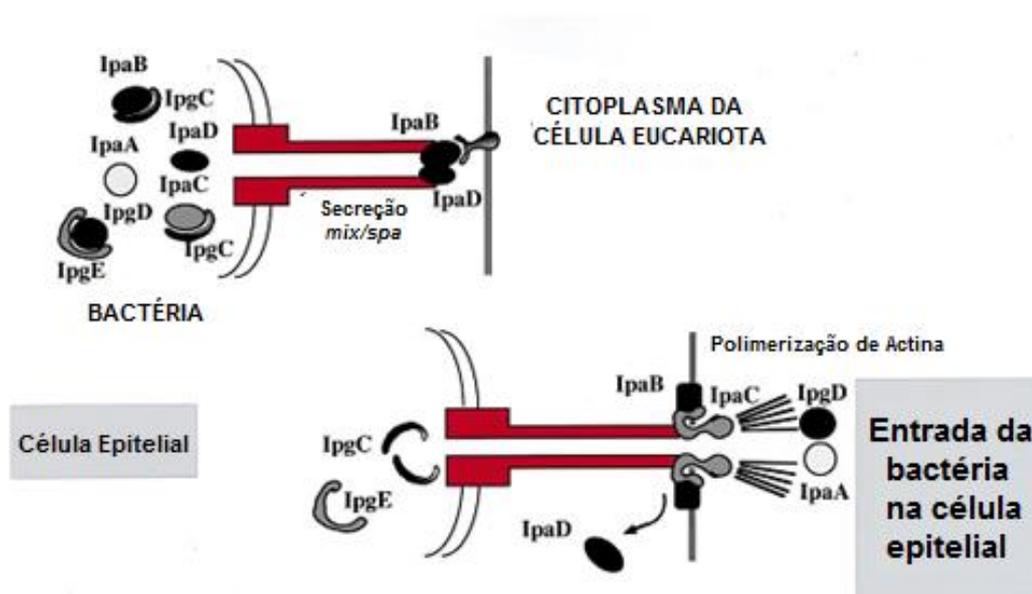


Figura 04: Desenho esquemático da ação do Sistema de Secreção Tipo 3 (T3SS).

Fonte: Adaptado de Sansonetti, 2001.

Após a invasão nas células epiteliais, a *Shigella* induz uma massiva reorganização do citoesqueleto e provoca a formação de um vacúolo macropinocítico, o que facilita a entrada e o crescimento intracelular de *Shigella* tão logo ela lise o vacúolo endocítico (PHALIPON e SANSONETTI, 2007).

O escape para o citoplasma é seguido de um processo de motilidade actina-dependente que leva a bactéria a passar para as células adjacentes. Na presença de macrófagos, várias proteínas são injetadas no citoplasma da célula hospedeira, neste caso, *IpaB* é responsável pelo processo apoptótico da célula-alvo (SANSONETTI, 2001) (**Figura 05**).

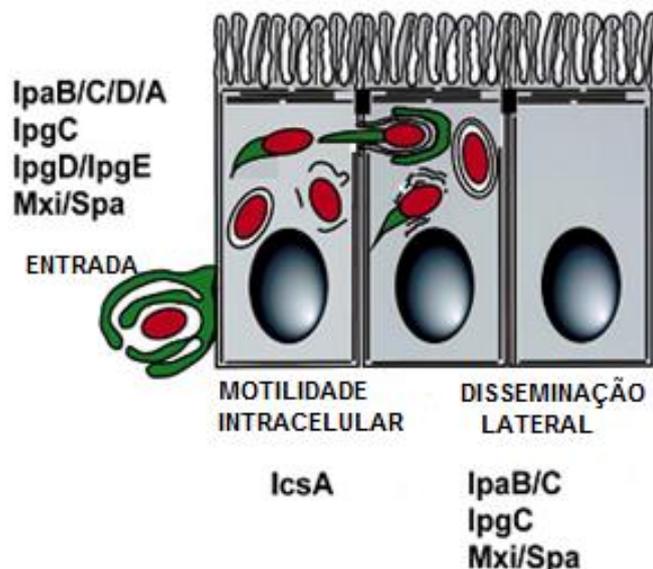


Figura 05: Esquema da invasão e disseminação lateral pela *Shigella*, em evidência os genes bacterianos regulados. **Fonte:** Adaptado de Sansonetti, 2001.

2.4. Modelos Animais para Estudos Imunológicos com *Shigella* spp.

Dentre os principais modelos animais utilizados para a caracterização do comportamento da *Shigella* em estudos *in vivo* podemos citar: O modelo de infecção pulmonar em camundongos, que aborda aspectos da imunidade inata e adaptativa (VAN DE VERG et al., 1995); A ligação ileal do intestino de coelhos, modelo utilizado para observação de alterações morfológicas e migração celular (SANSONETTI et al., 1996); Inoculação oral em camundongos recém-nascidos para a verificação de indução de citocinas em intestinos imaturos (FERNANDEZ e SANSONETTI, 2003); Inoculação retal em porquinho-da-índia para a verificação de indução de citocinas em testes com vacinas (SHIM et al., 2007); Inoculação oral em macacos, os únicos a mimetizar a infecção em humanos (FORMAL et al., 1984).

A espécie *Mus musculus* é um dos modelos de laboratório mais utilizados em experimentos científicos, uma vez que a endogamia entre estes animais permite o aumento da reprodutibilidade experimental. Os roedores adultos infectados por via oral com *Shigella* não desenvolvem uma doença, uma vez que esta não possui a

capacidade de colonizar o trato intestinal ou provocar a doença em roedores semelhante à causada em humanos (VAN DE VERG et al., 1995).

Dentre as principais hipóteses para a ausência da manifestação da doença em intestino de camundongos estão possíveis defeitos em algumas etapas que levam a inflamação aguda e a ausência do recrutamento de neutrófilos, essenciais para a manifestação clínica da doença (PERDOMO et al., 1994).

Apesar disto, camundongos infectados por via intranasal com *Shigella* sp. podem desenvolver uma bronco-pneumonia aguda caracterizada por um maciço infiltrado neutrofílico, simulando a infecção aguda durante a Shigellose. O epitélio pulmonar é um epitélio colunar simples com transição ao epitélio cubóide nos sacos alveolares, contendo ocasionais folículos linfóides ou agregados de folículos que são semelhantes às Placas de *Peyer* (PHALIPON e SANSONETTI, 2007; VAN DE VERG et al., 1995).

Assim, o brônquio constitui uma superfície mucosa, com algumas características semelhantes ao epitélio intestinal. Como o intestino, o pulmão é um órgão linfóide com células apresentadoras de antígenos (APC's) (PHALIPON e SANSONETTI, 2007). Além disso, a resposta imunológica local e sistêmica à infecção por *Shigella* pode ser avaliada com precisão após a inoculação intranasal, uma vez que o hospedeiro nunca obteve contato com antígenos de *Shigella*, e há ausência de microbiota, sendo este o modelo escolhido para ser utilizado em vários estudos (CESINI et al., 2003; RAQUIB et al., 1997; VAN DE VERG et al., 1995), bem como em modelos de testes para vacinas (FENNELLY et al., 1999; MALLETT et al., 1995).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Caracterizar e comparar o potencial inflamatório de cepas selvagens de *Shigella* spp. com diferentes perfis de virulência, em modelo murino.

3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar quatro cepas bacterianas de *Shigella* com diferentes perfis de virulência para a realização do estudo;
- Pesquisar as sequências gênicas e construir os *primers* referentes à expressão gênica bacteriana e resposta imune do camundongo;
- Realizar a infecção em tecidos pulmonares de camundongos utilizando cepas de *Shigella* com diferentes perfis de virulência;
- Identificar o perfil de expressão da resposta imune do hospedeiro no tecido pulmonar após a infecção;
- Verificar o perfil de expressão gênica bacteriana durante a invasão;
- Propor um modelo esquemático de invasão para cada cepa analisada.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Cepas Bacterianas

As cepas de *Shigella* utilizadas neste estudo foram provenientes de um estudo etiológico realizado nos anos de 2007 a 2009, com 1500 crianças de 0 a 10 anos atendidas nos Hospitais da Criança das Zonas Leste, Oeste e Sul em Manaus, Amazonas (CRUZ et al., 2014). Deste estudo foi organizada uma bacterioteca pela Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi na Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Leônidas e Maria Deane (FIOCRUZ – ILMD).

As amostras positivas para *Shigella* spp. foram caracterizadas por metodologias clássicas, resistência a antibióticos e metodologias moleculares. Oito genes de virulência de *Shigella* (*ipaBCD*, *ipaH*, *ial*, *virF*, *EVT*, *shET1A*, *shET1B* e *shET2*) e dois genes que também podem ser encontrados em *Escherichia coli* (*uidA* e *invE*) foram utilizados para sua caracterização por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. O sequenciamento da região 16S também foi realizado para a classificação das cepas de *Shigella* em espécies e confirmação da identificação bioquímica. Deste estudo, quatro amostras foram selecionadas com diferentes perfis de virulência.

Os controles escolhidos foram: a cepa padrão M90T de *Shigella flexneri* subtipo 5 como controle positivo, a qual passou pelos mesmos testes submetidos às amostras clínicas para a confirmação de sua capacidade de invasão; e o controle negativo, a utilização de solução salina a 0,75M.

4.2. Desenho Experimental

Este estudo possui dois grandes objetivos complementares: Identificar quais são os principais genes de virulência bacterianos modulados durante a infecção *in vivo*; e avaliar como o hospedeiro reage frente a estes diferentes fatores de virulência. O ponto chave deste estudo foi a utilização de cepas clínicas, que comprovadamente desencadearam a doença em crianças, e a comparação com um padrão de invasão bem caracterizado. A técnica escolhida foi o PCR-Array, que permite a variabilidade de escolha dos genes que serão analisados e qualifica e quantifica sua expressão. Neste estudo, também nos propusemos a considerar as

variações de expressão no tempo de infecção, aqui determinado como 24h e 48h (Figura 06).

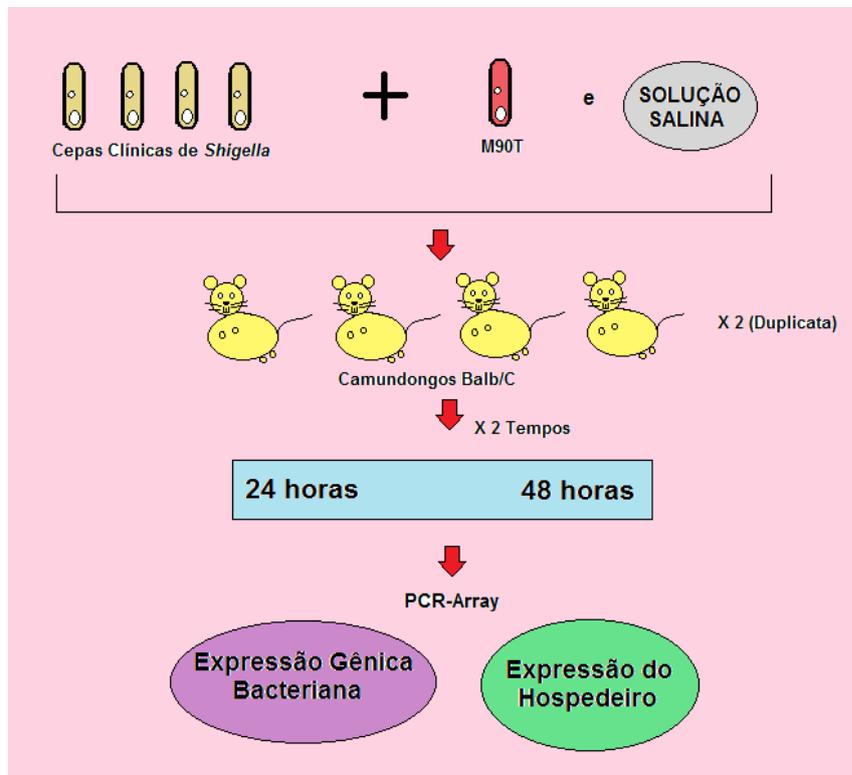


Figura 06: Desenho experimental do estudo.

4.3. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, sob o Protocolo No. 104/2012 – CEEA/UFAM, em reunião ocorrida em 11 de janeiro de 2013 (**Anexo 01**).

As cepas utilizadas neste estudo obtiveram a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, sob o Protocolo No. 266/2006, em reunião ocorrida em 15 de março de 2007 (**Anexo 02**).

4.4. Seleção e Desenvolvimento dos Iniciadores

Dois grupos de genes foram desenvolvidos: os referentes aos fatores de virulência da bactéria e os relacionados à resposta imune do hospedeiro frente ao desafio bacteriano. Os genes bacterianos foram desenvolvidos com base nas

sequências disponíveis no banco de dados online de Yang et al., (2006) (<http://www.mgc.ac.cn/ShiBASE/>). Os fatores de virulência relacionados neste banco de dados possuem sequências referentes à região gênica das quatro espécies bacterianas de *Shigella*. Desta forma, quando selecionada, as sequências daquela região passaram por um processo de alinhamento usando o programa livre ClustalW2 disponível online no sítio <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> para a verificação se a sequência escolhida abrangia todas as espécies de *Shigella*.

Os genes da resposta imunológica foram selecionados com base em revisões da literatura (SERGE et al., 2010; PHALIAPON e SANSONETTI, 2007; JENNISON e VERMA, 2004; SANSONETTI, 2001) e suas sequências foram obtidas no banco de dados online “MGI – Mouse Genomics Informatics” disponível na URL <http://www.informatics.jax.org/batch>.

A verificação de expressão gênica necessita da presença de genes constitutivos que possam servir como normalizadores de expressão. Estes normalizadores devem ser expressos da mesma forma independente das condições experimentais. Foram selecionados os genes de camundongo GAPDH2 e B2M como normalizadores da resposta imunológica (SCHNITTGEN e ZAKRAJSEK, 2000). Para a *Shigella*, a pesquisa bibliográfica apontou algumas sugestões de genes normalizadores sem, no entanto, possuir um padrão bem definido como no caso do gene de camundongo. Desta maneira, vários possíveis candidatos a normalizadores foram testados. Os possíveis normalizadores escolhidos foram *ipa`s* (ZHAO et al., 2011); *gyrB* (CHOI et al., 2007; FUKUSHIMA et al., 2002); *ipgD* e *mixA* (LAN et al., 2004).

Após escolhidas às sequências, os *primers* foram desenvolvidos seguindo as instruções do Protocolo Operacional Padrão (POP) desenvolvido pela Plataforma de Microarranjo e Nanotecnologia (**Anexo 03**).

Desta forma, a sequência alvo desejada foi analisada no programa gratuito *Primer 3* disponível na URL <http://frodo.wi.mit.edu/>, com alterações dos parâmetros *default*. A faixa de tamanho do produto (*Product Size Range*) para 90 - 150 pares de bases; O parâmetro *Max 3' Stability* que determina o número de bases C ou G que será permitido entre as últimas 5 bases dos *primers*, devendo iniciar com o valor 7 que permite que apenas 1 C ou G seja colocado nesta região; A modificação dos parâmetros *Max Self Complementarity* (MSC), *Max 3' Self Complementarity* (M3SC) e *Max Poly-X* que influenciam na capacidade dos *primers* formarem dímeros e

grampos, os valores foram de MSC = 5, M3SC = 2 e M3SC = 3. Após submeter estas informações, o programa sugere conjuntos de possíveis iniciadores para a região desejada. Para comprovar sua eficácia, no entanto, os primers devem ser verificados no *Primer* BLAST do NCBI.

No *Primer* BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foi realizada a simulação do desempenho do *primer*, como um PCR virtual: Os iniciadores indicados pelo *Primer* 3 foram colocados no *Primer* BLAST; Na seção “*Primer Parameters*” foi escolhido o organismo para o qual os iniciadores são destinados; E o “database” foi modificado para “nr”. Após a busca, foi esperado que a primeira entrada fosse o gene de interesse com um anelamento perfeito. Após esta análise, o *primer* foi sintetizado.

4.5. Modelo Animal

4.5.1. Inoculação Intranasal em Camundongos Balb/C

A inoculação intranasal ocorreu no Laboratório de Patogenicidade Microbiana e Imunidade Inata da Universidade de São Paulo – USP – de Ribeirão Preto, sob a coordenação do Dr. Dario Zamboni e auxílio do Dr. Marcelo de Souza Fernandes Pereira.

A reativação das cepas bacterianas foi realizada com o crescimento em 5 ml de caldo de soja Luria Bertani (LB - Himedia) sendo incubadas a 37°C por 24 horas sob agitação.

A inoculação intranasal foi realizada em conformidade com o descrito por Cersini et al., (2003), com algumas modificações. Foram inoculadas por via intranasal 20µl de suspensões em Solução Salina a 0,9% (NaCl) contendo 10⁹ UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de cada cepa bacteriana em camundongos Balb/C fêmeas com 7 semanas de idade. Antes da inoculação, os camundongos foram anestesiados via intramuscular de 60 a 80mg de ketamina (Dopalen, Vetbrands) em associação com 8 a 15mg de xilazina (Anasedan, Vetbrands) ambas por kg e realizada a assepsia local com etanol 70% conforme recomendado por Paiva et al., (2005).

O procedimento teve um total de 48 camundongos: Quatro amostras clínicas e dois controles, totalizando 6 inóculos; Cada amostra teve 4 replicatas biológicas e foram analisadas em dois tempos distintos (24 e 48h), com 24 camundongos por

tempo (**Figura 06**).

Após 48h de infecção, os camundongos sofreram eutanásia de acordo com a resolução 1000/2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, através do deslocamento cervical, precedida de anestesia, para a retirada do tecido pulmonar.

Imediatamente seguida a eutanásia, os pulmões referentes a cada amostra foram armazenados em solução *RNAlater*[®] (*Invitrogen, Life Technologies, USA*) em freezer -80°C até o uso, conforme recomendações do fabricante.

4.6. Amplificação no Equipamento Fluidigm – PCR-Array

O equipamento Fluidigm (*Bioamark Platform*) em chip de expressão gênica 96.96 possibilita a análise simultânea em 96 amostras em 96 pares de *primers*, similar a tecnologia microarray, mas com a mobilidade da escolha dos iniciadores como em um PCR-Real Time.

Os procedimentos referentes ao Fluidigm ocorreram em colaboração com a Plataforma de Microarranjo e Nanotecnologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro sob a coordenação do Dr. Milton Ozório de Moraes e auxílio da estudante de pós-graduação Tiana Rosa de Brito.

4.6.1. Extração e Purificação do mRNA

Para a extração de RNA, fragmentos do tecido pulmonar foram separados e congelados de maneira rápida em gelo seco com etanol. Quando completamente congelados, estas amostras foram trituradas com o auxílio do Potter, um macerador de metal, mantido congelado durante todo o processo. Depois de triturado, os fragmentos foram extraídos com o reagente *Trizol*[®] (*Invitrogen, Life Technologies, USA*) seguindo as instruções do fabricante.

Realizada a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 e uma alíquota de 150ng de RNA foi submetida à eletroforese em gel desnaturante a verificação da integridade do RNA.

Confirmada a extração e integridade, as amostras passaram por um tratamento com *Ambion*[®] *Turbo*TM *DNase* (*Life Technologies, USA*) seguindo as instruções do fabricante e uma nova quantificação em espectrofotômetro para a avaliação do rendimento da reação.

4.6.2. Síntese do cDNA

A síntese da fita complementar de DNA (cDNA) foi realizada conforme descrito por Guerreiro et al., (2013). O cDNA foi produzido através da amplificação por Transcriptase Reversa (RT-PCR) com 100ng do RNA total em amplificação com a enzima Superscript III Reverse Transcriptase (*Invitrogen, Life Technologies, USA*), seguindo instruções do fabricante.

Para a amplificação dos genes da resposta do hospedeiro, as amostras foram amplificadas com *Primer* oligo (dT); Para os genes da bactéria, foi utilizado o *Random Primer*.

O produto da reação sofreu diluição 1:5 (20µl da amostra + 80µl de água de ampola) e foi montado em uma Placa de Amostra.

4.6.3. Diluição dos Iniciadores e Pré-Amplificação das Amostras

Todos os primers analisados foram diluídos para a concentração de 20nm e 5µl de cada iniciador foram separados em um tubo formando um pool de *primers* com o qual cada cDNA foi pré-amplificado em termociclador convencional, utilizando o *TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems®, Life Technologies, USA)* visando aumentar a taxa de detecção das amostras. A programação do termociclador foi: 95° por 10 minutos; 15 ciclos de 95° por 15 segundos e 59° por 4 segundos; 4° por 1 hora. Terminada a pré-amplificação, foram adicionadas as amostras 20µ de Tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, com pH 8,0).

4.6.4. Montagem das Amostras em Placa do Fluidigm e Amplificação

Foram realizados todos os procedimentos pré-posicionamento das amostras no chip: Teste do equipamento; Condições ideais de temperatura; Mix de amplificação contendo *TaqMan® Gene Expression Master Mix* com a sonda *Eva Green I (Applied Biosystems®, Life Technologies, USA)* que foi adicionado a cada par de *primer*; Migração do óleo que ajuda no posicionamento da amostra.

As amostras foram posicionadas na placa de reação no espaço destinado (**Figura 07**), seguindo as especificações do fabricante, e o cDNA (**B**) e os *primers* (**A**) migraram para o chip de amplificação (**C**) no equipamento Fluidigm IFC

Controller HX. Após o posicionamento, as amostras foram amplificadas no equipamento Biomark Microfluidic System. Terminada a corrida, a qualidade das amostras foi analisada no software do equipamento e os dados brutos exportados.

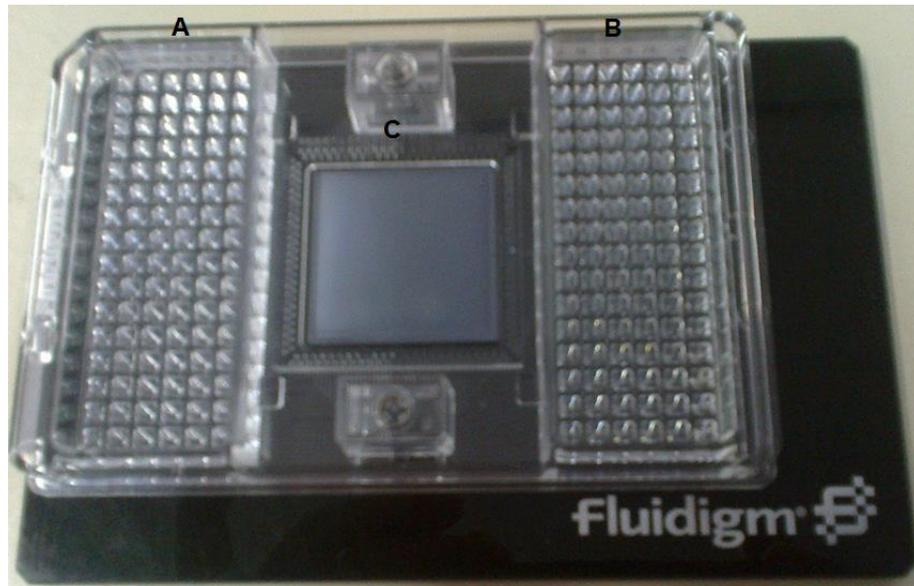


Figura 07: Placa de 96 reações de expressão gênica do Fluidigm. **A** – Primers; **B** – Amostra; **C** – Chip onde ocorre a reação.

4.7. Análise dos Resultados

Os resultados foram analisados no programa de bioinformática “R” versão 2.9.22 (*R Development Core Team*, 2009), com o auxílio do Dr. Marcelo Ribeiro-Aves (FIOCRUZ – RJ), onde foi realizada a validação das amostras que obtiveram boa emissão de fluorescência durante a amplificação; exclusão das amostras que apresentaram valores de CT (*cycle threshold*) < 0,5, que poderiam influenciar nas amostras boas, diminuindo seus valores; e exclusão dos genes que não tiveram bom rendimento da amplificação. Os dados foram apresentados usando mapas de calor (Heatmaps) em 2D (SALVAGE, 2010) demonstrando intensidade de expressão e gráficos de barras para visualização dos perfis de tempo (24 e 48h).

5. RESULTADOS

5.1. Definição das Cepas Bacterianas

As quatro cepas clínicas em estudo foram selecionadas a partir de 36 amostras de *Shigella* provenientes de um estudo etiológico realizado entre os anos 2007 e 2009 (CRUZ et al., 2014). Todas as amostras demonstraram a capacidade de invasão em células cultivadas *in vitro*. Os critérios de seleção foram observados quanto à presença e ausência de genes chaves relacionados à virulência por PCR convencional e confirmação da espécie de *Shigella* por sequenciamento da subunidade 16S do RNA ribossomal. As amostras selecionadas estão listadas na **Tabela 01**.

Tabela 01: Descrição das amostras selecionadas para o estudo

No.	Ref.	Espécie (16S)	Genes de Virulência
05	837	<i>S. flexneri</i>	<i>ipaBCD, shet1A, shet1B, ial, evt e uidA</i>
11	192	<i>S. boydii</i>	<i>ipaBCD, shet1B, ial, virF, evt, invE e uidA</i>
14	183	<i>S. sonnei</i>	<i>ipaBCD, ipaH, shet1A, ial e uidA</i>
27	201	<i>S. flexneri</i>	<i>ipaBCD, ipaH, shet1A, shet1B, shet2, ial, virF e uidA</i>

5.2. Pesquisa e construção dos primers em estudo

Os genes alvos para a análise da expressão gênica bacteriana foram selecionados a partir do banco de dados genético – shiBASE - para espécies de *Shigella* online proposto por Yang et al., (2006).

O equipamento Fluidigm pode realizar a análise simultânea de 96 genes, sendo este o valor limite de genes que poderiam ser desenvolvidos neste estudo. Desta forma, foram definidos 70 genes para a análise da expressão bacteriana e 24 para a análise da expressão do hospedeiro.

Os genes de expressão bacteriana foram divididos em genes cromossomais (24), plasmidiais (25) e regulatórios (21). Os genes selecionados estão listados na **Tabela 02, 03 e 04** e foram desenvolvidos seguindo o POP preconizado pela Plataforma de Microarranjo e Nanotecnologia (FIOCRUZ-RJ) (**Anexo 03**).

Tabela 02: Lista dos genes cromossomais selecionados e *primers* desenvolvidos.

Gene	Sense	Anti-sense	Função
ycjW	AGTGTTACGGGCCATTGAAG	GGTCGAACGGGTAGAAATCA	Shiga Toxina
stxB	CGACGCCTGATTGTGTAAC	CGCACTGAGAAGAAGAGACTGA	Shiga Toxina
set1B	CTCCTGTCATTACGGTGTC	TCGGATAACAGCCATATCAC	shET 1
set1A	ACATCCATATTCCCGGTCAG	GGGAGTTTGTGGCATGAAC	shET 1
senB	GCGTCCCTGCGTATCAGTAT	TCGGAATCCTGGCTGTAAAC	shET 2
Pic	ACGGACGGATATGACCTGAC	TAAGTGTGATGCCGCAGAG	Serina Protease
sigA	CCGGAACCCTGACATTAACA	CCTTTAACGTGGCACCATCT	Serina Protease
iucB	GTTTTTGATGCAGAGCGTGA	ACCTCCAGTGAGCCACTTTG	Aerobactina
iutA	CCAGTACGGCATGAAACTGA	CCTGAGCCAGATCGAAGAAC	Aerobactina
iroN	GGAAACCCGCGAGTGAAGATA	GCCGACATTAAGACGCAGAT	Receptor Sideróforo
iroD	CATGGGTGAGTGAGCATCTG	GTGAAGCTGCTGAACGTGAG	Receptor Sideróforo
sitB	TGCTTGTCTCAACGCACAAT	CTCCAGGTTCTCGGCTGTAA	ABC transportador
sitC	CATTGGCATTCTCTCGATCA	CGACAGCAGGGTGAAGAAG	ABC transportador
ShuW	AAACGGCATCACCTCGTAAG	GAATCAGGGCGTCGGTATAA	Receptor Hemina
SD1241 e SF1193	TGGCGCATGAATTTACTCAC	TTATGCCCGCTATTGCTACC	ABC transportador
ipaH	TCGTGCGGAGGTTTCTACAC	GCAGAGACGGTATCGGAAAG	ipaH
yadA-like	ACGGTAAAGCCAGCATCATC	TTGGGTGTTCTGCTCAATCA	Adesina Putativo
clp-like	ATTATTCTGCGGGTCTGTC	CAGCACATCAATCGCTTTGT	Chaperona Putativo
lcmF-like	TACGGCCTGCAAAGCTATTT	CATTGCGGGTGAGGTTAAGT	Proteína Membrana Interna
RTX-like	CAGTAACGAGACGGCACAAA	ATCACCCGCACCTGATAGAG	Exo proteína
SDY0416	TTGGCGATATTGTGCAACAG	ACCAGCGGTTTATTGCTCAC	Sistema de Transporte
gspD	TCTGGTCGATGTGCTGAAAC	GGCGATGGATACAACCTCAC	T2SS
gspC	AGTGCGCCAGTTGAGATAACC	AATTCCTCCTTACGCACAG	T2SS
gspH	TTACGCTGCGCTTCTACTCA	TCATGGCATCCTCTCATCAC	T2SS

Tabela 03: Lista dos genes plasmidiais selecionados e *primers* desenvolvidos.

Gene	Sense	Anti-sense	Função
mxi-sparegion	TGTCTGAGGCAAAGAACTCAA	TTCTATCGTCCGTCGAGAA	Invasão e internalização
ipaA	CGTGTTTCCTGAGCTGTTGA	AGGTGTAGGGAGGCCATCTT	Despolimerização de Actina
ipaB	GCAGCGGGTGATGAAGTAAT	CCGCTTGTGTGGCAGAGTTA	Indução de Apoptose
ipaC	CGTGCAACAATGGAAACATC	TTTACTGCTGGCCTGACTGA	Polimerização de Actina
ipaD	TGGAACAATCGGCAAGGTAT	TCGCCATTTCCACCTAGATT	Complexo com IpaB
ipgD	AGAGCTGTTGCTGCTCGTAAT	GTCGGCGTCAGAAGAGAAGT	Desorganização da Membrana
icsB	TGGCCTTGATGAAACAAACA	AAGTGCCATACCAGCACAGTT	Camuflagem de IcsA
virA	CACTGCAATCTCTGCCTCTG	CCTTCACTGCTTGGAAAGTGT	Desestabilização de Microtúbulos
ospF/mkaD	CAGATGCTTTCTGCGAATGA	GGCACGTTGATGCTACTTT	Desconhecido
ipaH7.8	TACCGTCTCTGCACGCAATA	ACACGGTCCTCACAGCTCTC	Escape de Macrófago
ipaH9.8	TACCGTCTCTGCACGCAATA	ACACGGTCCTCACAGCTCTC	Transporte para o Núcleo
ipaH4.5	TCGACTCACGTTCTGCAATC	GGGCGATGGAGTGATTCTG	Desconhecido
ipgB	GGATGCCCGGTGAATATAAA	GGTTCGCTCTTGGCTCATC	Desconhecido
senA	GGACAGGCTGATGCAATCTT	CATCCATTATGCAAGGCTACAA	Secreção de Ion
icsP/sopA	TGTTGGGTTCTTTTCATCTG	CGCAGCAACAGAGCAGTAAT	Clivagem de IcsA
sepA	CTGGGAAACCCGTCAGTTTA	CTTCCATTGGTGGCGTTAAT	Invasão Tecidual
msbB	TTTGGGAATGATTGCAGGTA	CGGGAAACAAAGCGATAAAT	Modificação do O-antígeno
Apy	CCTCAACGTAAAGCGGAAAT	TAAACGCCAGCCTCTACAT	ATP-desforilase
phoN-Sf	GCGGTTATCACTGGCAAAGT	GTGCCTGGAACACAGGATTT	Fosfatase de ácido não específica
rfbU	CCCGTTATTGCTCAGGTAGG	CCCACAATCAACCAACAGAA	Biosíntese do antígeno O
ushA	GGACAATATCCGGCAGAAAAG	TCCACGAATATCGGGTTCAG	UDP hidrolase de açúcar
virF	AAGAGATGGCGTCTTTCTGAT	CAAGAAGGATTTGTTGAAATGTT	Transcrição de virB e icsA
virK	GACCGGAAGGAGAGTTGAT	CTCCCTGTAATCCGCCAATA	Regulação pós-transcricional de icsA
virB	CGAATGTACGCGATCAAGAA	TCTACGAGTGCCATCCAGAA	Ativação de ipa, spa e mxi operons
icsA/virG	TTCCGGTGGTAATGGAGGTA	CGAACGTGCCCTTATTGATT	Nucleação de filamentos de actina

Tabela 04: Lista dos genes regulatórios selecionados e *primers* desenvolvidos.

Gene	Sense	Anti-sense	Função
cpxA	AATCTGGCGGTACAGGATTG	ACCAAATCACCAGCCGTAAA	Sistema de 2 componentes
cpxR	CATCTGGGTCAGGTGGTTTC	ACCACGGGTGACCATCTTTA	Sistema de 2 componentes
gyrA	TACTGAAATCACCGCCAACA	AACGTAGCCCTGGTGAGAGA	DNA topoisomerase
gyrB	ACGCTGCTGTTGACCTTCTT	TGTTCTGCTTGCCTTTCTT	DNA topoisomerase
envZ	ATATGGCGGCTGGTGTTAAG	ATCCTGCTCGCTCATCATCT	Sistema de 2 componentes
ompR	CGTCGCTAATGCAGAACAGA	GCAAATCGACAAGCCATCTT	Sistema de 2 componentes
Hns	CACTTGAAACGCTGGAAGAA	TCAATACCGTCAGCGATCAG	Repressor da transcrição de virB
ihfA	GCCAAAGAAGCTGGTTGAACTG	CGGGCGTTGATTCTTATCAC	DNA ligação proteína, regulação
ihfB	GCCAAGACGGTTGAAGATG	CGCGGTAGTGCAAAGAGAA	Transcrição de virF e virB
yciB	GTTGAGAAGATGGCCCTGAT	CCCGCAAACAGAGCATAAAT	Possível papel na divisão celular
miaA	TACGGACTTGCCTTCCATTC	GCGCAAACACCTCGATAAAC	tRNA N6-isopentiladenosina
Rho	GTGCTGATGGTTCTGCTGAT	CGGGTTCGTCAAAGGTAGAA	Transcrição de virB
stpA	GCGTCCGGCGAAATATAAA	GATCAGGAAATCGTCGAGAGA	Análogo de H-NS
topa	TCGATCATTTGACCATTCA	GCGCGGTAAGTCGTAGTTC	DNA topoisomerase
parC	TATGCTGCTGGCAATCACTC	TGCCGATGGAATGTTGATAA	DNA topoisomerase
parE	CTGGCGATACTGAAGCTGTG	CCTGACGCAGACCATTAACA	DNA topoisomerase
tyrT	GCCAAAGGGAGCAGACTGTA	GAAGTCGATGACGGCAGATT	Tirosil tRNA
vacB	GACCGTCCTGATGCAGAAAT	GACGAATCGGCGAAGTAAAG	Regulador de ipa e icsA
Tgt	TCTTTGATCGTGCGTAGTG	GAAGGTGTTGCCGAGGATAA	Regulador de virF
vacJ	GGTTATGGGCCTTACGTTCA	AAGCGTCCATTTACCCACAG	Necessário a disseminação lateral
MlxE	TGGTGTGTCGGAGGCTTATT	CCATTTACTAACCGCCAAGTG	Proteína AraC-like

Os genes de camundongo foram selecionados com base em pesquisas bibliográficas referentes à resposta imune de *Shigella* (SELLGE et al., 2010; PHALIAPON e SANSONETTI, 2007; JENNISON e VERMA, 2004; SANSONETTI, 2001). Os genes GAPDH2 e B2M foram escolhidos como normalizadores, que independentemente da condição experimental serão expressos da mesma forma,

traçando um padrão de expressão. No total, entre os genes da resposta imune e os normalizadores, temos 26 genes listados na **Tabela 05**.

Tabela 05: Lista dos genes da resposta do camundongo selecionados e *primers* desenvolvidos.

Gene	Sense	Anti-Sense
Nod1	GTTGGACTTCGGTGGTCAGT	TGTCGGACTTCGCTCTTCTT
Nod2	GGTTCTGTGCGTGTCCCTGTT	TCTGTTGTGGGCTCCCTATC
TLR9	CCTGGCTCTCACAGGTTCTC	GCTTCAGCTCACAGGGTAGG
TLR4	TCAGCACTACATCGCCTGAC	GTCAGCTCCACTTTGCATCA
NOS	TCAGGTGCCCTCTAGCACTT	CTGAGGCGACAGAAGGTAGG
Th1-like	GAGAAGCTGGACACGGACAT	GGCTGGGCTAGTGAAGAGTG
IL17A	AGCTGGACCACCACATGAAT	AGCATCTTCTCGACCCTGA
IL17B	GTCCCGTCTGTTCTGTGTT	TCTCTCCTTCCATGCTGTGA
IL6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	TCACAGCCTACCCACCTCTT
IL1B	AGTTCTCCACAGCCACAAT	ACTGCCTGGTTTCTCCACAG
TGF B1	GGCATCTGTGTTAGCGTTGA	TGCCCTGGGTTCTTGTATC
TGF B2	AAGTCAGCGAGGGAACCTCAA	GCTGATCCTGGGAGGTGTAA
TGF B3	GCCTCTGCATCTTCTTGAG	GGAGGCTGGCATAGTCAGAG
TNF Alpha	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	GTGGGTGAGGAGCACGTAGT
IL10	TCCATGACAGCAGGTCAGAG	CAGGAAATGGTTGGTGTTT
INF Alpha 1	ACCCAGCAGATCCTGAACAT	AGACAGCCTTGCAAGTCATT
INF Beta 1	ACCTTTGCACCCTCCAGTAA	TGAACTCCACCAGCAGACAG
INF Gamma	CAGGAGCAGGGAGATGGTAG	TGGAAAGGCAGAAGCAAAGT
MCH-like Leukocyte 1	GGGATACGCCAGACACAGTT	CCTTGTCAGGAGTGGATGT
MCH-like Leukocyte 2	CCGGGTGTGCTAGGTAGGTA	TCCTTACGGTTGGGATTCAG
Histocompatibility 2, A β 1	ACCCGTGATGCCAATTAAG	TAACAAGGCCACCCAGAAAG
Histocompatibility 2, E β	GCAGCCTACAAGGAGGACAG	GACCAGGAGGTTGTGGTGT
Histocompatibility 2, K1, K	TCTCCTTCCCTCCTGAGACA	TGGTCTCCTGATCCCTCATC
Cxcl15 (IL8)	ACCTTGGTCTTCTGCTTGA	ATCGTTGTTCCCATCCACAT

5.3. Padronização da infecção em tecidos pulmonares de camundongos

Foram realizadas inoculações intranasais em dois períodos distintos. A primeira inoculação ocorreu em dezembro de 2012 utilizando 48 camundongos: 4 cepas e 2 controles, totalizando 6 amostras, sendo 4 replicatas de camundongos para cada (24) em dois tempos distintos 24 e 72h (48).

Como resultados deste experimento, os camundongos inoculados com as amostras 11 e 27 apresentaram aspectos físicos similares ao controle positivo, com reações como a pelagem arrepiada e calafrios, principalmente após 48h de infecção. As amostras 05 e 14 assemelharam-se ao controle negativo (**Figura 08**).

Após 24h de infecção houve o sacrifício do grupo conforme previsto, porém observamos que após 48h uma cobaia do controle positivo, duas da amostra 11 e uma da amostra 27 foram a óbito devido à infecção, e as cobaias restantes estavam em um estado grave de infecção. Por estes motivos, o segundo tempo de corte foi adiantado de 72h para 48h, tentando evitar a perda do grupo amostral.



Figura 08: Camundongos Balb/C após 48h de infecção em evidência a alteração da pelagem, inoculação realizada em dezembro de 2012. **A** - Controle negativo; **B** – Controle positivo; **C** – Cepa Clínica 05; **D** – Cepa Clínica 11; **E** – Cepa Clínica 14; e **F** – Cepa Clínica 27.

Após a retirada do pulmão, o tecido foi triturado com o auxílio do equipamento homogeneizador de tecido Power Gen 125 da Fisher Scientific (**Figura 09**), com lavagens do equipamento com água esterilizada, etanol 70%, água esterilizada e água livre de nucleases, nesta sequência, entre cada amostra de pulmão. O tecido homogeneizado foi armazenado em 1mL de Trizol® a -20°C e uma alíquota passou

por diluições seriadas para a realização da contagem bacteriana em placa para a verificação da quantidade de bactéria viáveis. As diluições foram de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} .

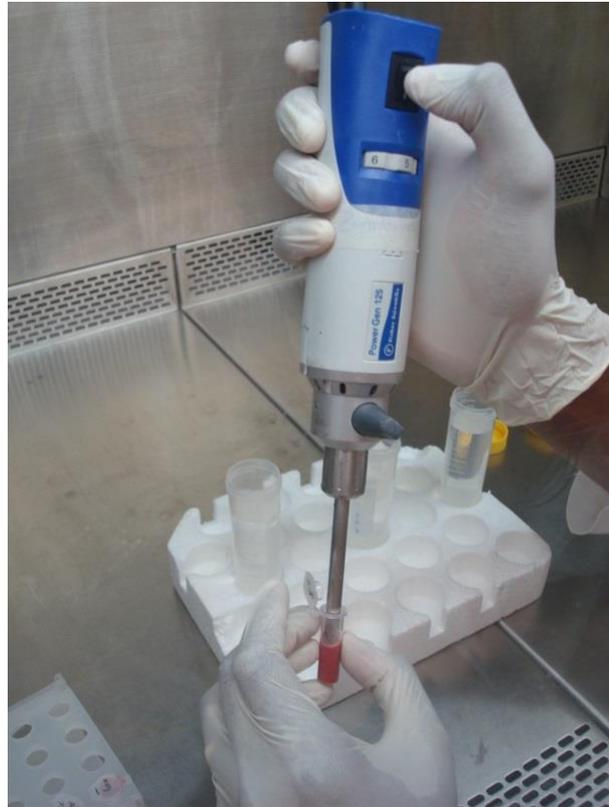


Figura 09: Equipamento homogeneizador de tecido Power Gen 125 da Fisher Scientific

A contagem bacteriana referente ao período de 24h foi realizada com sucesso (**Figura 10**), porém, devido aos imprevistos relacionados ao óbito das cobaias, a contagem de 48h foi realizada de forma descontínua. Nas amostras em que ocorreram os óbitos (Controle positivo, 11 e 27), não foram realizadas as contagens devido à diminuição do número amostral necessário a etapa seguinte de extração de RNA. Nestas amostras, foram sinalizadas o óbito das cobaias (**Figura 11**).

Com esta metodologia, também foi possível definir a quantidade de bactérias que de fato foram inoculadas no pulmão via intranasal através da determinação do Tempo Zero (T0), no qual foram inoculados 10^9 do Controle positivo e seguido pelo sacrifício do camundongo, retirada, trituração e diluição do pulmão para a contagem bacteriana. Os dados deste estudo estão dispostos na **Figura 10**.

T24h

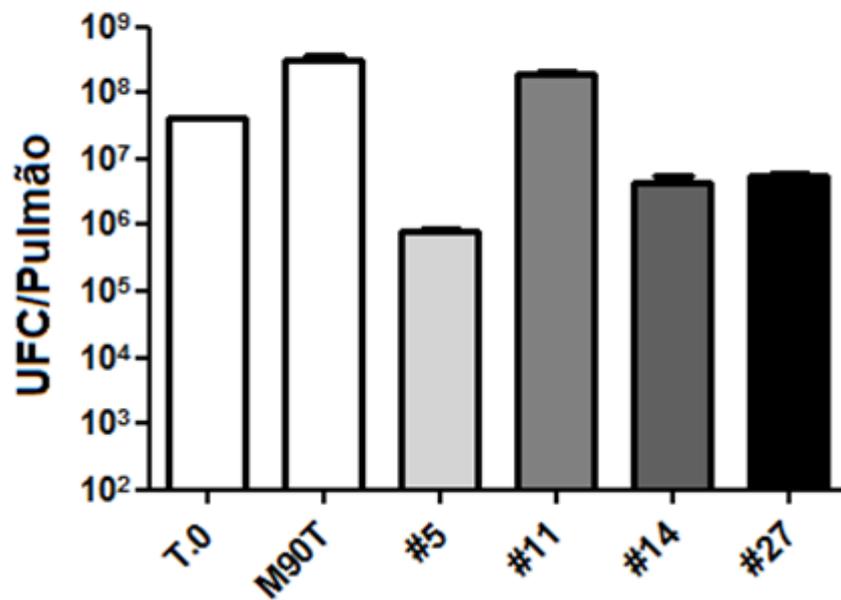


Figura 10: Contagem bacteriana de alíquotas de pulmão após 24h de infecção

T48h

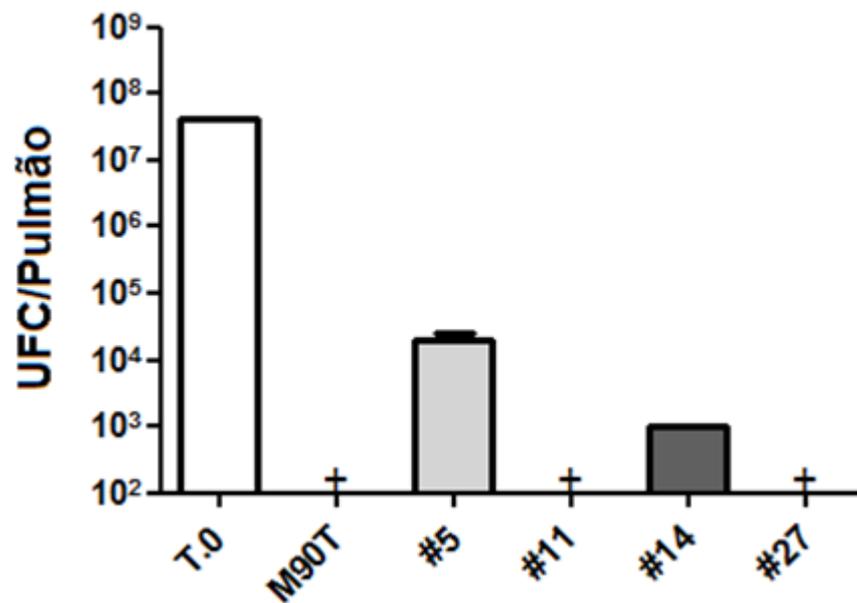


Figura 11: Contagem bacteriana de alíquotas de pulmão após 48h de infecção. A † representa as amostras nas quais as cobaias foram a óbito.

Como resultados da inoculação, observamos a perda de aproximadamente 1,5 logaritmo entre a inoculação e a chegada ao pulmão. De 10^9 inoculados, apenas um pouco mais de 10^7 de fato chegaram ao pulmão, caracterizando a quantidade de bactérias presentes no T0.

Durante a infecção de 24h, as amostras Controle Positivo M90T e 11 apresentaram um valor maior do que o delimitado pelo T0, com aproximadamente 10^8 cada. As amostras 14 e 27 obtiveram valores próximos de 10^7 , e a amostra 05 teve a menor concentração bacteriana com 10^6 (**Figura 10**).

Na infecção de 48h, houve o óbito das amostras Controle Positivo M90T, 11 e 27, portanto, estes dados não foram contabilizados. Os isolados 05 e 14 apresentaram baixas concentrações bacterianas com 10^4 e 10^3 , respectivamente (**Figura 11**).

Na **Figura 12** é possível observar a diferença de concentração bacteriana no tecido pulmonar entre 24 e 48h de infecção, com a diminuição da concentração nas amostras 05, em aproximadamente 2 logaritmos (10^6 para 10^4), e amostra 14 em 4 logaritmos (10^7 para 10^3). Os isolados M90T, 11 e 27 não possuem valores base para comparação.

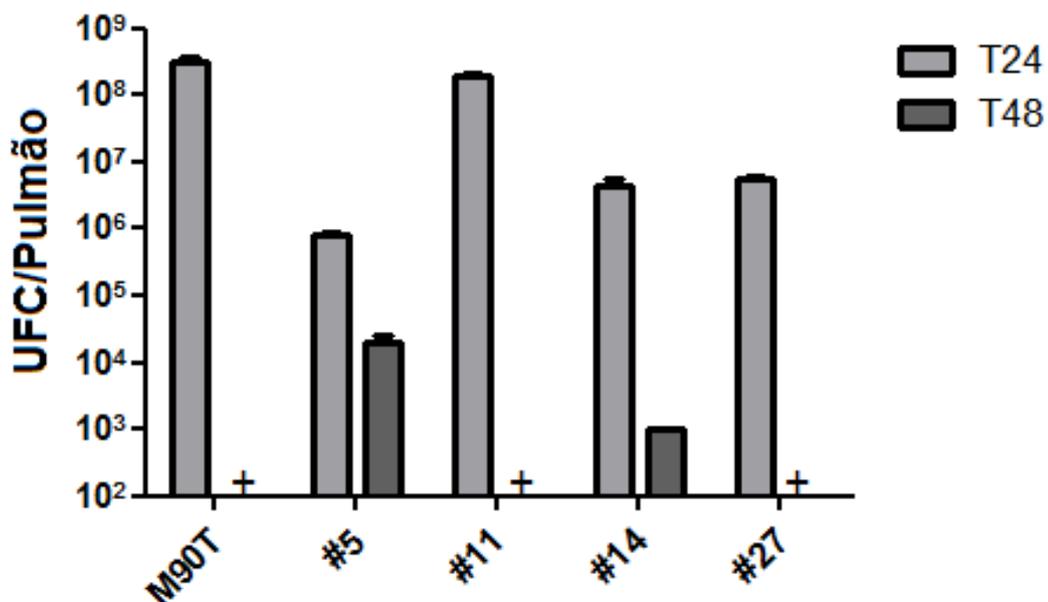


Figura 12: Comparação entre a contagem bacteriana após 24 e 48h de infecção

As amostras processadas em *Trizol*[®] foram transportadas em gelo seco de Ribeirão Preto para o Rio de Janeiro com a finalidade de realizar a extração de RNA em colaboração com a FIOCRUZ - RJ.

Após o processo de extração, o RNA apresentou um grau elevado de degradação que poderia ser devido a diversas razões como: a forma de trituração que pode ter sido muito brusca e invasiva; tempo decorrido entre a retirada do pulmão; e o armazenamento que pode ter ocorrido de forma inadequada.

Frente a estes problemas não foi possível a continuação do estudo, sendo necessária a repetição da inoculação intranasal em outro período com as alterações necessárias. Para as novas inoculações foram determinadas: o período de infecção de 24 e 48h, evitando o óbito das cobaias; duas formas de armazenamento diferentes, a utilização de *RNAlater*[®] e o congelamento de maneira rápida com gelo seco e etanol; o período entre a eutanásia e o armazenamento não poderiam ultrapassar 3 minutos, o que impossibilitou a realização de uma nova contagem bacteriana; a utilização de um método alternativo de trituração do pulmão com a utilização do homogeneizador padronizado pela Plataforma de Microarranjo (RJ), o *Poter*.

Definidas as modificações, a segunda inoculação intranasal ocorreu em abril de 2013. Como resultados clínicos da inoculação *in vivo*, as cobaias apresentaram manifestações semelhantes às obtidas durante a primeira inoculação, com as amostras 11 e 27 semelhantes ao controle positivo M90T, e as amostras 05 e 14 com o controle negativo. Os principais sintomas apresentados foram calafrios, pelagem eriçada (**Figura 13**) e presença de secreção ocular nas cobaias (**Figura 14**). Nesta segunda inoculação não houve morte prematura das cobaias.



Figura 13: Camundongos Balb/C após 48h de infecção em evidência a alteração da pelagem. **A** - Controle negativo; **B** – Controle positivo; **C** – Amostra 05; **D** – Amostra 11; **E** – Amostra 14; e **F** – Amostra 27.

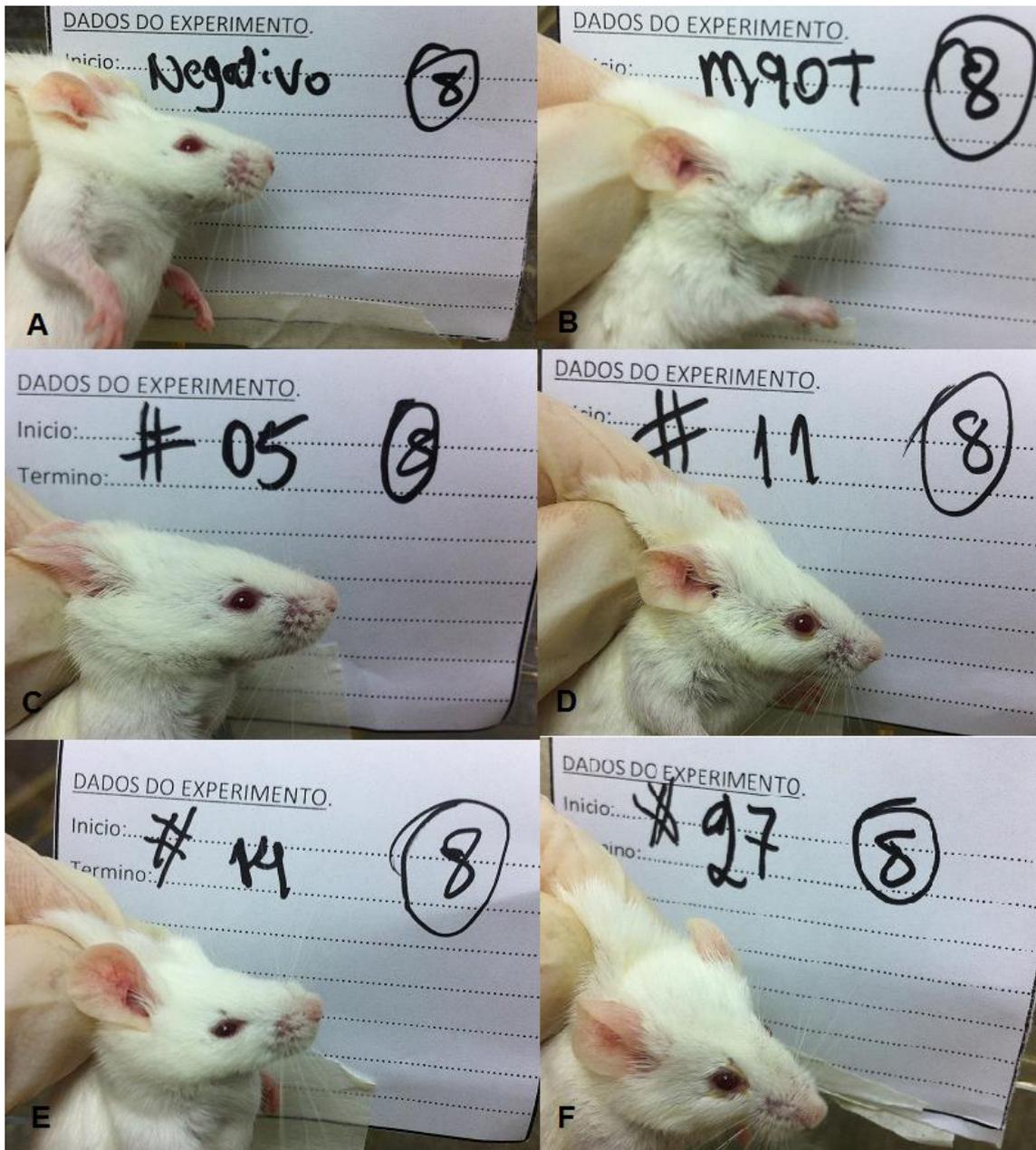


Figura 14: Camundongos Balb/C após 48h de infecção em evidência os olhos. **A** - Controle negativo; **B** – Controle positivo; **C** – Cepa Clínica 05; **D** – Cepa Clínica 11; **E** – Cepa Clínica 14; e **F** – Cepa Clínica 27.

A secreção ocular faz parte de um método de verificação de virulência conhecido como Teste de Sèreny, no qual são realizadas inoculações oculares em porquinhos-da-índia para a indução de ceratoconjutivite, quanto maior o grau, maior o perfil invasivo da bactéria. Neste estudo, a presença deste tipo de secreção em 48h foi um fator inesperado, uma vez que a inoculação realizada foi a intranasal e este resultado não foi observado durante a primeira inoculação em 2012. Acreditamos que devido ao hábito que os camundongos tem de esfregar os olhos, a

secreção nasal tenha sido levada pelo animal aos olhos, possibilitando a invasão da *Shigella* sem, no entanto, nos permitir avaliar o grau de inflamação devido à falta de controle na quantidade de bactérias que teriam sido inoculadas. Porém, não deixamos de anotar os resultados observados (**Figura 14**).

Após a eutanásia, o tecido pulmonar foi retirado e rapidamente armazenado de duas formas, em solução de *RNAlater*® e congelado de maneira rápida em etanol e gelo seco, e mantido sob refrigeração constante até o uso.

5.4. Obtenção do RNA para verificação de expressão gênica

O tecido passou por um processo de extração por *Trizol*® seguindo as instruções do fabricante. O reagente *RNAlater*® é um produto designado para a manutenção da integridade do RNA em manipulações futuras, desta forma, realizamos os primeiros testes de extração com o tecido armazenado em *RNAlater*®.

O instrumento utilizado para triturar o pulmão foi o Potter (**Figura 15**), no qual fragmentos pequenos do tecido eram separados e congelados de maneira rápida em etanol e gelo seco. O utensílio também foi congelado e mantido desta maneira. Após o congelamento o tecido era macerado, realizando a higienização entre as amostras, e colocado em solução de *Trizol*®.



Figura 15: Potter. **A** – Utensílio do Potter congelado em gelo seco e etanol. **B** – Fragmento de tecido macerado.

Primeiramente foram extraídas o RNA de 6 amostras, sendo uma de cada grupo experimental (Controle Positivo e Negativo, 05, 11, 14 e 27 em 24h) e realizada a revelação através da corrida de um gel desnaturante, com a intenção de verificar a integridade do RNA (**Figura 16**).

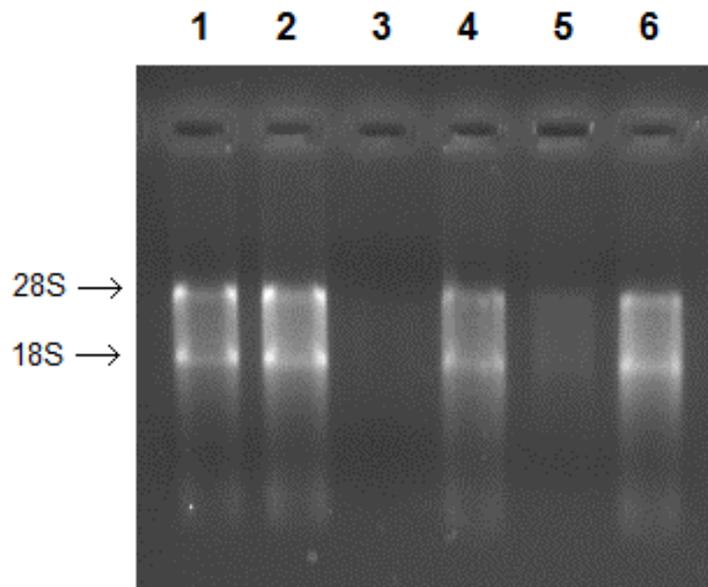


Figura 16: Gel desnaturante com produto da extração de RNA pelo método de *Trizol*[®], em destaque as subunidades de RNA eucarioto 28S e 18S, concentração de 150ng (diluído 1:10). Linha 1: Controle Negativo, 2: M90T, 3: Cepa 05, 4: Cepa 11, 5: Cepa 14 e 6: Cepa 27.

Esta análise mostrou um RNA íntegro (ausência de rastros), com pouca contaminação de DNA (ausência de brilho nos poços) e a concentração de RNA nas alíquotas depositadas (amostras 05 e 14 em muito baixa concentração) (**Figura 16**). Demonstrando que o armazenamento em *RNAlater*[®] e a extração foram eficazes, permitindo o prosseguimento com as demais amostras.

Após a extração, as amostras passaram por todos os procedimentos que precedem a amplificação no equipamento Fluidigm como o tratamento com DNase, quantificação, pré-amplificação com um pool de todos os *primers*, diluição e montagem das placas de primers e amostras pré-amplificadas. A migração das amostras para seu lugar no chip e a amplificação destas pelo equipamento ocorreu sem dificuldades.

5.5. Identificação do perfil de expressão da resposta imune do hospedeiro

Como resultados, obtivemos um resultado positivo para a amplificação de todos os genes relacionados com a resposta do hospedeiro, possibilitando sua análise.

Quanto a resposta do hospedeiro, obtivemos o agrupamento da expressão em dois grupos (*clusters*), os que possuíam uma expressão altamente variável entre os inóculos e os que não apresentaram grande variabilidade.

Na **Figura 17**, observamos um quadro de cores em que quanto mais próximo da cor verde, menor a expressão gênica; quanto mais próximo de preto, mais na média de expressão; e quanto mais vermelha, mais regulada positivamente se encontra a expressão. Cada linha representa um gene e cada coluna, um isolado. O programa agrupou as amostras em 2 grandes grupos ou *clusters*. A esquerda da figura, o agrupamento na parte superior, representa os genes que possuem grande variação, nomeados *cluster 1*; e os genes na parte inferior são os que não apresentaram grande variação, nomeados *cluster 2*. A direita, estão listados os *primers* analisados (**Figura 17**).

De modo geral, observou-se que na variação do período de 24h para 48h de infecção houve um aumento na média de expressão dos genes como um todo. Isto significa que houve maior resposta após 48h de infecção em comparação com 24h. Este resultado condiz com o observado na avaliação clínica das cobaias onde ocorreu a visualização de sintomas clínicos como a secreção ocular apenas após 48h de infecção.

Quando avaliamos a média de expressão dos *clusters* separadamente é possível perceber esta diferença de tempo de infecção com maior nitidez. Nas figuras abaixo, estão representados separadamente a média do *cluster 1* (**Figura 18**) e *cluster 2* (**Figura 19**), onde a linha vermelha pontilhada representa a média de expressão: quanto mais acima da linha, maior a expressão; quanto mais abaixo, menor a expressão, ambas com um Intervalo de Confiança (IC) de 95%.

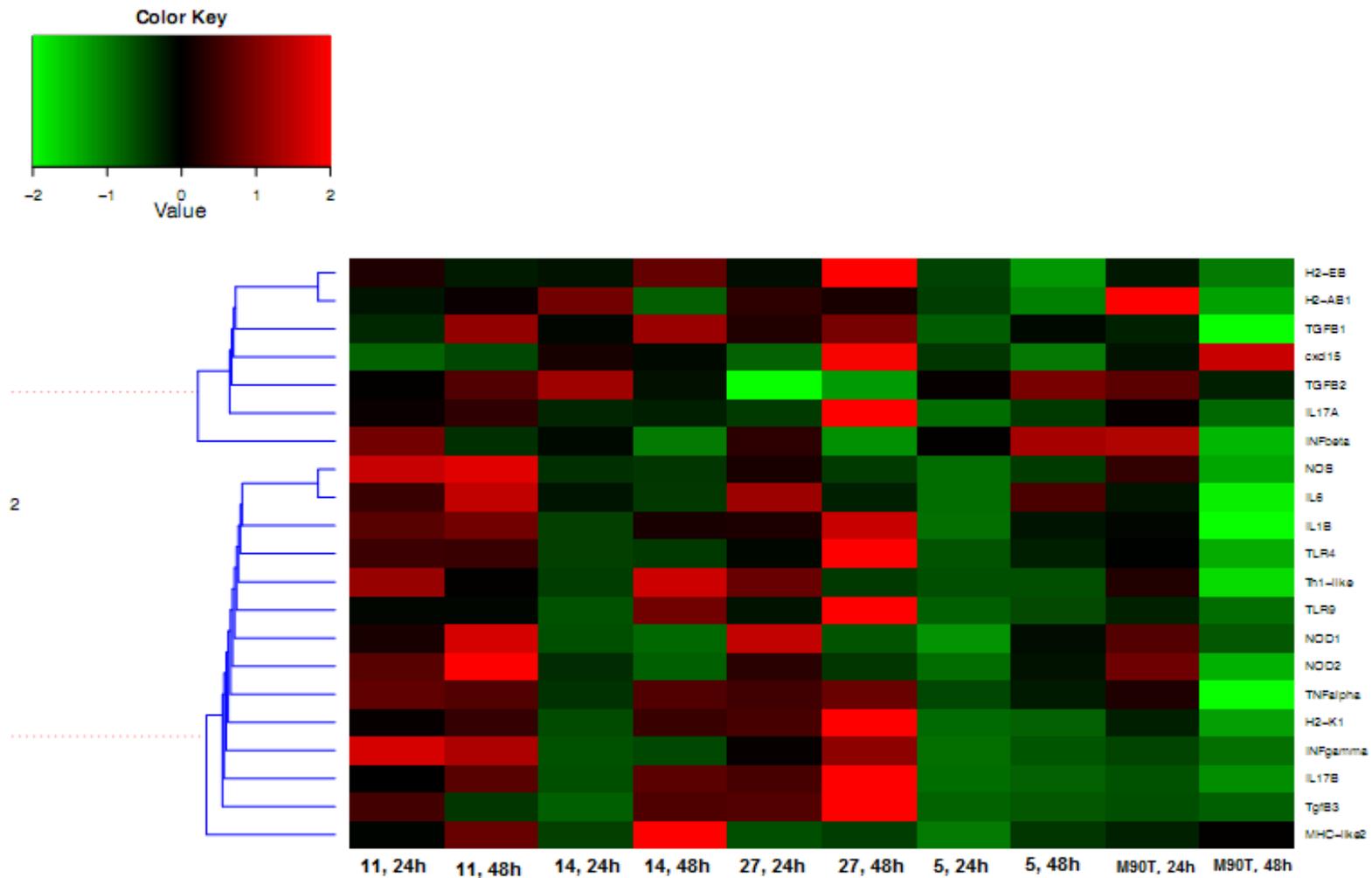


Figura 17: Quadro de cores representando a variação da expressão gênica das amostras, a partir de amostras provenientes de pulmão de camundongo inoculados com diferentes cepas de *Shigella* (11, 14, 27, 05 e M90T). Cada linha representa um *primer* analisado e cada coluna um isolado de acordo com o tempo de infecção (24h ou 48h).

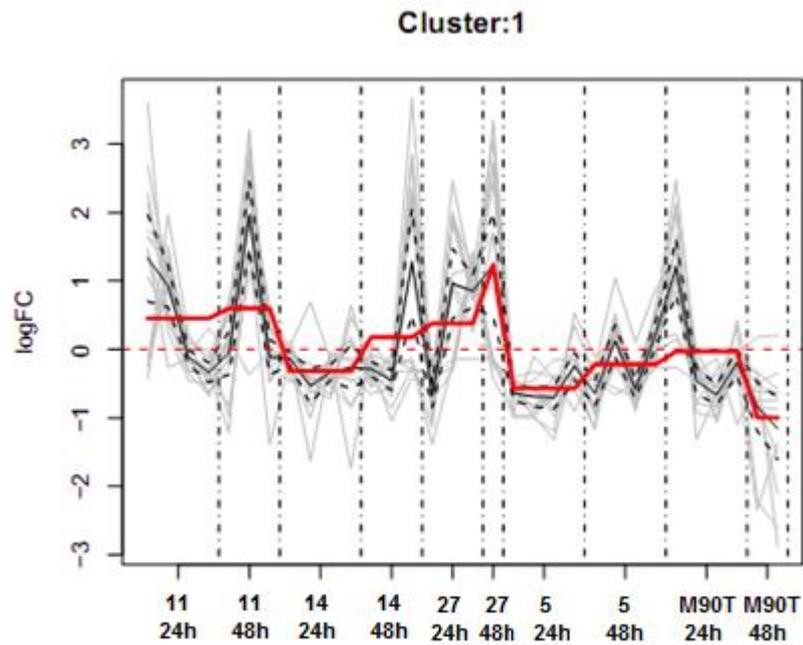


Figura 18: Representação gráfica da média de expressão geral dos *primers* agrupados no Cluster 1, altamente variáveis nos diferentes tempos de infecção (24 e 48h).

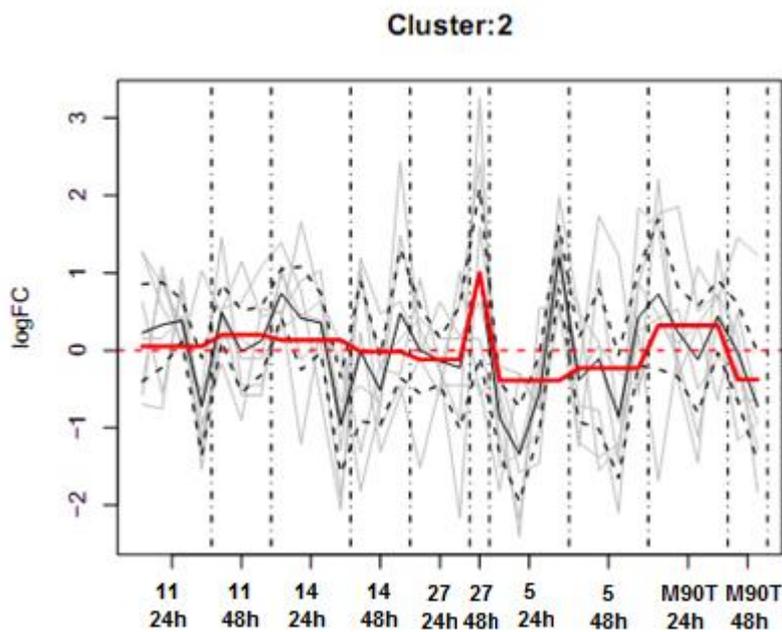


Figura 19: Representação gráfica da média de expressão geral dos *primers* agrupados no Cluster 2, pouco variáveis nos diferentes tempos de infecção (24 e 48h).

No *Cluster 1* é demonstrado o aumento da expressão entre as amostras em um período de 24h e 48h. As amostras 11 e 27 mostraram uma expressão acima da média, sendo que o maior pico de expressão ocorreu na amostra 27 após 48h de infecção. As amostras 05 e 14 apresentam valores abaixo na média estipulada em 24h. Após 48h a amostra 14 mostra uma elevação da expressão até superar a média e a amostra 05, mesmo após 48h, apresenta baixa regulação de expressão.

No *Cluster 2*, não há grande variação de expressão entre as amostras que se apresentam, de maneira geral, na média a exceção da amostra 27 em 48h de infecção que apresenta um pico similar ao observado no *Cluster 1*. Isto demonstra que independentemente do agrupamento, a amostra 27 após 48h de infecção apresenta alta expressão dos fatores analisados, diferenciando-a do padrão delimitado nas outras amostras.

Além disso, podemos perceber que a amostra controle positivo M90T, apesar de apresentar sintomas clínicos graves em camundongos, não obteve grandes índices de expressão gênica estando na média (24h) e abaixo da média (48h) no *Cluster 1*. Curiosamente, no *Cluster 2*, que mostra os genes menos variáveis, ela mostrou uma maior regulação positiva do que as cepas de estudo em 24h com uma regulação baixa em 48h. Acreditamos que esta diferença entre padrão e cepa clínica tenha base no fato desta amostra ser uma bactéria amplamente manipulada e difundida como padrão, realmente seu potencial de virulência pode ser menor ou mais atenuado do que o de uma amostra que comprovadamente provocou diarreia em pacientes.

Quando verificados cada gene individualmente, apenas três *primers* não alcançaram o padrão mínimo determinado pelo programa sendo estes excluídos da análise. Eles foram: as citocinas Interleucina 10 (IL10) e Interferon β 1 (IFN- β 1); e o Complexo Principal de Histocompatibilidade 1 (MHC-like 1). Dentre as prováveis causas para estes resultados podemos citar: a pouca disponibilidade destes genes no momento da invasão devido à baixa quantidade de cópias, que significaria sua baixa expressão no modelo experimental proposto; ou falhas técnicas na construção destes genes, que não atingiram seus alvos específicos.

Além dos agrupamentos em clusters (1 e 2) utilizados para demonstrar a expressão gênica, realizamos outras divisões organizando os seguintes genes: Pró-inflamatórios (CXCL15, IL-1 β , IL-6, IFN- β , TNF- α) (**Figura 20**), Anti-Inflamatória (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3) (**Figura 21**), Resposta Inata (NOD 1, NOD 2, TLR4 e

TLR9) (**Figura 22**), Resposta Adaptativa (Th1-like, IFN- γ , IL-17A e IL-17B) (**Figura 23**) e Macrófagos (NOS, H2 -A β 1, H2-E β , H2-K1, MHC-like 2) (**Figura 24**).

Dentre os genes pró-inflamatórios, a quimiocina CXCL15 e o Interferon γ (IFN- γ) demonstrou uma expressão relativamente similar em todos os grupos com uma variação mínima entre os períodos de 24h e 48h. A diferença entre a expressão foi observada para o CXCL15 para a cepa 27 em 48h, com valores de CT próximos de 0,6 (**Figura 20**).

Para os genes Interleucina 1 β (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) a resposta foi heterogênea. M90T apresentou baixa regulação destes genes após 48h; Dentre as amostras clínicas, a cepa 5 teve os menores resultados; Os valores das cepas 11 e 27 foram os maiores (**Figura 20**).

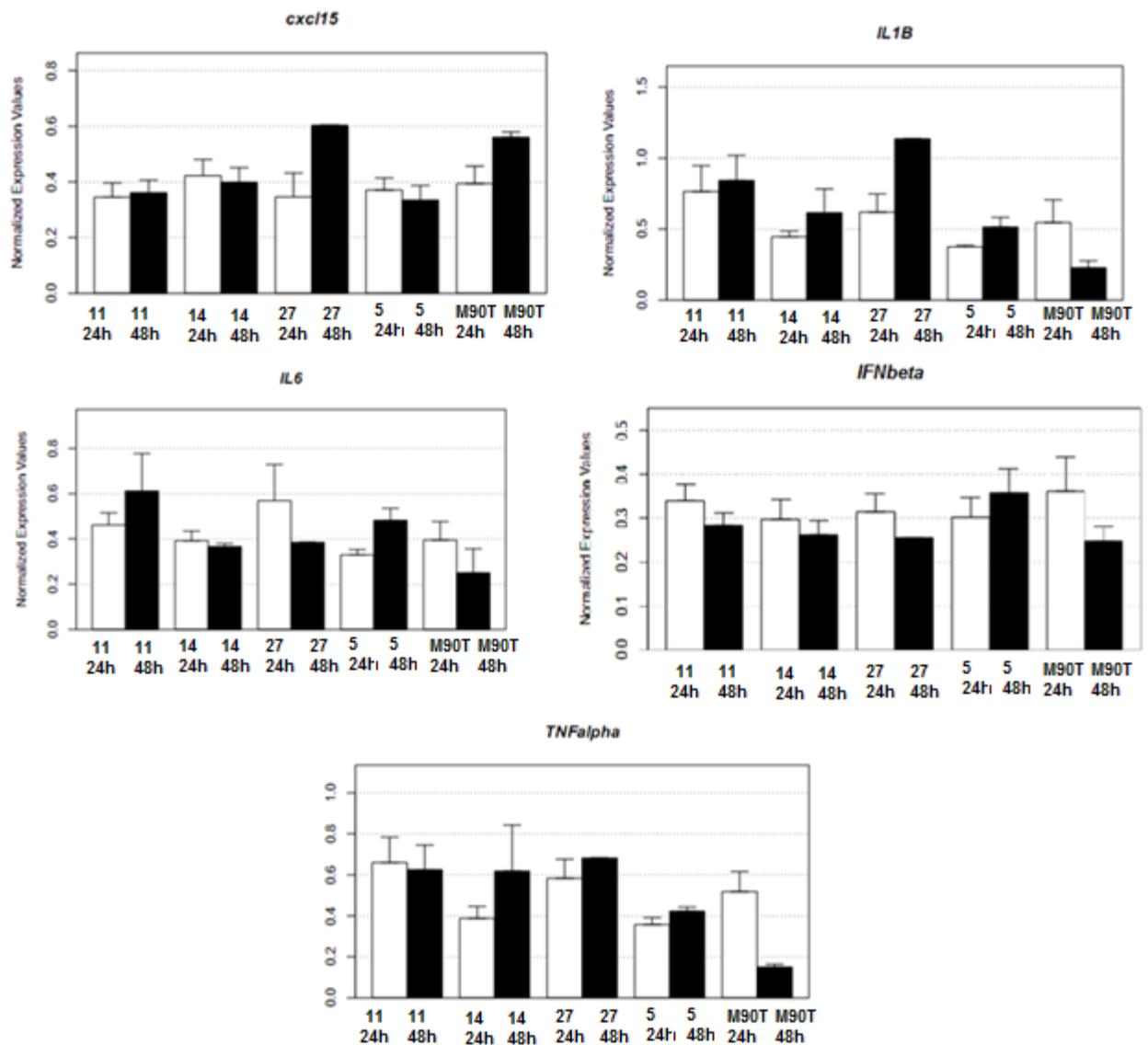


Figura 20: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Pró-Inflamatórios. As barras brancas representam 24h de infecção e as barras escuras, 48h. Em ordem, da esquerda para direita, cepa 11, 14, 27, 5 e M90T.

Para os genes Anti-Inflamatórios, temos os Fatores de Transformação do Crescimento $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ (TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$ e TGF- $\beta 3$). O TGF- $\beta 1$ e TGF- $\beta 2$ apresentaram valores similares para todas as amostras. O TGF- $\beta 1$ teve expressão superior em 48h para todos os grupos amostrais, a exceção do controle positivo M90T. O TGF- $\beta 2$, por sua vez, é mais expresso em 48h pelos grupos 05, 11 e 27, e em 24h pelo M90T e 14. O TGF- $\beta 3$ possui baixas expressões em todas as amostras exceto na cepa 27 em 48h (**Figura 21**).

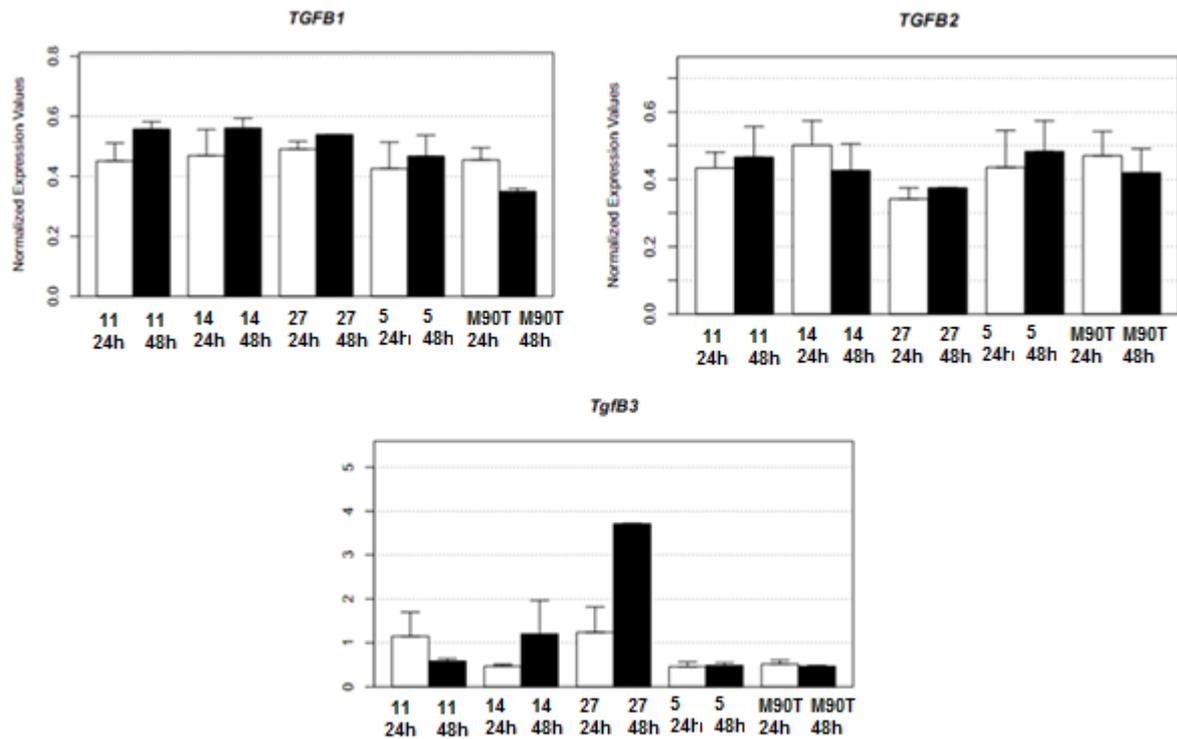


Figura 21: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Anti-Inflamatórios. As barras brancas representam 24h de infecção e as barras escuras, 48h. Em ordem, da esquerda para direita, cepa 11, 14, 27, 5 e M90T.

O grupo da Resposta Inata abrangem o NOD 1, NOD 2, TLR4 e TLR9. Para os receptores NOD 1 e 2 foram notados os mesmos padrões de expressão com valores baixos nas cepas 5 e 14; Os valores de M90T e cepa 27 declinaram após 48h; Já os referentes a cepa 11 aumentaram em 48h. Para os TLR, tanto os receptores TLR4 e TLR9 tiveram expressões similares em todas as cepas, exceto para a cepa 27 em 48h que teve expressão diferencial superior (**Figura 22**).

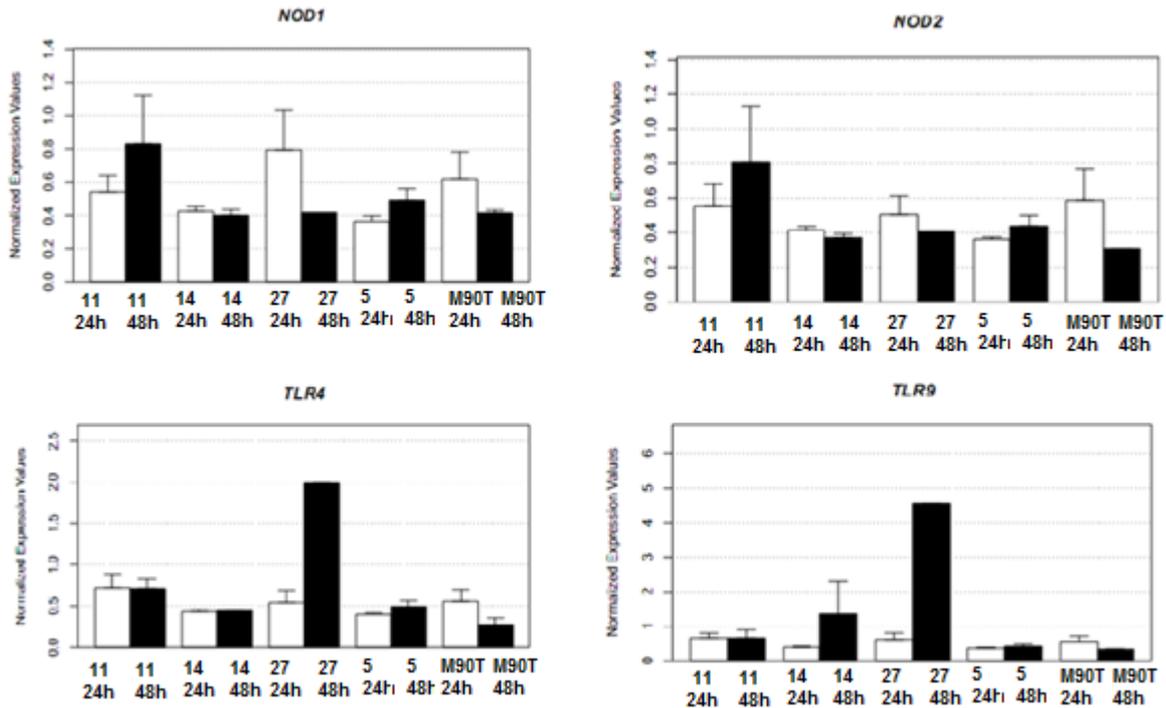


Figura 22: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes de Imunidade Inata. As barras brancas representam 24h de infecção e as barras escuras, 48h. Em ordem, da esquerda para direita, cepa 11, 14, 27, 5 e M90T.

Na Resposta Adaptativa foram agrupados Th1-like, Interferon γ (IFN- γ), Interleucina 17A (IL-17A) e Interleucina 17B (IL-17B).

Nos linfócitos T CD4 resposta do tipo 1 (Th1-like), há maior expressão em 24h nos grupos M90T, 11 e 27, e em 48h no grupo 14. Para o IFN- γ os valores de CT foram muito baixos para os grupos M90T, 05 e 14, estando próximos de zero (0), para o grupo 11 a expressão foi maior em 24h e no grupo 27 a maior expressão está em 48h (**Figura 23**).

A citocina IL-17A mostrou níveis de expressão de aproximadamente 0,5 CT em todos os grupos com valores similares em 24h e 48h, a exceção do grupo 27 em 48h onde os valores triplicaram em comparação com o mesmo grupo em 24h. Para o IL-17B, os valores foram similares nos grupos M90T e 05 em 24 e 48h, e uma maior expressão em 48h nos grupos 11, 14 e 27. Os valores obtidos no período de 48h no grupo 27 foram o triplo dos obtidos em 24h (aproximadamente 6,0 CT) (**Figura 23**).

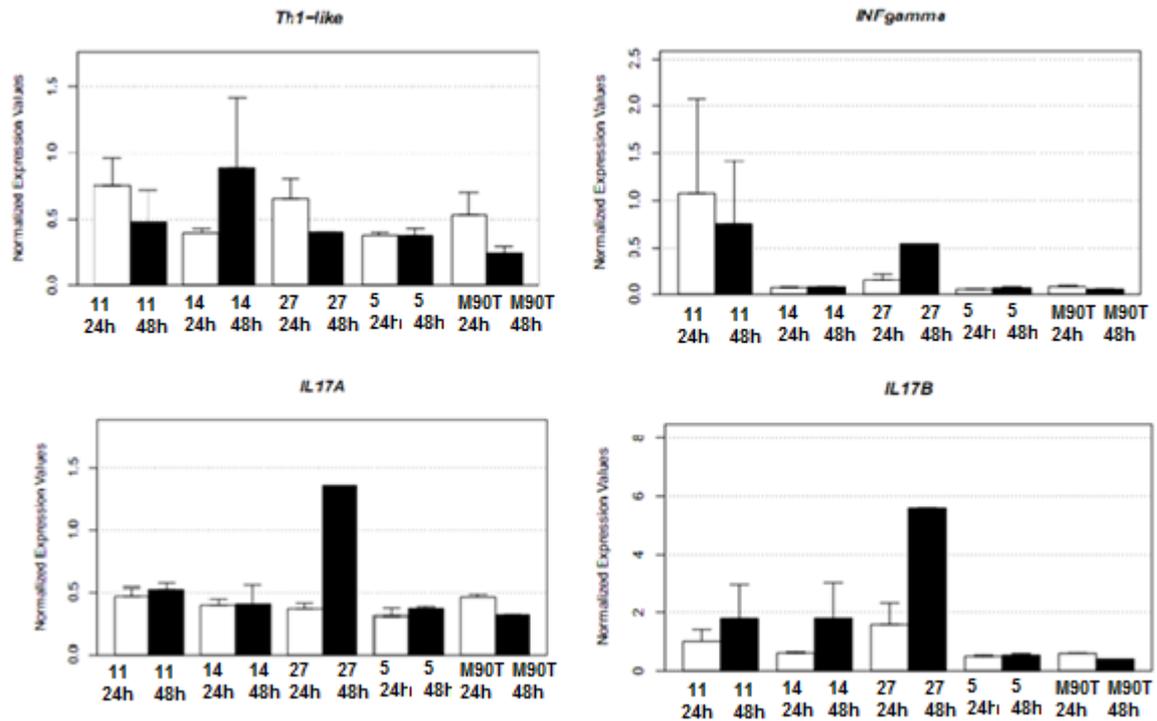


Figura 23: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes de Imunidade Adaptativa. As barras brancas representam 24h de infecção e as barras escuras, 48h. Em ordem, da esquerda para direita, cepa 11, 14, 27, 5 e M90T.

Para a resposta de Macrófagos (NOS, H2 -A β 1, H2-E β , H2-K1, MHC-like 2), a Síntese de Óxido Nítrico (NOS) não demonstrou grandes variações entre as amostras de bactérias clínicas, sendo notadas diferenças apenas no padrão M90T, maior em 24h; O antígeno de Histocompatibilidade Classe II antígeno A - β 1 (H2-A β 1) os valores foram similares nos grupos 05, 11 e 27, e maior expressão em 24h para o M90T e 14. Já seu antígeno E - β (H2-E β) demonstrou uma expressão maior em 24h nos grupos M90T, 05 e 11 com valores abaixo de 0,5 CT, em oposição, os grupos 14 e 27 demonstraram uma maior expressão em 48h, sendo que a amostra 27 teve sua expressão superior a 1,0 CT em 48h (**Figura 24**).

Para a região K1 (H2K1) não há grande variação ente os períodos, exceto no grupo 27 onde os valores em 48h se destacam. No Complexo Principal de Histocompatibilidade 2 (MHC-like 2), somente há variação de valores em nos grupos 11 e 14, com maior expressão em 48h (**Figura 24**).

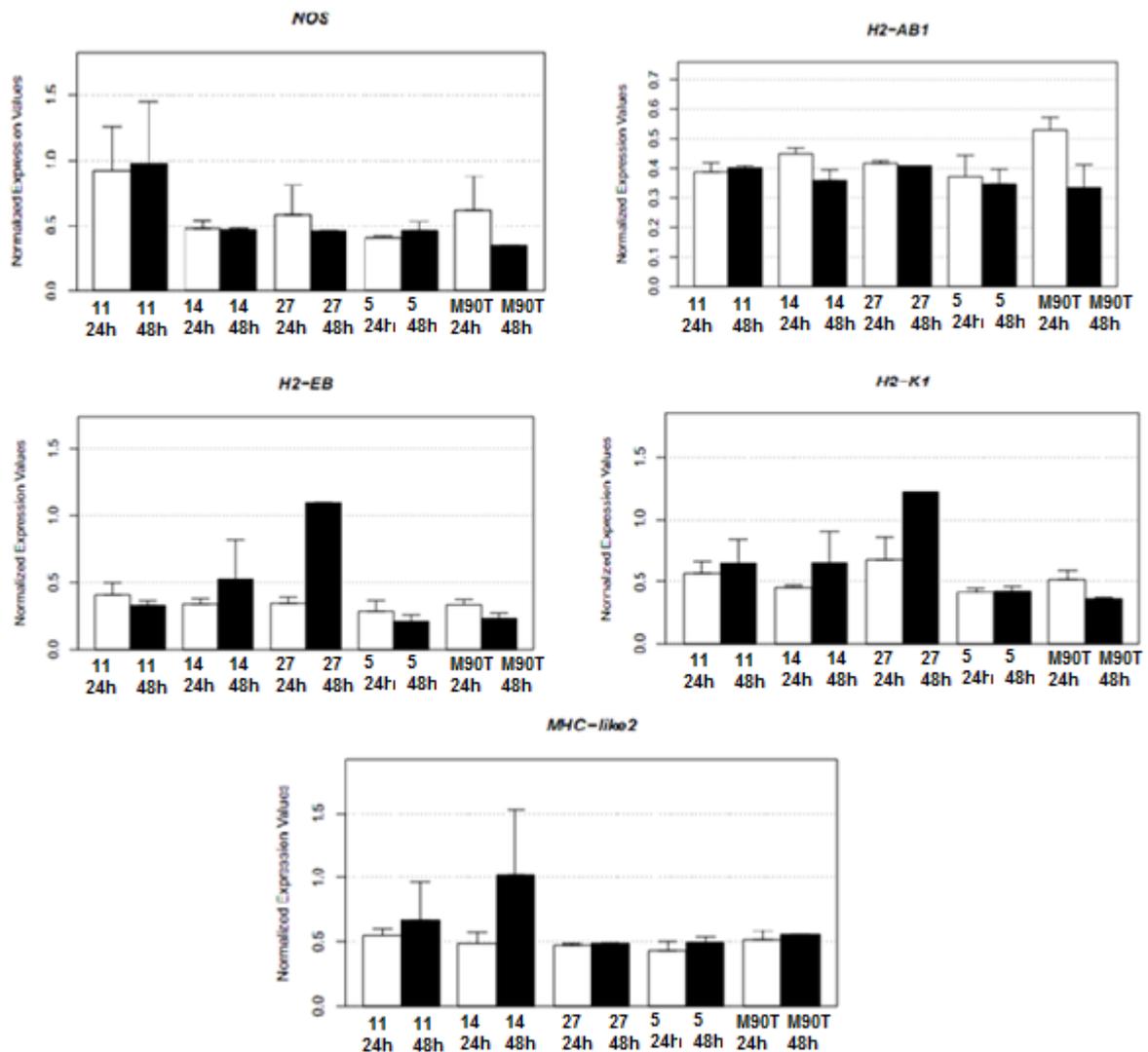


Figura 24: Análise gráfica da média de cada amostra em relação aos genes Macrófago. As barras brancas representam 24h de infecção e as barras escuras, 48h. Em ordem, da esquerda para direita, cepa 11, 14, 27, 5 e M90T.

5.6. Verificação do perfil de expressão gênica bacteriana

Os resultados relacionados aos genes de *Shigella* não possibilitaram a análise pelo programa “R” devido ao número de amostras que não amplificaram. Nas amostras que amplificaram, muitas apresentaram valores de ΔCT abaixo do ideal (0,5), ou seja, houve pouca disponibilidade de RNA bacteriano impossibilitando a análise estatística pelo programa “R”. A análise alternativa a este programa foi uma triagem manual dos gráficos e valores de amplificação.

O primeiro passo da análise manual é a separação entre os genes que apresentaram uma amplificação específica, com um único pico de amplificação nos gráficos (**Figura 25**).

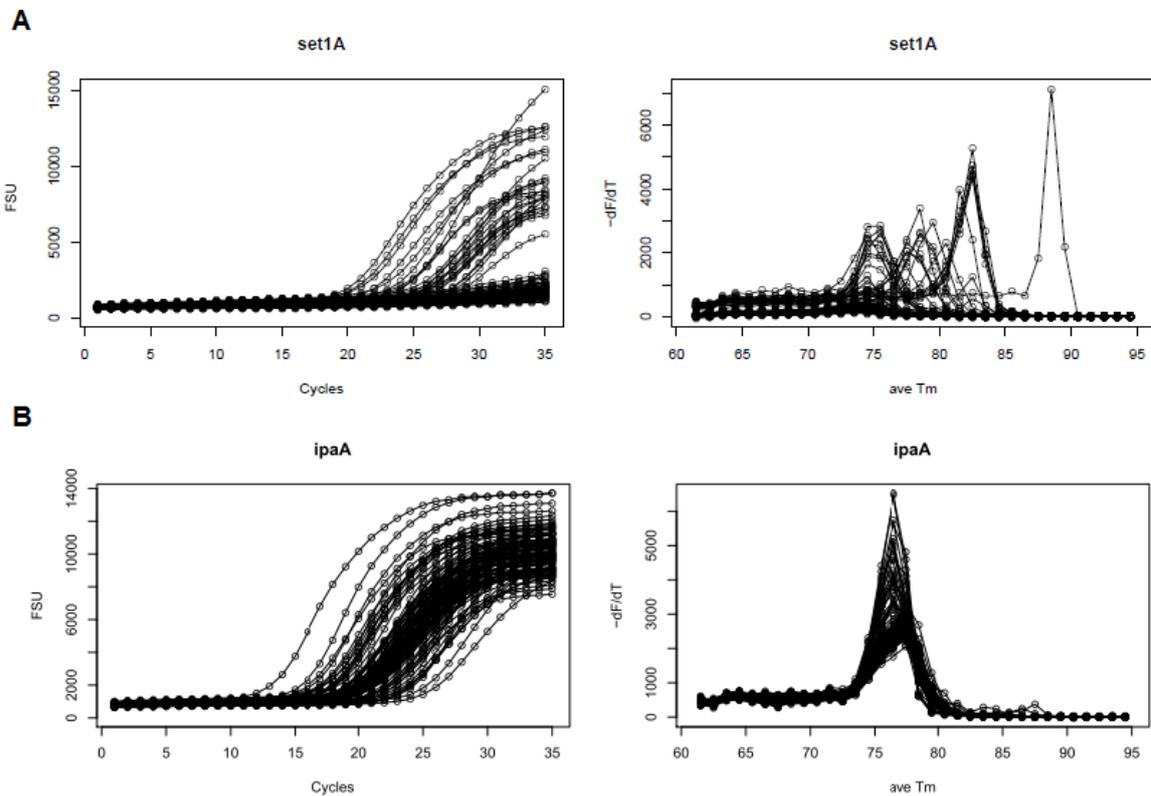


Figura 25: Gráficos exemplificando a amplificação inespecífica (A) e específica (B)

Após as análises dos gráficos de amplificação referentes aos 70 genes bacterianos propostos por este estudo, apenas 26 apresentaram gráficos adequados para análise. Os 44 genes que não foram analisados podem não ter apresentado disponibilidade de RNA no modelo proposto, não possibilitando uma boa amplificação pelo equipamento.

Os 26 genes com amplificações adequadas foram: *gyrB*, *icsA-virG*, *icsP*, *ihfA*, *ihfB*, *ipaA*, *ipaB*, *ipgD*, *ipaH 7.8*, *ipaH 9.8*, *ipgB*, *ipgD*, *miaA*, *mxi-spa*, *ospF*, *parC*, *rfbU*, *senA*, *sepA*, *set1B*, *sigA*, *stpA*, *topA*, *virB*, *virF*, *virK*. Apenas um gene amplificou para todas as amostras analisadas, o *ipaA* (**Figura 26**). Entre os possíveis candidatos a genes normalizadores para *Shigella*, destacam-se os genes *ipa*'s, *gyrB*, *ipgD* e *miaA*. Neste estudo, o gene *ipaA* foi o selecionado como normalizador

devido a alta taxa de amplificação (100%), o gene *ipgD* amplificou em 42,5% das amostras, os genes *ipaB* e *ipaD* em 40%, e os genes *gyrB* e *mixA* não apresentaram picos de amplificação aceitáveis.

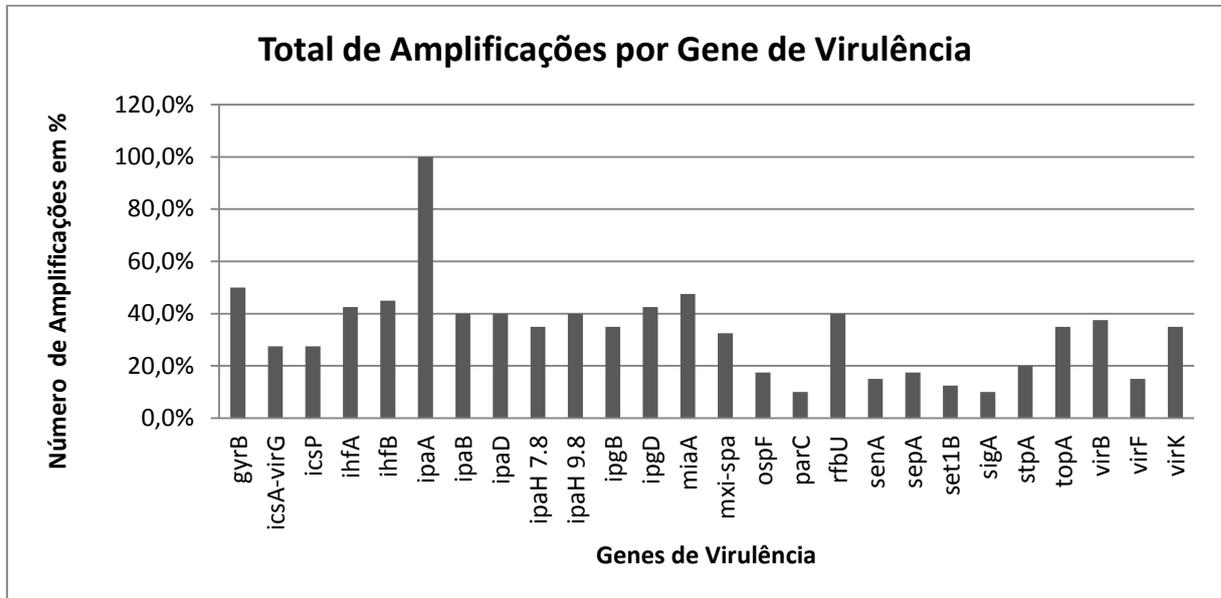


Figura 26: Representação da porcentagem de amplificação entre os genes de virulência de *Shigella*

Os cálculos de expressão são baseados nos valores de ΔCT . A fórmula é $\Delta CT = CT \text{ gene} - CT \text{ gene normalizador} = n = 2^{-n}$. Vale ressaltar que este é o mesmo cálculo realizado pelo programa "R", onde são excluídas as amostras que apresentarem um valor de ΔCT menor que 0,5. Para os genes bacterianos analisados, todos se apresentaram abaixo deste limite, um dos motivos que impossibilitaram sua análise pelo programa "R" (**Figura 27**).

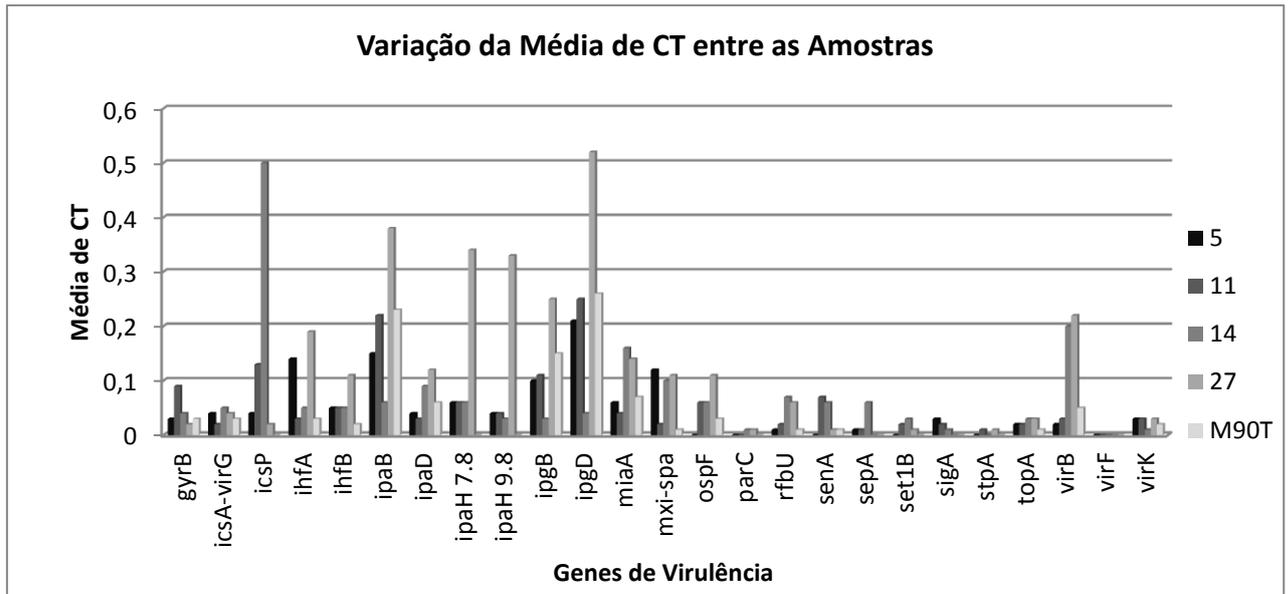


Figura 27: Representação da Média de Δ CT entre as amostras de *Shigella*

As maiores médias de amplificação ocorreram nos genes *icsP* (grupos 11 e 14), *ihfA* (05 e 27), *ihfB* (27), *ipaB* (05, 11, 27 e M90T), *ipaD* (27), *ipaH 7.8* (M90T), *ipaH 9.8* (M90T), *ipgB* (05, 11, 27 e M90T), *ipgD* (05, 11, 27 e M90T), *miaA* (14 e 27), *mxi-spa* (05, 14 e 27), *ospF* (27) e *virB* (14 e 27), que mostraram médias acima de 0,1 CT. As médias do grupo 27 para os genes *icsP* e *ipgD* foram os mais próximos de 0,5 CT.

Quando analisadas a quantidade de amplificações em geral, independente do gene, por grupo amostral, os experimentos referentes à cepa clínica 11 possui a maior porcentagem de amplificações, tanto em 24 quanto em 48h. O grupo 27 em 48h também apresenta altas taxas, com aproximadamente 50% dos genes amplificados (**Figura 28**).

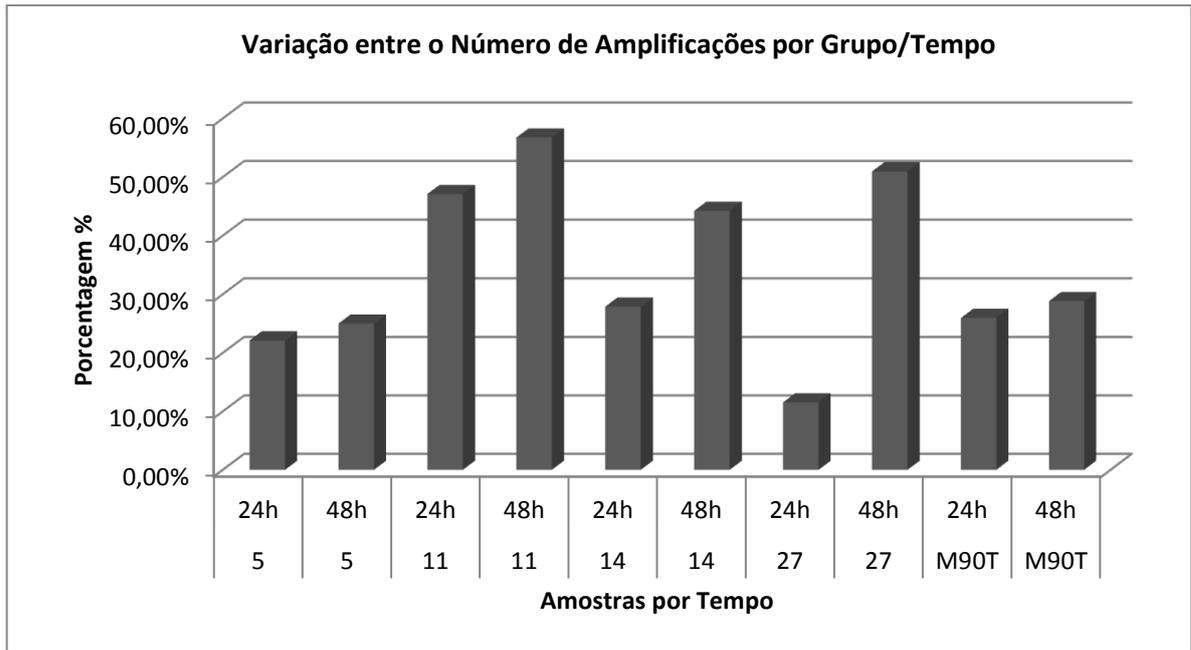


Figura 28: Representação número de amplificações por Grupo/Tempo

6. DISCUSSÃO

O objetivo principal deste estudo foi à avaliação da resposta imunológica e dos mecanismos de ação bacterianos em infecção pulmonar de camundongo (*in vivo*) frente a quatro cepas caracterizadas por métodos tradicionais bioquímicos, de invasão e moleculares. Acreditamos que os resultados provenientes desta proposta possam ajudar a compreender melhor a infecção clínica, uma vez que estudos com esta finalidade geralmente utilizam cepas padrões.

Nossa principal hipótese parte do princípio que cepas clínicas estão constantemente em competição, diferente das cepas padrões. Esta diferença básica pode levar à expressão diferencial de genes relacionados à imunidade e virulência, devido às mutações naturais por diversas influencias externas as quais as cepas clínicas (selvagens) podem estar sujeitas (PRELICH, 2012).

A avaliação da virulência foi realizada *in vitro* com a invasão de células HeLa e através de técnicas moleculares (PCR) envolvendo alguns genes de virulência chaves presentes nas espécies de *Shigella* (*ipaBCD*, *ipaH*, *ial*, *invE*, *virF*, *EVT*, *shET1A*, *shET1B* e *shET2*) e o *uidA*, comum aos gêneros *Shigella* e *Escherichia coli*, permitindo uma visão geral do potencial de virulência das cepas em estudo.

Os genes *ipaBCD* e *ipaH*, localizados no plasmídeo de invasão (*Ipa*), são essenciais a invasão das espécies de *Shigella* na célula hospedeira (VENKATESAN et al., 1988); o *ial* é responsável pelo direcionamento bacteriano durante a invasão (VARGAS et al., 1999); *invE* é responsável pela regulação de *ipaBCD* (TANIYA et al., 2003); *virF* reconhece alterações corpóreas, principalmente de temperatura após a entrada da bactéria no hospedeiro, regulando a síntese dos plasmídeos de invasão (PROSEDA et al., 2004); *EVT*, *shET1A*, *shET1B*, *shET2* são toxinas (O'BRIEN e HOLMES, 1987); e *uidA* é fator não associado com a patogenicidade utilizado para detecção de amostras de *Shigella* e *Escherichia coli* Enteroinvasiva, neste estudo, em conjunto com 16S, ele possuiu o papel de marcador positivo para *Shigella* (RIYAZ-UL-HASSAN et al., 2009).

A invasão é o fator determinante na patogenicidade da *Shigella*, logo, o ponto chave da escolha das quatro cepas foram as diferenças gênicas além do perfil invasivo. As cepas estudadas foram comprovadas como invasivas por testes de invasão *in vitro* e para avaliar as diferentes respostas *in vivo* todas deveriam possuir esta característica. Desta forma, os genes *ipaBCD*, *ial* e o marcador de *Shigella uidA*

foram comuns as quatro cepas selecionadas. As variações ocorreram nas enterotoxinas (*shET 1A*, *shET1B*, *shET2* e *EVT*), nos reguladores (*invE* e *virF*), e no fator *ipaH* (**Tabela 01**).

O padrão de invasão *Shigella flexneri* 5a M90T foi escolhido como controle positivo deste estudo devido a sua larga utilização como controle de invasão em muitos estudos por possuir seu potencial gênico e imunológico bem caracterizado (SELLGE et al., 2010; SCHNUPF e SANSONETTI, 2012; KONRADT et al., 2011; KOTLOFF et al., 2000; SPERANDIO et al., 2008; CERSINE et al., 2003; MANTIS et al., 1996).

Na prática, apesar dos resultados referentes à caracterização da resposta imune serem obtidos com sucesso, a determinação dos genes de virulência não foi possível devido a ausência ou detecção abaixo do ideal de mRNA pela metodologia utilizada.

A tecnologia de Fluidigm de Microfluídicos Dinâmicos foi idealizada para realizar análises de expressão em larga escala, evitando resultados ambíguos, demonstrando alta concordância com o PCR Real-Time e maior poder de reprodutibilidade que o Microarray (SPURGEON et al. 2008 – Fluidigm Corporation). Além disso, estudos adicionais demonstraram que bons resultados são alcançados mesmo com baixas concentrações de amostra (JANG et al., 2011; WANG et al., 2009).

Devido ao alto poder de sensibilidade demonstrado por esta tecnologia, acreditamos que a falha da amplificação dos genes se deva às limitações do desenho experimental quanto à análise da expressão bacteriana, uma vez que este está pouco disponível quando comparado ao RNA de eucarioto do pulmão do hospedeiro. Esta pouca disponibilidade pode ter interferido na recuperação do mRNA bacteriano pelo processo de extração, levando à baixa detecção pelo equipamento.

Os motivos exatos que levaram aos problemas de amplificação dos genes bacterianos ainda são desconhecidos, porém acreditamos que possa haver grande relação com a qualidade do mRNA bacteriano obtido, não com falha na tecnologia utilizada. Dentre as prováveis causas, podemos citar a degradação do RNA bacteriano devido à severidade da infecção; amostragem de tecido pulmonar contendo RNA insuficiente; metodologia de extração ineficaz na recuperação do RNA bacteriano.

Novos estudos visando a obtenção do mRNA bacteriano são necessários. Algumas sugestões para solucionar estes problemas são: a pesquisa de metodologias de extração alternativas que favoreçam o RNA bacteriano; realização da histologia do pulmão para verificar se há tropismo por alguma região, efetuando a extração da região onde há a maior concentração bacteriana; extração a partir do lavado brônquio-alveolar visando uma melhor recuperação da RNA bacteriano.

A impossibilidade de análise destes dados pelo Programa “R” devido aos baixos valores de ΔCT levou a uma análise superficial e qualitativa dos dados referentes ao comportamento bacteriano, abordando principalmente as taxas de amplificação.

Apesar dos dados incompletos, curiosamente, o gene *ipaA* obteve uma amplificação para 100% das amostras testadas, o *ipaA* (**Figura 26**). Durante a invasão, sua principal função é a ligação com vinculina, que leva a associação com F-actina. Esse complexo, vinculina-*ipaA*-F-actina leva a despolimerização dos filamentos de actina presentes no citoesqueleto (BOUDERT-SICARD et al., 1999). Uma molécula de *ipaA* tem a habilidade de ligar-se em até três de vinculina, esta alta disponibilidade do *ipaA* tem relação com a rapidez de entrada na célula epitelial (PARK et al., 2011).

Dos 70 genes que foram propostos para o estudo de virulência de *Shigella*, apenas 26 puderam ser analisados. A exceção do *ipaA*, a taxa de amplificação foi menor que 50% para todos. Por este motivo, para uma análise preliminar, o *ipaA* foi selecionado como gene normalizador. A viabilidade de sua utilização é discutível, porém a presença de níveis detectáveis em todas as condições amostrais o fez um bom candidato, necessitando de estudos futuros para confirmar sua eficácia como gene normalizador de *Shigella*, ou a proposta de novos genes.

A expressão gênica relacionada à resposta imune dos camundongos, no entanto, obtiveram níveis excelentes de detecção. Os motivos desta diferença de resultados em amostras que obtiveram o mesmo tratamento em todas as fases do processo é desconhecido, porém acreditamos que seja pela grande disponibilidade de mRNA eucarioto no tecido.

Quando os resultados para os genes da resposta imune foram avaliados, podemos perceber um padrão de expressão gênica completamente diferente entre a cepa padrão M90T e todas de origem clínica (**Figura 17**). Os níveis de expressão em 24h para a amostra M90T foram maiores que os de 48h, caracterizando uma

baixa expressão em 48h. Em geral, todas as amostras clínicas demonstraram o padrão inverso: a resposta obtida em 48h foi maior do que em 24h, demonstrando uma elevação nos níveis de expressão nesta diferença de tempo.

Dentre as possíveis explicações para este fato, acreditamos que esta diferença de comportamento deve-se ao fato da bactéria padrão possuir crescimento controlado, sempre em níveis nutricionais ideais para garantir a reprodutibilidade. As amostras clínicas estão expostas as condições e pressões externas como a resposta imune do hospedeiro, os tratamentos com antibióticos, competição bacteriana, variações de temperatura e ambiente impróprio para o crescimento. Como resultado, podemos obter altas taxas de mutação e super-expressão (*overexpressing*) gênica (PRELICH, 2012).

Apesar disso, a amostra clínica 5 não apresentou grandes variações entre 24 e 48h de expressão (**Figura 17**), estando seus resultados abaixo da média de expressão. As maiores variações estão entre os genes pró-inflamatórios. Os genes referentes aos resultados adaptativos e macrofágicos estão entre aqueles que permaneceram invariáveis (**Figura 20, 23 e 24**).

Todas as amostras demonstraram modulações semelhantes dos genes pró-inflamatórios, logo, a expressão destes pela cepa clínica 5 demonstra o sucesso da inoculação bacteriana no hospedeiro. Apesar disso, a ausência ou baixa modulação dos demais genes propostos neste estudo sugerem que a infecção foi controlada nas etapas iniciais do processo invasivo, corroborando com o observado no fenótipo dos camundongos (**Figura 08, 13 e 14**).

A amostra 5 foi escolhida para fazer parte deste estudo por apresentar, além do genótipo invasivo (*ipaBCD, ial*), somente genes relativos a enterotoxina (*shET1A, shET1B, EVT*), sem a presença de nenhum gene efetor na genotipagem (**Tabela 1**). Estudos mostram que a presença de genes reguladores, principalmente o *virF*, é essencial para a ativação dos fatores invasivos (FALCONI et al., 1998). Acreditamos que, apesar do potencial de invasão *in vitro* e de apresentar o gene em testes moleculares, esta cepa, ao se deparar com antagonistas *in vivo*, não teve sua invasão bem sucedida.

Para as demais cepas clínicas, a alta taxa de estimulação entre os genes estudados após 48h (**Figura 17**) sugerem uma resposta progressiva em virtude do contínuo estímulo bacteriano e da inflamação aguda (PHALIPON e SANSONETTI, 2007).

Para os genes pró-inflamatórios dois apresentaram desempenho similar para todas as condições estudadas (**Figura 20**): a quimiocina CXCL15, responsável por recrutamento de neutrófilos (ROSSI et al., 1999) e IFN- β , um sinalizador de bactéria intracelular produzido principalmente por macrófagos, células dendríticas plasmocitóides e fibroblastos (STETSON e MEDZHITOV, 2006). Já os genes IL-1 β , IL-6 e TNF- α apresentaram valores variáveis, mas no geral, sua maior expressão ocorreu em 48h (**Figura 20**).

Os resultados de IFN- β corroboram com os encontrados por Schupf et al., (2012), nos quais em infecções realizadas em ligação do íleo de coelhos, as taxas de expressão de IFN- β não se modificaram em todas as condições testadas.

Para a quimiocina CXCL15, conhecida inicialmente como “lungkine”, sua expressão era tida como exclusivamente pulmonar, sendo uma das principais responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos a esta região, sendo homóloga a IL-8 (ROSSI et al., 1999). Schmitz et al., (2007) demonstraram a expressão de CXCL15 em outros órgãos mucosos e endócrinos. Os níveis de expressão pulmonares e gastrointestinais se mostraram similares, sendo que em pulmão de camundongos adultos BALB/c esta quimiocina é altamente expressa regulando a migração de neutrófilos frente à infecção externa (SCHMITZ et al., 2007; ROSSI et al., 1999).

A pouca variação na expressão de CXCL15 e IFN- β em nossos resultados, independente do tempo de infecção, sugere o recrutamento neutrofílico e presença de macrófagos para todas as amostras clínicas e a M90T. Em camundongos saudáveis, o pulmão é órgão livre de patógenos. Por um lado, este fato possibilita uma boa avaliação de respostas imunes inatas e adaptativas frente a um único agente patogênico; Por outro, a ausência de microbiota natural não mimetiza exatamente a infecção em humanos (FERNANDEZ e SANSONETTI, 2003).

Isto, aliado ao fato que a indução de IFN- β por macrófagos depende da estimulação do TLR4 (THOMAS et al., 2006), nos permite inferir que a indução da quimiocina CXCL15 e IFN- β , ocorreu pela presença de LPS bacteriano, ou seja, a ausência de variações se deve a presença de bactéria em todas as condições testadas.

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α (**Figura 20**) são multifuncionais com muitas possíveis fontes, sendo produzidas por macrófagos nos estágios primários da resposta antimicrobiana (SCHNUPF et al., 2012; AKIRA et al., 1990). Nossos resultados demonstraram uma alta regulação destas citocinas após

48h de infecção em todas as condições testadas, exceto para a IL-6 na cepa 27, que teve maior expressão em 24h. Apesar destas diferenças, as variações entre os tempos foram pequenas (**Figura 20**), indicando atividade de macrófagos devido a estimulação contínua por LPS.

Em relação às respostas pró-inflamatórias, podemos inferir que as expressões gênicas estão relacionadas com a própria inoculação bacteriana em um ambiente livre de patógenos. Os Padrões Moleculares Associados ao Patógeno (PAMP's), como o LPS bacteriano, induz a resposta primária à infecção por *Shigella*, e não tem grande relação com a capacidade das cepas em invadir as células epiteliais, sendo esta a principal hipótese sobre a ausência de variações entre a expressão de fatores pró-inflamatórios nas condições propostas (BIANCHI, 2007).

As respostas referentes à expressão macrofágica e da imunidade adaptativa são complementares, uma vez que o sucesso da resposta adaptativa depende da sinalização adequada pela inata, sendo virtualmente impossível discutir um sem abordar o outro devido a cooperação entre os sistemas.

Para a resposta imune adaptativa nos propusemos à caracterização de Th1, IFN- γ , IL-17A e IL-17B (**Figura 23**). Th-1 é um subtipo de células T em resposta a patógenos intracelulares, ativada por IL-12 e IFN- γ , liberando IL-2, IFN- γ e TNF- β (ROMAGNANI, 1991). O IFN- γ também pode ser produzido por células NK (*Natural Killer*) em modelo de infecção pulmonar na infecção inicial por *Shigella*, o qual é responsável pela ativação de Óxido Nítrico Sintetase (NOS) promovendo *clearance* (limpeza) bacteriano por macrófagos (WAY, 1998).

Um estudo promovido por Le-Barilec et al., (2005) demonstra que a ativação inicial de IFN- γ nos estágios primários da infecção por células NK leva a rápida ativação da resposta Th1 em infecções por *Shigella*, sendo esta descrita em vários modelos de invasão por *Shigella* (SINHA e BAGCHI, 2004).

A redundância de expressão de IFN- γ (NK e Th1) ajuda na rapidez do controle da infecção, caracterizando-o como um importante mediador da resposta contra as espécies de *Shigella* devido às ativações de células linfoides e óxido nítrico por macrófagos. No entanto, alguns pacientes demonstram uma baixa regulação de IFN- γ em estágios agudos da infecção, sugerindo um mecanismo de escape. Esta característica também pode ser simulada em modelo pulmonar em camundongos (PHALIPON e SANSONETTI, 2007; RAQUIB et al., 1997).

O Óxido Nítrico Sintetase (NOS) é produzido por células fagocíticas como macrófagos, monócitos e neutrófilos, sendo ativado por um primeiro sinal de IFN- γ , podendo ter o TNF como segundo sinal. A citocina TGF- β tem um efeito inibitório em sua ativação (WEINBERG, 1998). Os macrófagos são as primeiras células em resposta a invasão da *Shigella* e possuem uma participação importante na manipulação do sistema imune por este patógeno. A baixa regulação de IFN- γ pela bactéria inibe o primeiro sinal necessário à ativação de óxido nítrico, impedindo o *clearance* por macrófagos (PHALIPON e SANSONETTI, 2007; JENNISON e VERMA, 2004).

Nossos resultados mostraram uma baixa regulação de IFN- γ em relação a cepa 11 em 24 e 48h (**Figura 23**). O baixo nível de IFN- γ nestas amostras (5, 14, 27 e M90T), combinado com os baixos resultados de NOS (**Figura 24**), representa o sucesso no escape do macrófago por estas amostras de *Shigella*.

Os altos níveis de IFN- γ e NOS (**Figura 23 e 24**) na amostra 11 sugerem falha no escape macrofágico, ativação de óxido nítrico e posterior lise bacteriana (WEINBERG, 1998). Este comportamento é restrito a amostra 11, sugerindo alta regulação de macrófagos nesta amostra. Estudos com várias mutantes de *Shigella* demonstraram que a baixa regulação de IFN- γ é dependente de efetores da Sistema de Secreção Tipo III (T3SS) (PHALIPON e SANSONETTI, 2007). Nossa caracterização preliminar apresenta somente o *ipaBCD* e *ipaH* como membros do T3SS (**Tabela 1**), sendo necessários mais estudos necessários para avaliar os genes ausentes na cepa 11 que levaram a esta possível falha no mecanismo de escape. Estes estudos também esclareceriam se há alguma relação com a enterotoxina *shET1A*, o único gene ausente na cepa 11 que é comum a todas as outras amostras.

Além do *clearance* pela ativação de Óxido Nítrico Sintetase (NOS), como Célula Apresentadora de Antígeno (APC), a resposta macrofágica também envolve os Receptores de Histocompatibilidade Classe II (H2-A β 1, H2-E β , H2-K1, MHC-like 2 (BAUNGART et al., 1998).

A expressão do gene Th1-like neste estudo demonstrou uma atividade heterogênea: As amostras M90T e 5 tiveram baixa expressão; Amostra 27 foi mais expressa em 24h; Amostra 14 teve maiores taxas em 48h (**Figura 23**). A presença de células Th1 juntamente com antígenos de HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) em pacientes com inflamação aguda no intestino pode significar proteção

contra Shigellose devido a ativação primária da resposta Th1 (SINHA e BAGCHI, 2004).

Antígenos de Histocompatibilidade II (**Figura 24**) tiveram uma expressão similar em todas as amostras em sua região A β 1; alta expressão para a cepa 27 em suas regiões E β e K1 após 48h de infecção; e altos valores para a cepa 14 para o MHC-like 2 em 48h. Estes dados são complementares a expressão de Th1 para as cepas 14 e 27, indicando efetivação da resposta Th1 apesar dos níveis baixos de IFN- γ , necessário à diferenciação Th1. Um fato interessante é que ambas as amostras possuem a presença diferencial do gene *ipaH*, importante no escape do vacúolo fagocítico de macrófagos (FERNANDEZ-PRADA et al., 2000). Nossos dados sugerem que o gene *ipaH* também possa ter um papel na estimulação da imunidade Th1.

A citocina IL-17 também foi proposta neste estudo como pertencente à imunidade adaptativa uma vez que o Th17 tem sido demonstrado como relevante na proteção a infecções por *Shigella* (SCHNUPF e SANSONETTI, 2012). IL-17 é um estímulo para neutrófilos e linfócitos T, podendo estar disponíveis em muitas fontes como células Th17, T CD8, NK e neutrófilos (WEAVER et al., 2007; KOLLS e LINDEN, 2004), sendo considerado uma ponte importante entre a imunidade inata e adaptativa (FLIERL et al., 2008). IL-17 parece ser uma das primeiras citocinas em resposta a bactérias patogênicas e mudanças no intestino. As células Th17 promovem imunidade protetora e são uma das primeiras primadas (*prime*) nas infecções intranasais por *Shigella*, com a detecção de IL-17 e IL-22 (SCHNUPF e SANSONETTI, 2012).

Sellge et al., (2010) realizaram um estudo usando modelo murino de Shigellose, investigando a imunidade específica de células T. Como conclusões principais, encontraram que a *Shigella flexneri* prima predominantemente células Th17 produtoras de IL-17 e IL-22, porém IL-17A só pode ser encontrada níveis acima dos controles não infectados 6 dias após a infecção.

Nossos resultados demonstram que a cepa de *Shigella* clínica 27 como uma ótima indutora de IL-17A e IL-17B depois de apenas 48h de infecção (**Figura 23**). Estudos adicionais são necessários para avaliar se esta produção ocorre em função de células Th17 ou somente como produto de células da imunidade inata, mas já confere a esta cepa a capacidade de primar células Th17 (CUA e TATO, 2010).

A proteína anti-inflamatória TGF- β possui a função de controle de proliferação, diferenciação e outras funções celulares (HERPIN et al., 2004). É encontrada altamente expressa em pacientes durante a Shigellose aguda (RAQUIB et al., 1995) e em estágios convalescentes para humanos (SCHNUPF e SANSONETTI, 2012) com a intenção de prevenir a destruição tecidual e morte do hospedeiro. Em roedores, TGF- β também possui a função no desenvolvimento de Th17 em combinação com citocinas pró-inflamatórias (SELGE et al., 2010). Nossos resultados não demonstraram diferenças na expressão dos genes TGF- β 1 e TGF- β 2, porém para TGF- β 3 ele foi altamente expresso na cepa 27 em 48h (**Figura 21**). Este resultado complementa os referentes a IL-17, sugerindo uma possível estimulação de Th-17 pela cepa clínica 27 em 48h de infecção.

A defesa proveniente da IL-17A, com a produção de citocinas pró-inflamatória e recrutamento de neutrófilos é uma das mais presentes na resposta a infecção por *Shigella* (ISHIGAME et al., 2009; IWAKURA et al., 2011). Apesar de não podermos confirmar o envolvimento de células Th17, podemos sugerir o envolvimento da IL-17 no recrutamento de neutrófilos, necessários à invasão por *Shigella*. Os neutrófilos, durante a invasão por *Shigella*, rompem as junções oclusivas que unem o epitélio intestinal, liberando uma nova entrada para o lúmen intestinal em um mecanismo independente de células-M. Este envolvimento dos neutrófilos parece ser crucial para a inflamação e a destruição tecidual (JENNISON e VERMA, 2004; PERDOMO et al., 1994). Por outro lado, o maior recrutamento neutrofílico pode degradar as proteínas de virulência da *Shigella* através da elastase e confinar as bactérias extracelulares à mucosa impedindo a invasão e disseminação (WEINRAUCH et al., 2002; ZANG et al., 2001). As altas taxas de IL-17, subsequentemente de neutrófilos, em estimulação gradual de 24 para 48h para a cepa clínica 27 sugerem maiores taxas de invasão na região basal do epitélio.

Em concordância com estes resultados, a amostra 27 também demonstrou altos valores de expressão para o TLR4 e TLR9 (**Figura 22**) que reconhecem LPS e CpG DNA, respectivamente (HIPPENSTIEL et al., 2006). O TLR4 é encontrado na membrana basolateral das células epiteliais e possui um papel importante na interação bacteriana durante o reconhecimento de LPS (ADEREM et al., 2000). O TLR9 reconhece apenas CpG DNA não-metilado de bactéria intracelular (HEMMI et al., 2000). Ambos levam a ativação do fator transcricional pró-inflamatório NF- κ B (ELEWAUT et al., 1999). A alta expressão de mRNA para os TLR4 e 9 para a

amostra 27 sugere um bom reconhecimento intra e extracelular e sucesso na invasão (TLR9).

Os receptores intracelulares NOD1 e NOD2 demonstraram um resultado heterogêneo. Todas as amostras obtiveram níveis similares de expressão, exceto as amostras 11 e 27, as quais obtiveram resultados expressivos (**Figura 22**). Estes resultados concordam com os resultados de TLR9 para a amostra 27, demonstrando grande potencial invasivo, e relaciona esta habilidade para a amostra 11. Estes resultados concordam com o encontrado na característica fenotípica dos camundongos (**Figura 08, 13 e 14**), sendo as cepas 11 e 27 as que apresentaram maiores alterações fisiológicas.

Muitos antagonistas de Receptores Toll (TLR) como o CpG DNA e LPS são ditos como potentes adjuvantes de mucosa, desenhados para preservar a estrutura antigênica e apresentar o antígeno efetivamente (KAMINSKI et al., 2006; JIANG e KOGANTI, 2003). A patogenicidade da *Shigella* está em sua habilidade de invadir o epitélio intestinal levando a uma resposta imune pró-inflamatória, não havendo necessidade de adjuvantes. No entanto, quanto maior estímulo as células da resposta imune inata, maior a liberação de citocinas pró-inflamatória e influência sobre a resposta adaptativa (KAMINSKI et al., 2006) estabelecendo a cepa clínica 27 como um bom estímulo a imunidade (**Figura 22**).

A indução do processo inflamatório necessita de uma *Shigella* com um perfil invasivo com todos os fatores necessários (SELGE et al., 2010). Nossa cepa clínica 27 foi caracterizada como possuindo o plasmídeo de invasão (*ipa*) como as demais presentes neste estudo. A diferença principal está na presença de todos as subunidades da enteroxina de *Shigella* (*shET1A*, *shET1B*, *shET2*), que diferente das Shiga-Toxinas (*stx*) estão envolvidas no processo de invasão (VARGA et al., 1999), e podem ser a principal razão da resposta diferencial da cepa 27.

O potencial imunogênico do isolado clínico 27 foi demonstrado através da regulação positiva de fatores chave da resposta imune quando comparados a outros isolados e a M90T. Mais estudos são necessários para expor totalmente que fatores de virulência são diferencialmente expressos durante a invasão. Contudo, a habilidade da cepa 27 pode ser utilizada para melhorar o entendimento sobre o fenótipo invasivo da *Shigella* e sua relação com a imunidade e como uma possível fonte para vacinas vivas atenuadas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS e PERSPECTIVAS FUTURAS

Com base em todas as evidências encontradas, propusemos quatro esquemas hipotéticos sobre o modo de ação de cada cepa clínica analisada neste estudo. Para exemplificar a invasão por M90T, a **Figura 29** demonstra a modulação da resposta imune clássica conforme a literatura (SCHROEDER e HILBI, 2008).

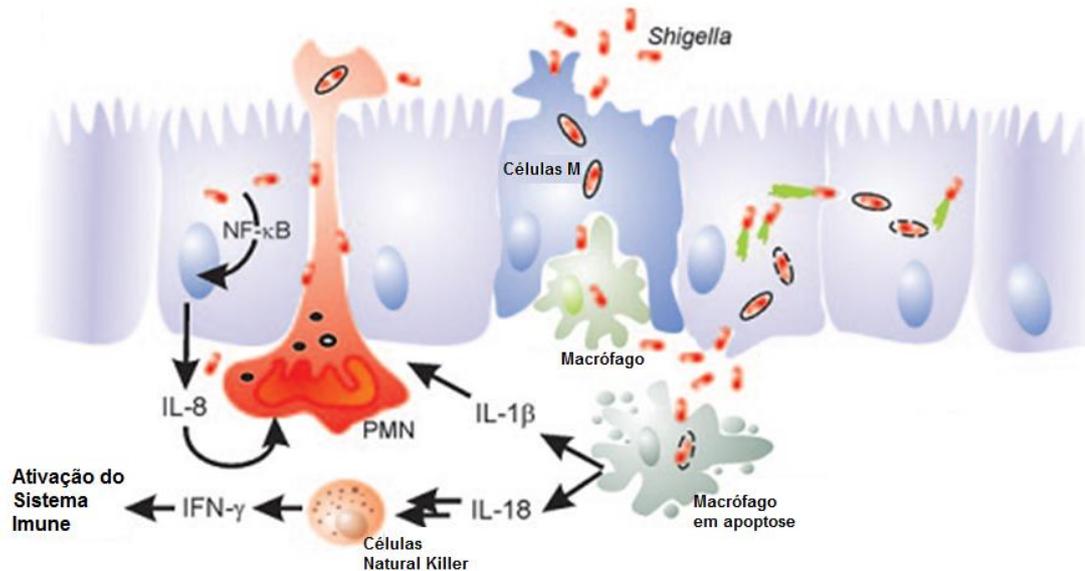


Figura 29: Desenho esquemático da modulação da resposta imune por M90T.

Fonte: Adaptado de Schroeder e Hilbi, 2008.

A amostra clínica 5 possuiu boa regulação dos genes pró-inflamatórios (**Figura 20**) e baixos níveis de expressão de IFN- γ e NOS (**Figura 23** e **24**). Isto sugere que ela efetuou o escape do macrófago com sucesso. Porém a baixa ou ausência de diferença entre os genes referentes às respostas adaptativas e macrofágicas não permitiram avaliar a invasão (**Figura 23** e **24**). Acreditamos com base nos aspectos fenotípicos da cobaia após a infecção (**Figura 08**, **13** e **14**) e na ausência de modulação dos demais genes, que a infecção por esta cepa foi controlada em suas etapas iniciais (**Figura 30**).

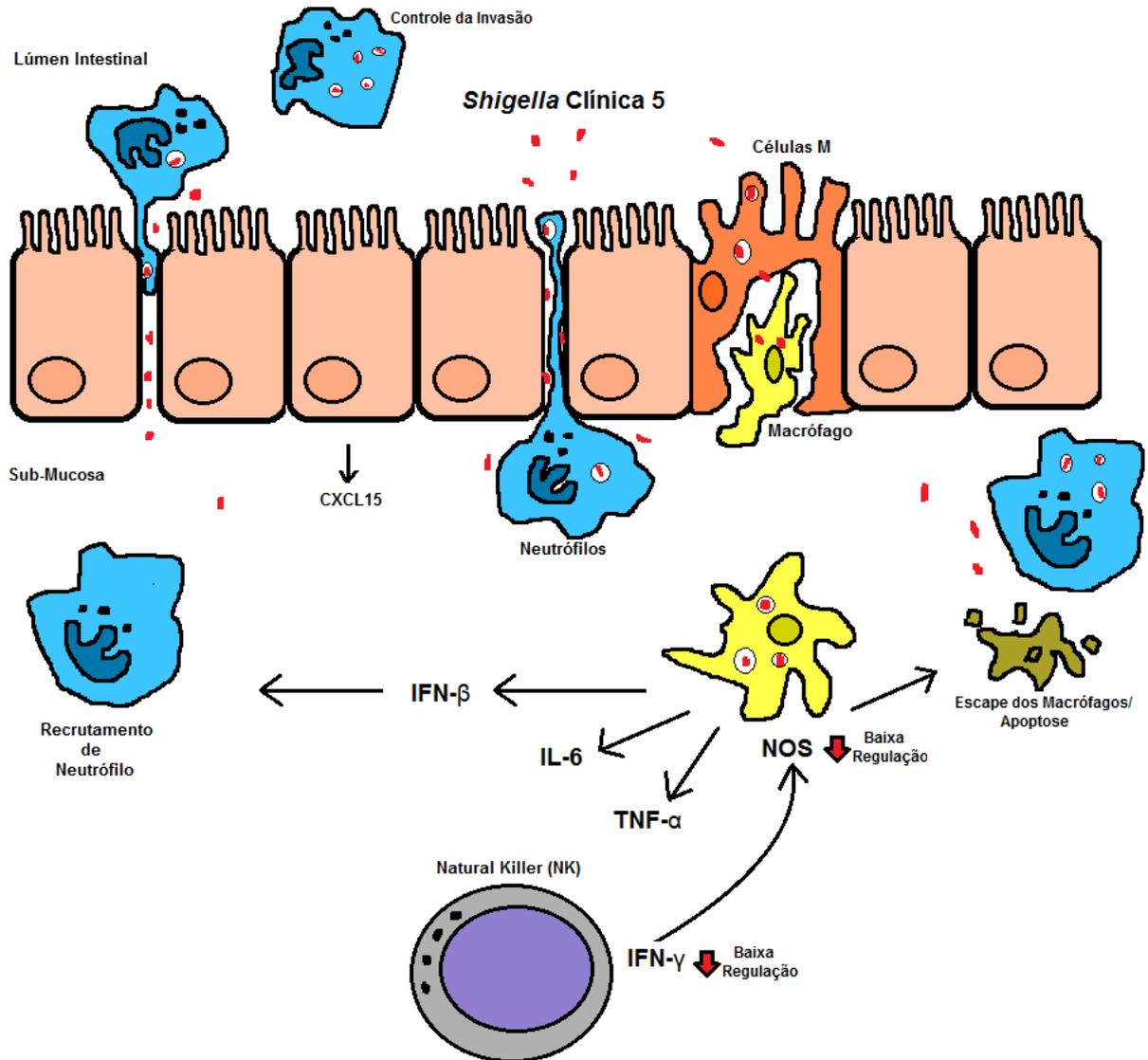


Figura 30: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 5.

A amostra clínica 11 efetuou regulação de genes pró-inflamatórios (**Figura 20**), porém, em oposição as outras amostras, apresentou níveis elevados de expressão de IFN- γ e NOS (**Figura 23** e **24**) sugerindo o sucesso do *clearance* bacteriano pelo macrófago. A alta expressão dos receptores NOD1 e 2 (**Figura 24**) por esta cepa, levam a crer no sucesso da invasão, confirmada pelas características fenotípicas do hospedeiro (**Figura 08, 13 e 14**) apesar da alta atividade macrofágica (**Figura 31**).

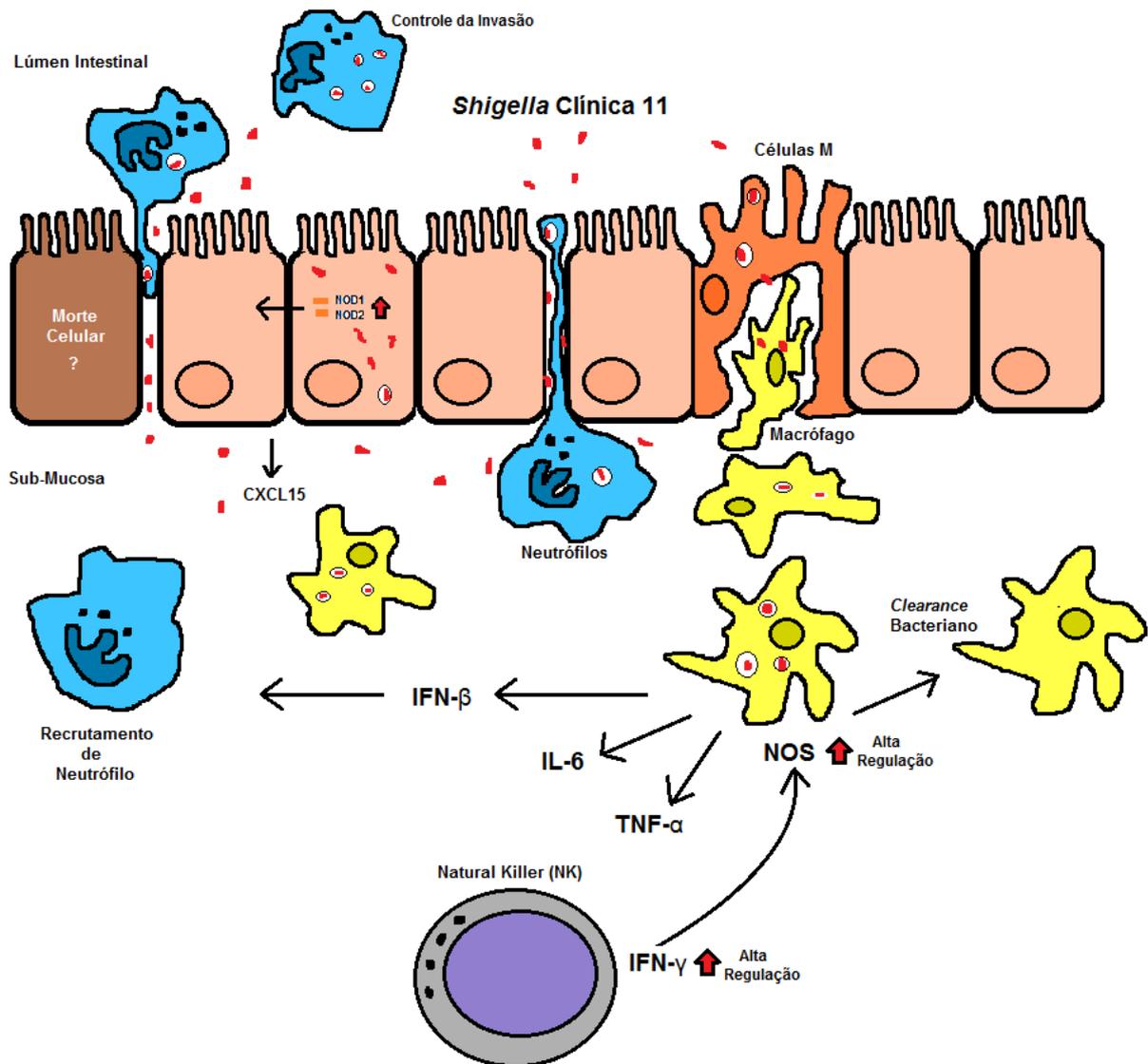


Figura 31: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 11.

Para a amostra clínica 14, a regulação da resposta pró-inflamatória (**Figura 20**) e o escape macrofágico (**Figura 23** e **24**) foram possivelmente bem sucedidos. As baixas expressões de receptores intracelulares (NOD1/2, TLR9) (**Figura 24**) não permitem inferir no processo invasivo, as características fenotípicas das cobaias também permaneceram inalteradas (**Figura 08**, **13** e **14**). Porém, a presença de MHC-like II (**Figura 24**) e Th1 (**Figura 23**) sugerem a possibilidade de resposta Th1 (**Figura 32**).

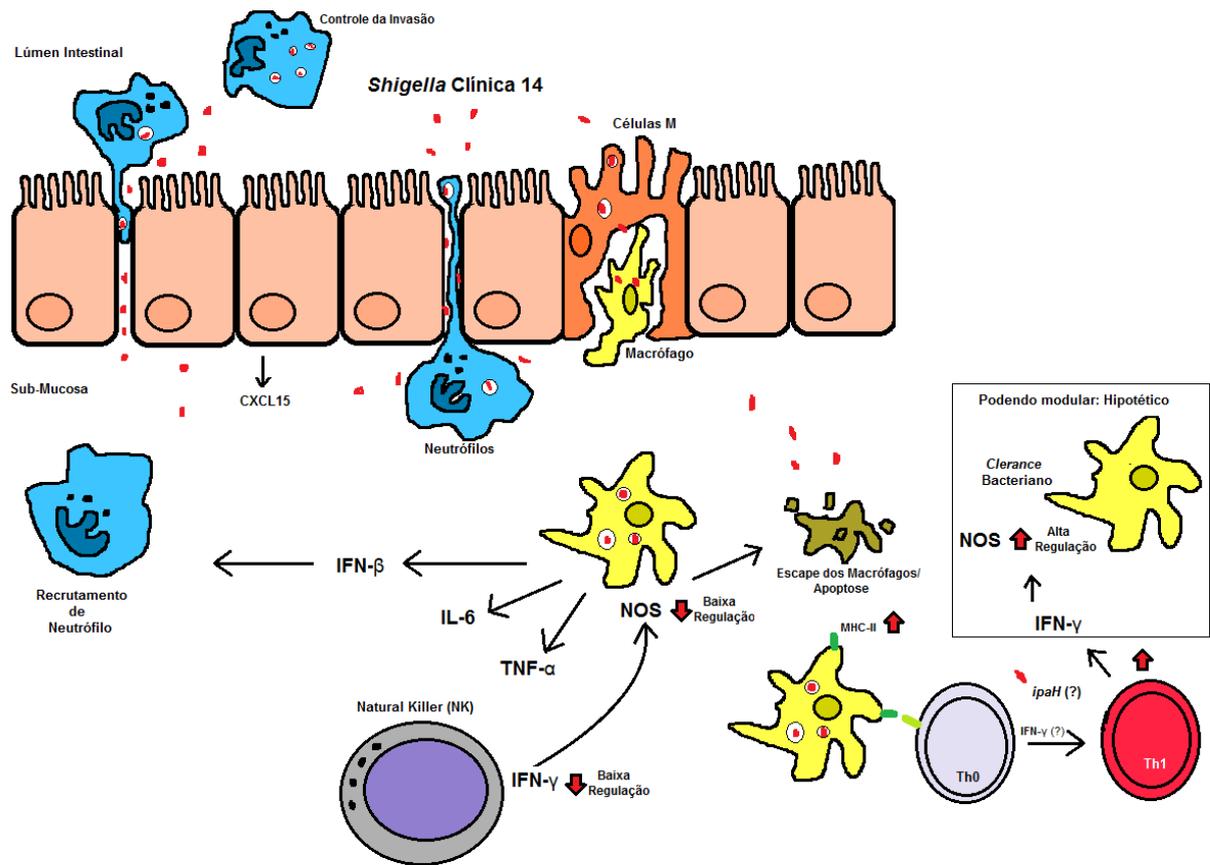


Figura 32: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 14.

A amostra clínica 27 demonstrou ser a mais eficaz na modulação da resposta imune, boa expressão nos estágios iniciais (**Figura 20**) e alta regulação de receptores intracelulares (**Figura 24**) confirmando altas taxas de invasão. Este perfil invasivo foi confirmado no fenótipo das cobaias (**Figura 08, 13 e 14**). A alta expressão de receptores de Histocompatibilidade Classe II (H2-Eβ, H2-K1) (**Figura 24**) e de Th1 (**Figura 23**) sugerem uma resposta Th1. A presença de níveis elevados de IL-17 (**Figura 23**), que também modula o recrutamento de neutrófilos e pode ser expressa por células NK, em conjunto com TGF-β (**Figura 22**) sugerem uma resposta Th-17 (**Figura 33**).

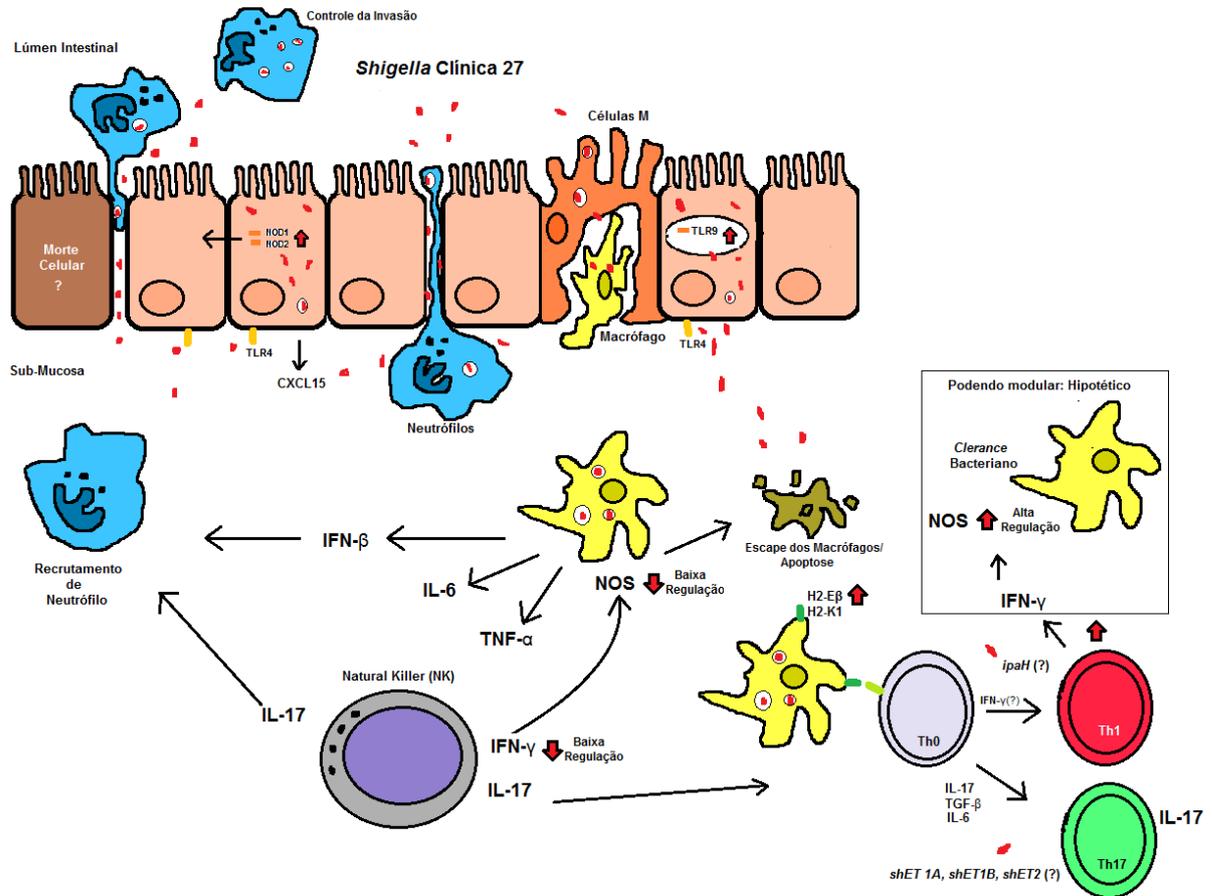


Figura 33: Desenho esquemático da modulação da resposta em modelo pulmonar pela amostra clínica 27.

As quatro cepas clínicas propostas neste estudo foram escolhidas com base na presença ou ausência dos genes *ipaH*, *virF*, *invE*, *shET1A*, *shET1B* e *shET2*. Apesar de ser um número limitado de genes, sua variação entre as amostras, levou a quatro perfis de resposta imune distintos. Uma caracterização mais ampla da expressão gênica bacteriana seria necessária para o desenho do perfil completo do comportamento destas amostras *in vivo*, porém o potencial inflamatório destas amostras foi demonstrado neste estudo.

Com relação a estes genes de virulência, duas hipóteses foram sugeridas: A modulação da resposta Th1 teria relação com a presença do gene *ipaH* nas cepas clínicas de *Shigella*; A alta imunogenicidade apresentada pela amostra 27 pode ser atribuída à presença do complexo de enterotoxinas (*shET1A*, *shET1B*, *shET2*). (Figura 32 e 33).

Estudos adicionais serão necessários para responder a estas hipóteses específicas. Porém, os resultados aqui obtidos sugerem que estes genes são chaves para o potencial de virulência da *Shigella*, uma vez que a ausência de um, ou um grupo deles, provocaram diferentes respostas em um mesmo modelo experimental.

Dentre as cepas propostas, a amostra clínica 27 demonstrou um grande potencial imunogênico, sendo ela uma boa candidata para estudos futuros. Esta amostra está sendo submetida a um sequenciamento completo de seu genoma, para a elucidação de todo seu potencial genético.

Novas padronizações da recuperação do mRNA bacteriano estão sendo programadas em projetos futuros, visando identificar o perfil de virulência complementar a esta resposta imune.

Esta caracterização da regulação da resposta imune de cepas clínicas isoladas de casos de Shigellose é inédita, e demonstrou como diferentes cepas se comportam entre si e com relação a um padrão bem caracterizado. As diferenças de resposta entre a cepa padrão M90T e as cepas clínicas justifica o desenvolvimento de vacinas baseadas em cepas clínicas e serve de base aos estudos que defendem a criação de vacinas que sejam regionais.

CONCLUSÕES

- A cepa padrão M90T demonstrou uma regulação gênica diferencial quando comparada com as amostras clínicas, indicando grandes diferenças entre as respostas imunes de padrões bem caracterizados e cepas selvagens;
- Os genes tidos como Pró-Inflamatórios (CXCL15, IFN- β , IL-1 β , IL-6 e TNF- α) não apresentaram diferenças entre as cepas por se tratarem da primeira resposta frente à presença de bactérias, através de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMP's) como o LPS bacteriano, não a invasão em si;
- A amostra clínica 5 não apresentou diferenças nos tempos analisados em relação aos genes propostos. A avaliação da expressão genica, juntamente com os aspectos fenotípicos da cobaia, indicaram baixas taxas de invasão desta amostra e o controle da infecção nos estágios iniciais;
- A amostra clínica 11 indica alta atividade macrofágica e *clearance* bacteriano dependente de Óxido Nítrico. Apesar disto, os resultados de NOD e aspectos fenotípicos da cobaia sugerem sucesso na invasão;
- As amostras clínicas 14 e 27 demonstraram um padrão de resposta de proteção Th1, possivelmente relacionada com a presença do gene *ipaH*. As cepas clínicas que apresentaram uma menor ou ausência de modulação de resposta Th1 demonstraram ausência deste gene;
- A amostra 27 possuiu uma regulação diferencial dos genes IL-17A/IL-17B, TGF- β 3 e TLR4/TLR9, que são relacionados a possibilidade de primar células Th17. Esta amostra apresentou um grande potencial imunogênico, devido a possível relação com as enterotoxinas de *Shigella* (*shET1A*, *shET1B*, *shET2*).
- As quatro cepas clínicas propostas neste estudo, possuíam diferentes genótipos com relação aos genes *ipaH*, *virF*, *invE*, *shET1A*, *shET1B* e *shET2*. Estas diferentes variações levaram a quatro perfis de resposta imune distintos. Caracterizando-os como genes chaves para o potencial de virulência de cepas de *Shigella*;

- A cepa clínica 27 foi caracterizada como uma boa candidata para estudos futuros sobre estratégias de invasão, virulência e possíveis fontes vacinais com base nos aspectos diferenciais das cepas clínicas regionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEREM, A; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the Innate Immune Response. **Science**, v. 406, n. 6797, p. 782–787, 2000.

AKIRA, S; HIRANO, T; TAGA, T; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional Cytokines: IL6 and related molecules (IL1 and TNF). **The FASEB Journal**, v. 4, n. 11, p. 2860-7, 1990.

ANGELINI, M; STEHLING, E. G; MORETTI, M. L; SILVEIRA, W. D. Molecular epidemiology of *Shigella* spp strains isolated in two different metropolitan areas of southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n.3, p. 685-692, 2009.

ANSARUZZAMAN, M; KIBRIYA, A; RAHMAN, A; NEOGI, P. K. B; FARUQUE, A. S. G; ROWE, B; ALBERT, M. J. Detection of provisional serotypes of *Shigella dysenteriae* and designation as *S.dysenteriae* serotype 14 and 15. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 33, n. 5, p. 1423 – 1425, 1995.

ARAYA, M; FIGUEROA, G; ESPINOZA, J; ZARUR, X; BRUNSER, O. Acute and Asymptomatic Infection in Chilean Preschoolers of Low and High Socio-economic Strata. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v.75, n. 4, p. 645 – 651, 1986.

BASTOS, F, B; LOUREIRO, E. C. B. Caracterização da resistência antimicrobiana de amostras de *Shigella* spp. isoladas em Belém, Estado do Pará, Brasil (1990-2000). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n. 4, p. 71-74, 2010.

BASTOS, F. C; LOUREIRO, E. C. B; HOFER, E. Frequency of *Shigella flexneri* serotypes isolated in the state of Pará, Brazil (1979-2009). **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 3, p. 277-284, 2012.

BAUMGART, M; MOOS, V; SCHUHBAUER, D; BRIGITTE, M. Differential expression of major histocompatibility complex class II genes on murine macrophages associated with T cell cytokine profile and protective suppressive effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p.6936–6940, 1998.

BREED, R. S., MURRAY, E. G. D., HITCHENS, A. P. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, The Williams & Wilkins Company 6th Edition, Baltimore, Md, 1948.

BIANCHI, ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p. 1-5, 2007.

BOURDET-SICARD, RÜDIGER, M; J OCKUSCH, B. M; GOUNON, P; SANSONETTI, P, J; NHIEU, G. T. Binding of the Shigella protein IpaA to vinculin induces F-actin depolymerization. **Journal EMBO**, v. 18, p. 21, p. 5853-5862, 1999.

CERSINI, A; MARTINO, M. C; MARTINI, I; ROSSI, G; BERNARDINI, M. L. Analysis of Virulence and Inflammatory Potential of *Shigella flexneri* Purine Biosynthesis Mutants. **Infection and Immunity** p. 7002-7013, 2003.

CHOI, SY, JEON, Y-S; LEE, J. H; CHOI, B; MOON, S. H; SEIDLEIN, L. V; CLEMENS, J. D; DOUGAN, G; WAIN, J; YU, J; LEE, J. C; SEOL, S. W; LEE, B. K; SONG, J-H; SONG, M; CZERKINSKY, C; CHUN, J; KIM, D. W. Multilocus sequence typing analysis of *Shigella flexneri* isolates collected in Asian countries. **Journal of Medical Microbiologic**, v. 56, n. 11, p. 1460-1466, 2007.

COIMBRA, R. S; GRIMONT, F; GRIMONT, P. A. D. Identification of *Shigella* serotypes by restriction of amplified O-antigen gene cluster. **Research in Microbiology**. v. 150, n. 8, p. 543-553, 1999.

COIMBRA, R. S; NICASTRO, G; GRIMONT, P. A. D; GRIMONT, F. Computer identification of *Shigella* species by rRNA gene restriction patterns. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 47-55, 2001.

CRUZ, C. B. N; SOUZA, M. C. S; SERRA, P. T; SANTOS, I; BALIEIRO, A; PIERI, F. A; NOGUEIRA, P. A; ORLANDI, P. P. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, v. 2014, ID 539697, 2014.

CUA, D. J; TATO, C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. **Nature reviews Immunology**, v. 10, n. 7, p. 479–489, 2010.

de SOUZA, M. C. S; CRUZ, C. B. N; SERRA, P, T; SANTOS, I; ORLANDI, P. P; NOGUEIRA, P. A. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, em publicação, submetido em 27 de junho de 2013.

DEMERS, B; SANSONETTI, P. J; PARSOT, C. Induction of type III secretion in *Shigella flexneri* is associated with differential control of transcription of genes encoding secreted proteins. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 10, p. 2894-2903, 1998.

ELEWAUT D, DIDONATO JA, KIM JM, TRUONG F, ECKMANN L, AND KAGNOFF, MF. NF-kB Is a Central Regulator of the Intestinal Epithelial Cell Innate Immune Response Induced by Infection with Enteroinvasive Bacteria. **Journal of Immunology**, v.163, n. 3, p. 1457–1466, 1999.

FALCONI, M; COLONA, B; PROSEDA, G; MICHELI, G; GUALERZI, C. O. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS. **Journal EMBO**, v. 17, n. 23, p. 7033-7043, 1998.

FENNELLY, G. J; KHAN, S. A; ABADI, M. A; WILD, F; BLOOM, B. R. Mucosal DNA Vaccine Immunization Against Measles with a Highly Attenuated *Shigella flexneri* Vector. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 3, p.1603-1610, 1999.

FERNANDEZ, M.I; SANSONETTI, P. J. *Shigella* interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. **International Journal of Medicine and Microbiology**. v. 293, n. 1, p. 55-67, 2003.

FERNANDEZ-PRADA, C. M; HOOVER, D. L; TALL, B. D; HARTMAN, A. B; KOPELOWITZ, J; VENKATESAN, M. M. *Shigella flexneri* IpaH Facilitates Escape of Virulent Bacteria from the Endocytic Vacuoles of Mouse and Human **Macrophages American society for Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3608-3619, 2000.

FLIERL, M. A; RITTIRSCH, D; GAO, H; HOESEL, L. M; NADEAU, B. A; DAY, D. E; ZETOUNE, F. S; SARMA, J. V; HUBER-LANG, M. S; FERRARA, J. L. M;

WARD, P. A. Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis **The FASEB Journal**, v. 22, n. 7, p. 2198-2205, 2004.

FORMAL, S. B; HALE, T. L; KAPFER, C; COGAN, J. P; SNOY P. J; CHUNG, R; WINGFIELD, M. E; ELISBERG, B. L; BARON, L. S. Oral vaccination of monkeys with an invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 465–469, 1984.

FUKUSHIMA, M; KAKINUMA, K; KAWAGUCHI, R. Phylogenetic analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli strains on the basis of the gyrB gene sequence. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2779-2785, 2002.

GOMES, T. A; RASSI, V; MACDONALD, K. L; RAMOS, S. R. T. S; TRABULSI, L. R; VIEIRA, M. A. M; GUTH, B. E. C; CANDEIAS, J. A. N; IVEY, C; TOLEDO, M. R. F; BLAKE, P. A. Enteropathogens Associated with Acute Diarrheal Disease in Urban Infants in São Paulo, Brasil. **Journal of Infectious Disease**, v. 164, n. 2, p. 331-7, 1991.

GORDEN, J; SMALL, P. L. C. Acid Resistance in Enteric Bacteria. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 1, p. 364-367, 1993.

GORDON, J. E; ASCOLI, W; PIERCE, V; GUZMAND, N; MATA, J. Studies of Diarrheal Disease in Central America VII. Treatment of preschool children with paromomycin and sulfamethoxypyridazine under field conditions in a Guatemalan highland village. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.14, n. 6, p, 404-411, 1965.

GUERREIRO, L. T. A; ROBOTOM-FERREIRA, A. B; RIBEIRO-ALVES, M; TOLEDO-PINTO, T. G; ROSA BRITO, T. Gene Expression Profiling Specifies Chemokine, Mitochondrial and Lipid Metabolism Signatures in Leprosy. **PLoS ONE**, v.8, n. 6, p. e64748, 2013.

HATHAWAY, L. J; KRAEHENBUHL, J-P. The role of M cells in mucosal immunity. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 57, n. 2, p. 323–332, 2000.

HEMMI, H; TAKEUCHI, O; KAWAI, T; KAISHO, T; SATO, S; SANJO, H; MATSUMOTO, M; HOSHINO, K; WAGNER, H; TAKEDA, K; AKIRA, S. A. Toll-

like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature**, v. 408, n. 6813, p. 740–745, 2000.

HERPIN, A; LELONG, C; FAVREL, P. Transforming growth factor- β -related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 461-485, 2004.

HIGH, N. M; MOUNIER, J; PROVOST, M. J; SANSONETTI, P. J. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. **Journal EMBO**, v. 11, n. 5, p. 1191-1199, 1992.

HIPPENSTIEL, S; OPITZ, B; SCHMECK, B; SUTTORP, N. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia – molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. **Respiratory Research**, v.7, p.97, 2006.

ISHIGAME, H; KAKUTA, S; NAGAI, T; KADOKI, M; NAMBU, A; KOMIYAMA, Y; FUJIKADO, N; TANAHASHI, Y; AKITSU, A; KOTAKI, H; SUDO, K; NAKAE, S; SASAKAWA, C; IWAKURA, Y. Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. **Immunity** v. 30, n. 1, p. 108–119, 2009.

IWAKURA, Y; ISHIGAME, H; SAIJO, S; NAKAE, S. Functional specialization of interleukin-17 family members. **Immunity**, v. 34, n.2, p. 149-62, 2011.

JANG, J. S; SIMON, V. A; FEDDERSEN, M. R; RAKHSHAN, F; SCHULTZ, D. A; ZSCHUNKE, M. A; LINGLE, W. L; KOLBERT, C. P; JEN, J. Quantitative miRNA expression analysis using Fluidigm microfluidics dynamic arrays. **BMC Genomics**. v. 9, n. 12, p. 1-8, 2011.

JENNISON, A. V; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. **FEMS Microbiologic Reviews**, v. 28, n. 1, p. 43-58, 2004.

JENNISON, A. V; VERMA, N. K. The acid-resistance pathways of *Shigella flexneri* 2457T. **Microbiology**, v. 153, n. 8, p. 2593–2602, 2007.

JENSEN, V. B; HARTY, J; JONES, B. D. Interactions of the Invasive Pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M

Cells and Murine Peyer's Patches. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3758-3766, 1998.

JIANG, Z. H; KOGANTY, R. R. Synthetic vaccines: the role of adjuvants in immune targeting. **Current Medicinal Chemistry** v.10, n. 15, p.1423–1439, 2003.

KAMINSKI, R.W; TURBYFILL, K. R; OAKS, E. V. Mucosal Adjuvant Properties of the *Shigella* Invasin Complex. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 5, p. 2856–2866, 2006.

KAPPERUD, G; RØRVIK, L. M; HASSELTVEDT, V; HØIBY, E. A; IVERSEN, B. G; STAVELAND, K; JOHNSEN, G; LEITAO, J; HERIKSTAD, H; ANDERSSON, Y; LANGELAND, G; GONDROSEN, B; LASSEN, J. Outbreak of *Shigella sonnei* Infection Traced to Imported Iceberg Lettuce. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 609-614. 1995.

KEENE, W. E; McANULY, J. M; HOESLY, F. C; WILLIAMS, P. Jr; HEDBERG, K; OXMAN, G. L; BARRETT, T. J; PFALLER, M. A; FLEMING, D. W. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 9, p. 579, 1994.

KOLLS, J. K; LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. **Immunity**, v.21, n.4, p. 467–476, 2004.

KONRADT, C; DI BARTOLO, V; FRIGIMELICA, E; SCOTT-ALGARA, D; NOTHELFER, U. P. M. M; RODRIGUES, C. D; PUHAR, A; SANSONETTI, P. J; SALGADO-PABON, W; PHALIPON, A. The *Shigella flexneri* Type Three Secretion System Effector IpgD Inhibits T Cell Migration by Manipulating Host Phosphoinositide Metabolism. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 4, p. 263–272, 2011.

KOTLOFF, K. L; WINICKOFF, J. P; IVANOFF, B; CLEMENS, J. D; SWERDLOW, D. L; SANSONETTI, P. J; ADAK, G. K; LEVINE, M. M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull World Health Organ**, v. 77, n. 8, p. 651-666, 1999.

KOTLOFF, K. L; NORIEGA, F. R; SAMANDARI, T; SZTEIN, M. B; LOSONSKY, G. A; NATARO, J. P; PICKING, W. D; BARRY, E. M; LVINE, M. M. *Shigella flexneri* 2a Strain CVD 1207, with Specific Deletions in *virG*, *sen*, *set*, and *guaBA*, Is Highly Attenuated in Humans **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1034–1039, 2000.

LAN, R; CHEHANI ALLES, M; DONOHOE, K; MARTINEZ, M. B; REEVES, P. R. Molecular Evolutionary Relationships of Intero invasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5080–5088, 2004.

LIMA, A. A. M; FANG, G; SCHORLING, J. B; DE ALBUQUERQUE, L; MCAULIFFE, J. F; MOTA, S; LEITE, R; GUERRANT, R. L. Persistent diarrhea in northeast Brazil: etiologies and interactions with malnutrition. **Acta Paediatrica**, v. 381, p. 39-44, 1992.

LINHARES, A. C. Epidemiology of Diarrhea Infection among Indian Populations of Amazonia. **Cadernos de Saúde Pública**, v.8, n. 2, p. 121-128, 1992.

MAGUIRE, H.C; SENG, C; CHAMBERS, S; CHEASTY, T; DOUBLE, G; SOLTANPOOR, N; MORSE, D. *Shigella* outbreak in a school associated with eating canteen food and person to person spread. **Communicable Disease and Public Health**, v. 1, n. 4, p. 279-80, 1998.

MALLET, T. P; HALE, T. L; KAMINSKI, R. W; LARSEN, T; ORR, N; COHEN, D; LOWELL, G. H. Intranasal or Intra gastric Immunization with Proteasome-*Shigella* Lipopolysaccharide Vaccines Protects against Lethal Pneumonia in a Murine Model of *Shigella* Infection. **Infection and Immunity**, v.63, n. 6, p. 2382–2386, 1995.

MANTIS, N; PRÉVOST, M. C; SANSONETTI, P. Analysis of Epithelial Cell Stress Response during Infection by *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2474–2482, 1996.

MAVRIS, M; SANSONETTI, P. J; PARSOT, C. Identification of the *cis*-Acting Site Involved in Activation of Promoters Regulated by Activity of the Type III Secretion Apparatus in *Shigella flexneri*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 24, p. 6751-6759, 2002.

MEDEIROS, M. I; NEME, S; DA SILVA, P; CAPUANO, D. M; ERRERA, M. C; FERNANDES, S. A; DO VALLE, G. R; DE AVILA, F. A. Etiology of acute diarrhea among children in Ribeirao Preto-SP, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 21 – 4, 2001.

MURRAY, C. J. L; LOPEZ, A. D. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 349, p. 1498–1504, 1997.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S; KOBAYASHI, G. S; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan 3 ed. Rio de Janeiro: 604 p., 1998.

NAIMI, T.S; WICKLUND, J.H; OLSEN, S.J; KRAUSE, G; WELLS, J.G; BARTKUS, J.M; BOXRUD, D. J; SULLIVAN, M; KASSENBERG, H; BESSER, J.M; MINTZ, E.D; OSTERHOLM, M.T; HEDBERG, C.W. Concurrent Outbreaks of *Shigella sonnei* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections Associated with Parsley: Implications for Surveillance and Control of Foodborne Illness. **Journal Food Protection**, v.66, n. 4, p. 535-541. 2003.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 133-143, 2005.

O`BRIEN, A. D; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 206–220, 1987.

ORLANDI, P. P; SILVA, T; MAGALHÃES, G. F; ALVES, F; CUNHA, R. P. A ; DURLACHER, R. R; PEREIRA DA SILVA, L. H. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n. 5, p. 621-625, 2001.

PAIVA, F. B; MAFFILI, V. V; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório**. Fundação Oswaldo Cruz. Salvador, BA, 2005.

PARK, H; VALENCIA-GALLARDO, C; SHARFF, A; TRAN VAN NHIEU, G; IZARD, T. Novel vinculin binding site of the IpaA invasin of *Shigella*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 26, p. 23214-23221, 2011.

PERDOMO, O.J.J; CAVAILLON, J. M; HUERRE, M; OHAYON, H; GOUNON, P; SANSONETTI, P. J. Acute inflammation causes epithelial invasion and mucosal destruction in experimental shigellosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1307–1319, 1994.

PHALIPON, A; SANSONETTI, PJ. Shigella's ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 119-129, 2007.

PICKERING, L. K. Gastroenteritis due to enteropathogenic, enterotoxigenic, and invasive Escherichia coli: A review. **American Journal of Medical Technology**, v. 45, n. 9, p. 787-92, 1979.

PRELICH, G. Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation. **Genetics**, v. 190, n. 3, 841-854, 2012.

PROSEDA, G; FALCONI, M; GIANGROSSI, M; GUALERZI, C. O; MICHELI, G; COLONNA, B. The virF promoter in Shigella: more than just a curved DNA stretch. *Molecular Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 523-37, 2004.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2009. Disponível em: <http://cran.r-project.org>.

RAM, P. K; CRUMP, J. A; GUPTA, S. K; MILLER, M. A; MINTZ, E. D. Part II. Analysis of data gaps pertaining to Shigella infections in low and medium human development index countries, 1984-2005. **Epidemiology and Infection**, V. 136, n. 5, p. 577-603, 2008.

RAQIB, R; WRETLIND, B; ANDERSSON, J; LINDBERG, A. A. Cytokine secretion in acute shigellosis is correlated to disease-activity and directed more to stool than to plasma. **Journal of Infectious Disease**, v. 171, n. 2, p. 376–384, 1995.

RAQIB, R; GUSTAFSSON, A; ANDERSSON, J; BAKHIET, M. A systemic downregulation of gamma interferon production is associated with acute shigellosis. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5338-5341, 1997.

RIYAZ-UL-HASSAN, S; SYED, S; JOHRI, S; VERMA, V; QAZI, G. N. Application of a multiplex PCR assay for the detection of *Shigella*, *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Esch. coli* in milk. **Journal of Dairy Research**. v. 76, n. 2, p. 188-194, 2009.

ROMAGNANI, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease **International Journal of Clinical and Laboratory Research**, v. 21, n. 2, p. 152-8, 1991.

ROSSI, D. L; HURST, S. D; XU, Y; WANG, W; MENON, S; COFFMAN, R. L; ZLOTNIK, A. Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells. **Journal of Immunology**, v. 162, n. 9, p. 5490-7, 1999.

SAVAGE, R. S; GHAHRAMANI, Z; GRIFFIN, J. E; DE LA CRUZ, B. J; WILD, D. L. Discovering transcriptional modules by Bayesian data integration. **Bioinformatics**, v. 26, n. 12, p. i158–i167. 2010.

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. 2752-64, 1996.

SANSONETTI, P. J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. **FEM Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p.3-14, 2001.

SANSONETTI, P. J. Shigellosis: An Old Disease in New Clothes?. **PLOS Medicine**, V. 3, n. 9, e:354, 2006.

SCHMITZ, J. M; MCCRACKEN, V. J; DIMMITT, R. A; LORENZ, R. G. Expression of CXCL15 (Lungkine) in Murine Gastrointestinal, Urogenital, and Endocrine Organs. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 55, n. 5, p. 515–524, 2007.

SCHNITTGEN, T. D; ZAKRAJSEK, B, A. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 46, n. 1-2, p. 69-81, 2000.

SCHNUPF, P; SANSONETTI, P. J Quantitative RT-PCR profiling of the Rabbit Immune Response: Assessment of Acute *Shigella flexneri* Infection. **PLOS ONE**, v. 7, n. 6, p. e36446, 2012.

SCHORLING, J; WANKE, C. A; SCHORLING, S. K; MCAULIFFE, J. F; DE SOUZA, M. A; GUERRANT, R. L. A prospective study of persistent diarrhea among children in an urban Brazilian slum. **American Journal of Epidemiology**, v. 132, n. 1, p. 144-56, 1990.

SCHROEDER, G. N; HILBI, H. Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 134-156, 2008.

SELLGE, G; MAGALHAES, J. G; KONRADT, C; FRITZ, J. H; SALGADO-PABON, W; EBERL, G; BANDEIRA, A; DI SANTO, J. P; SANSONETTI, P. J, PHALIPON, A. Th17 cells are the dominant T cell subtype primed by *Shigella flexneri* mediating protective immunity. **Journal of immunology** , v.184, n. 4, p. 2076–2085, 2010.

SHIM, D. H; SUZUKI, T; CHANG, S. Y; PARK, S. M; SANSONETTI, P. J; SASAKAWA, C; KWEON, M. N. New animal model of shigellosis in the Guinea pig: its usefulness for protective efficacy studies. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2476-82, 2007.

SIDRIM, J. J. C; MOREIRA, J. L. B; PAIXÃO, G. C; LIMA, S. B; FILHO, R. E. M; ROCHA, M. F. G; LIMA, A. A. M. Multirresistência a antimicrobianos mediada por plasmídios R em cepas de *Shigella flexneri* isoladas no nordeste do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 263-270, 1998.

SILVA, T; NOGUEIRA, P. A; MAGALHÃES, G. F; GRAVA, A. F; SILVA, L. H. P; ORLANDI, P. P. Characterization of *Shigella* spp. by antimicrobial resistance and PCR detection of *ipa* genes in an infantile population from Porto Velho (Western Amazon region), Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 731-733, 2008.

SINHA, K; BAGCHI, A. K. Role of anti-CD3 in modulation of Th1-type immune response in *Shigella dysenteriae* infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, n. 11, p. 1075–1081, 2004.

SPERANDIO, B; REGNAULT, B; GUO, J; ZHANG, Z; STANLEY, JR. S. L; SANSONETTI, P. J; PÉDRON, T. Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 5, p. 1121-1132, 2008.

STETSON, D. B; MEDZHITOV, R. Type I Interferons in Host Defense. ***Immunity***, v. 25, n. 3, p. 373-381, 2006.

SPURGEON, S. L; JONES, R. C; RAMAKRISHNAN, R. HIGH throughput gene expression measurement with real time PCR in a microfluidic dynamic array. ***PLoS One***. v. 3, n. 2, p. 1-7, 2008.

SUZUKI, T; SASAKAWA, C. Molecular Basis of the Intracellular Spreading of *Shigella*. ***Infection and Immunity***, v. 69, n.10, p. 5959-5966, 2001.

TANIYA, T; MITOBE, J; NAKAYAMA, S; MINGSHAN, Q; OKUDA, K; WATANABE, H. Determination of the InvE binding site required for expression of IpaB of the *Shigella sonnei* virulence plasmid: involvement of a ParB boxA-like sequence. ***Journal of Bacteriology***, v. 185, n.17, p.5158-65, 2003.

THOMAS, K. E, GALLIGAN, C.L; NEWMAN, R. D; FISH, E. N; VOGEL, S. N. Contribution of interferon-beta to the murine macrophage response to the toll-like receptor 4 agonist, lipopolysaccharide. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 281, n. 41, p. 31119-311130, 2006.

VAN DE VERG, L; MALLETT, C. P; COLLINS, H. H; LARSEN, T; HAMMACK, C; HALE, T. Antibody and Cytokine Responses in a Mouse Pulmonary Model of *Shigella flexneri* Serotype 2a Infection. ***Infection and Immunity***, v. 63, n. 5 , p.1947-1954, 1995.

VAN NHIEU, G. T; ISBERG, R. R. The *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein and human fibronectin bind to mutually exclusive sites on the alpha 5 beta 1 integrin receptor. ***Journal of Biological Chemistry***, v. 266, n. 36, p. 24367-75, 1991.

VARGAS, M; GASCON, J; DE ANTA, J. M. T; VILA, J. Prevalence of *Shigella* Enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* Strains Isolated from Patients with Traveler's Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n. 11, p. 3608-3611, 1999.

VENKATESAN, M. M; BUYASSE, J. M; KOPECKO, D. J. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 23, p. 9317-21, 1988.

WANG, J; LIN, ; CRENSHAW, A; HUTCHINSON, A; HICKS, B; YEAGER, M; BERNDT, S; HUANG, W-Y; HAYES, R. B; CHANOCK, S, J; JONES, R. C; RAMAKRISHNAN, R. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. **BMC Genomics**, v. 28, n. 10, p. 1-13, 2009.

WASSEF, J. S; KEREN, D. F; MAILLOUX, J. L. Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 3, p. 858-863, 1989.

WAY, S. S; BORCZUK, A. C; DOMINITZ, R; GOLDBERG, M. B. An essential role for gamma interferon in innate resistance to *Shigella flexneri* infection. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1342–1348, 1998.

WEAVER, C. T; HATTON, R. D; MANGAN, P. R; HARRINGTON, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 821–852, 2007.

WEINBERG, JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. **Molecular Medicine**, v. 4, n. 9, p. 557-591, 1998.

WEINRAUCH, Y; DRUJAN, D; SHAPIRO, S. D; WEISS, J; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. **Nature**, v. 417, n.6884, p. 91–94, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Guidelines for the Control of Shigellosis, including Epidemics due to *Shigella dysenteriae* 1**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2005.

YANG, J; CHEN, L; YU, J; SUN, L; JIN, Q. ShiBASE: an integrated database for comparative genomics of *Shigella*. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Database Issue, p. D398–D401, 2006.

ZHANG, J; JIN, L; CHAMPION, G; SEYDEL, K. B; STANLEY, S. L. Shigella infection in a SCID mouse–human intestinal xenograft model: role for neutrophils in containing bacterial dissemination in human intestine. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 3240–3247, 2001.

ZHAO, L; LIU, L; LENG, W; WEI, C; JIN, Q. A proteogenomic analysis of *Shigella flexneri* using 2D LC-MALDI TOF/TOF. **BMC Genomics**, v. 12, n. 528, p. 528, 2011.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 104/2012-CEEA/UFAM, intitulado como "Análise investigativa dos fatores de virulência de Cepas selvagens de *Shingella sp. In vivo* e seu potencial inflamatório" sob responsabilidade e orientação de **Dra. Patrícia Puccinelli Oriandi**, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em Reunião ocorrida em 11/01/2013.

Manaus, 26 de junho de 2013.

Profa. Dra. Cinthya Jamille Fritzh Brancão de Oliveira
Diretora em exercício do Biotério Central da UFAM
Portaria 1561/2013- Gabinete da Reitoria, de 30 de abril de 2013

ANEXO 02



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

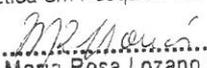


PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com o número 266/2006, intitulado: **“Caracterização fenotípica e genotípica dos enteropatógenos isolados de crianças de 0-10 anos de idade, com diarreia aguda e de repetição na região de Manaus-Amazonas”**. Tendo como Pesquisadora Responsável Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 15 de março de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


.....
Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora

Protocolo para desenho de oligos a partir de sequências bacterianas

Duas características dos RNA mensageiros bacterianos que são importantes de serem ressaltados no desenho de experimentos de análise de expressão gênica é o fato de não possuírem introns e nem cauda Poly-A, diferente de transcritos de genes eucariotos.

O fato de não possuírem introns confere uma dificuldade nos experimentos para análise de expressão gênica uma vez que o produto amplificado a partir do RNA mensageiro (cDNA) é do mesmo tamanho daquele amplificado a partir do DNA genômico. Caso tenha contaminação do RNA com DNA genômico, não tem como ter garantia de que estará amplificando apenas o RNA.

Por não apresentarem cauda Poly-A, a etapa de transcrição reversa do RNA em DNA complementar (cDNA) exige a utilização de Random Primers, ao invés de Oligo dT (poly T) normalmente utilizado para eucariotos. O uso de iniciadores de oligo dT é uma forma de evitar que DNA genômico seja transcrito.

Portanto, por essas duas características, torna-se imprescindível o tratamento do RNA com DNase, para eliminar qualquer traço de contaminação por DNA genômico. Para isso, recomendamos o uso do Kit DNA free Turbo da Ambion por esse não exigir nova purificação do RNA após o tratamento.

1) Obtenção das sequências do tipo Refseq dos genes de interesse

É importante dar preferência - sempre que possível - para o uso de sequências do tipo Refseq dos determinados genes. Os Refseqs são sequências anotadas e 'curadas' - ou seja - extensamente verificadas nos bancos de dados de sequências nucleotídicas.

Recomendo a obtenção das sequências dos genes de Shigella a partir do link colado abaixo.

http://microbes.ucsc.edu/lists/shigFlex_2A/refSeq-list.html

Na lista, os genes anotados e conhecidos são representados por um código começando com as letras SF e terminando em um número de 4 dígitos... por exemplo: SF0033: carnitinyI-CoA dehydratase.

Segue as etapas na página a seguir para obter as sequências dos genes de interesse.

1) Ao clicar no código do gene de interesse, o gene aparece no navegador da direita...

2) A linha colorida abaixo do título “genbank RefSeq Gene Annotations” é um link clicável que leva até a página de informações a respeito desse gene

3) O link “predicted mRNA” sequence leva até a sequência desejada.

Essa deve ser copiada e colada num arquivo .doc ou .txt

```

>SF0033
ATGAACGCTCAGGGAACCTCCCTGCCAGCTAATAATCAGCCCTAAAAACA
ATATGCATTTTTGTCAGGATGTTGTCCTCCCTAAAAAAGCAAAAATGGA
GAAAGGAATGAGTGAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATCAATG
GAAATTAACCTTATGTCGCCAAGCCAAATGCTTTGATGCAAAAACCCAG
CTTTGAAATGGCCGAAATATTTCTAAATTTCCCTGACGATCCCGAATAC
GTGTCGCCATTTATCCCGTCCCGGAGAGAAATCTTTCCCGGGGTGG
GATTTAAAGCGGCAGCAGAGCGGAGCAGCCGATGCTGACTTTGGCCC
GGTGGTTTTCGGGATTAACGAAATTTCAATCTCGCAAAACAGTTA
TCGCAGCTGTGAACGGCTACGCCTTGGCGCGGTTTCCGAACTGGCGCTG
CGCCAGATTTTATTTGTCGGGATAACCCAGCTTCCGCTGCCGGA
AGCCAACTGGGCATCGTCTCAGACGGCGGCTGCTGCTGCTGCCGA
AGATCTCCCGCCCTACCATCGTCAATGAAATGGTGATGACCCGAGACGA
ATGGCGCGGAGAGGCGCTGCTGTTGGGGATAGTCAACCCGCTGTTAG
CCGCGCGAATGATGATAACCCCGCACTGGCTGAGCACTGGTTA
ACAGCCCGCCGTTGGCATTCCGGCTCAAGAGATCTACCCGACACC
AGCGAATCCCGGTAGAAAGCGTATCCGCTATTTCCGCGCGGCTGTT
GAAACACTATCCATCGGTTCTGATTCGGAAGATGCCATTAAGAGCCGCT
TGGCGTTCCGCGAAGCCGATCCCGTGTGGAAGGACGTTAA
  
```

2) Desenho do Primer pelo software Primer 3

O Software Primer 3 é livre e de acesso via web pelo endereço <http://frodo.wi.mit.edu/>

A maioria dos parâmetros são mantidos nos padrões (defaults) recomendados pelo site. Vou listar abaixo apenas os parâmetros que alteramos para conferir características desejáveis aos primers. É importante ressaltar, que neste site, todos os links azuis levam para um tutorial com instruções cada parâmetro.

1) Colar a sequência alvo na janela...

2) Modificar a faixa de tamanho do produto para 90 - 150 pares de bases (Mais recomendado para PCR em tempo real)

3) Modificar o parâmetro Max 3' Stability. Esse parâmetro determina o número de bases C ou G que será permitido entre as últimas 5 bases dos primers. É desejável que a região 3' do primer seja menos 'estável' do que a região 5', ou seja, que contenha mais A e T do que C e G. Um primer muito estável na região 3' (por exemplo CGCGC), ao se anelar a uma região errônea do DNA, pode ser mantida e a extensão do produto pela DNA polimerase pode ser iniciada numa região que não aquela desejada. Um valor de 9 permite que aproximadamente metade das últimas 5 bases sejam compostas de C ou G. Recomendo iniciar com um valor de 7 para permitir que apenas 1 C ou G seja colocado nesta região. Caso nenhum primer seja encontrado na sequência, pode subir novamente esse parâmetro abrindo mão dessa característica.

4) Modificar os parâmetros Max Self Complementarity (MSC), Max 3' Self Complementarity (M3SC) e Max Poly-X. Os primeiros dois parâmetros citados influenciam na capacidade dos primers formarem todas as formas de dímeros e grampos. Recomendo iniciar com MSC = 5, e M3SC = 2. Em relação ao Max Poly-X, é recomendável que não tenha mais do que 3 da mesma base repetida em sequência.

General Primer Picking Conditions

[Primer Size](#) Min: 18 Opt: 20 Max: 27
[Primer Tm](#) Min: 57.0 Opt: 60.0 Max: 63.0 [Max Tm Difference:](#) 100.0 [Table of thermodynamic parameters:](#) Breslauer et al. 1986
[Product Tm](#) Min: Opt: Max:
[Primer GC%](#) Min: 20.0 Opt: Max: 80.0
[Max Self Complementarity:](#) 8.00 [Max 3' Self Complementarity:](#) 3.00
[Max #N's:](#) 0 [Max Poly-X:](#) 5
[Inside Target Penalty:](#) [Outside Target Penalty:](#) 0 [Note: you can set Inside Target Penalty to allow primers inside a target.](#)
[First Base Index:](#) 1 [CG Clamp:](#) 0
[Concentration of monovalent cations:](#) 50.0 [Salt correction formula:](#) Schildkraut and Lifson 1965
[Concentration of divalent cations:](#) 0.0 [Concentration of dNTPs:](#) 0.0
[Annealing Oligo Concentration:](#) 50.0 (Not the concentration of oligos in the reaction mix but of those annealing to template.)
 [Liberal Base](#) [Show Debuging Info](#) [Do not treat ambiguity codes in libraries as consensus](#) [Lowercase masking](#)

5) Depois de selecionar esses parâmetros. Clique em "Pick Primers".

6) Os primers selecionados aparecerão na próxima página como abaixo. Copie para seu arquivo .doc ou txt.

Primer3 Output

```

No mispriming library specified
Using 1-based sequence positions
OLIGO      start  len  tm  gc%  any  3'  seq
LEFT PRIMER  598    20   60.25  50.00  3.00  2.00  CCGACCAAGAGATTGCTGAT
RIGHT PRIMER  697    20   60.02  50.00  4.00  2.00  AGCAGACCATGATGCACTG
SEQUENCE SIZE: 3222
INCLUDED REGION SIZE: 3222

PRODUCT SIZE: 100, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

1  ATGCCAAAACGTACAGATATAAAAAGTATCCTGATTCGGGTCCGGCCCGATTGTATC

61  GGTACAGCGCTGTGAGTTTGACTACTCTGGCCGCAAGCATGTAAAGCCCTCCGCGAAGAG

121  GGTACCAGCGCTATTCTGGTGAACCTCAACCCGGCGACCATCATGACCGACCCGGAATG

181  CCGATGCGACCTACATCGAGCCGATTCACCTGGGAAGTGGTACCCAAAGATTATTGAAAAA

241  GAGCCCGCCGACCGCGTCTGCCAACCATGGCGGCTCAGACCGCGCTGAACTCGCGCTG

301  GAGCTGGAACGTACAGGCGGTGTGGAAGAGTTCGGTGTACCATGATTGGTGCACCTGCC

```

7) Caso nenhum primer tenha sido encontrado, altere os parâmetros mencionados sem passar dos valores default até conseguir primers adequados.

No Acceptable Primers Were Found

The statistics below should indicate why no acceptable primers were found. Try relaxing various parameters, including the self-complementarity parameters and max and min oligo melting temperatures. For example, for very A-T-rich regions you might have to increase maximum primer size or decrease minimum melting temperature.

```

Statistics
con  too  in  in  no  tm  tm  high  high  high
sid  many  tar  excl  bad  GC  too  too  any  3'  poly  end
ered  Ns  get  reg  GC%  clamp  low  high  compl  compl  X  stab  ok
Left  2690  0  0  0  0  0  1627  39  0  0  0  0  0
Right  2690  0  0  0  0  0  1627  36  0  0  0  0  1027
Pair Stats:
considered 13209, unacceptable product size 13209, ok 0
primer3 release 1.1.4

```

3) Verificar as sequências no Primer Blast do NCBI

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

Esse site, como o Primer 3 também faz desenho de primer. Entretanto, nós usamos para outra finalidade. Usamos como uma especie de PCR virtual. Para isso, basta preencher os campos dos primer com os primers desenhados pelo Primer 3 e mudar o campo 'Organismo' para Shigella. Além disso, precisa alterar o campo "database" para 'nr'. Por fim clicar em "Ger Primers".

The screenshot shows the NCBI Primer-Blast interface with the following sections and values:

- Primer Parameters:**
 - Use my own forward primer (5'->3' on plus strand): Clear
 - Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand): Clear
 - PCR product size: Min 70, Max 1000
 - # of primers to return: 5
 - Primer melting temperatures (T_m): Min 57.0, Opt 60.0, Max 63.0, Max T_m difference 3
- Exon/intron selection:**
 - Exon junction span: No preference
 - Exon junction match: Exon at 5' side 7, Exon at 3' side 4
 - Intron inclusion: Primer must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA
 - Intron length range: Min 1000, Max 1000000
- Primer Pair Specificity Checking Parameters:**
 - Specificity check: Enable search for primer pairs specific to the intended PCR template
 - Organism: Enter an organism name, taxonomy id or select from the suggestion list as you type. [Add more organisms](#)
 - Database:

Note: Parameter values that differ from the default are high

Como resultado, espera-se que a primeira entrada seja o gene de interesse e que o anelamento seja perfeito.

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCGACCAAAGAGTTGCTGAT	20	52.42	50.00	3.00	2.00
Reverse primer	AGCAGACGATGATGCAGTTG	20	52.93	50.00	4.00	2.00

Products on target templates
 >AE005674.2 Shigella flexneri 2a str. 301, complete genome

product length = 100
 Features associated with this product:
carbamoyl-phosphate synthase large subunit

Forward primer 1 CCGACCAAAGAGTTGCTGAT 20
 Template 30844 30863

Reverse primer 1 AGCAGACGATGATGCAGTTG 20
 Template 30943 30924

product length = 4271
 Features associated with this product:
putative transcriptional regulator
sigmaD(70) factor of RNA polymerase-like protein

Reverse primer 1 AGCAGACGATGATGCAGTTG 20
 Template 2842802T.A..CA..... 2842783

Reverse primer 1 AGCAGACGATGATGCAGTTG 20
 Template 2838532 ..G..CT.T.T..... 2838551

product length = 4354
 Features associated with this product:

Já todas as outras saídas devem apresentar problemas de anelamento, ou tamanho de produto não apropriado ou anelamento de apenas um dos dois primers.

SHIGELLOSE: UMA REVISÃO SOBRE A UTILIZAÇÃO DA CEPA *Shigella flexneri* 5a – M90T – COMO PADRÃO DE INVASÃO E EM ESTUDOS IMUNOLÓGICOS

Paula Taquita Serra¹, Luis André Morais Mariúba², Patrícia Puccinelli Orlandi²

1- Parte da dissertação de Mestrado no Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.

2- Pesquisador(a) do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Amazônia, Rua Teresina, 476, Adrianópolis, Manaus, Amazonas, Brasil.

E-mail: paulatakita@hotmail.com

Resumo

A Shigellose é uma doença entérica causada pelo gênero *Shigella* spp., uma bactéria gram-negativa que invade as células do epitélio intestinal. Muitos estudos relacionados ao seu potencial invasivo são realizados com o padrão de *Shigella flexneri* 5a, a M90T. Esta revisão visa identificar quais os motivos que levaram a utilização desta cepa como padrão e suas principais descobertas. Além disso, verificamos a realização de estudos de caracterização genética e imunológica visando o conhecimento sobre o comportamento de Cepas Clínicas (Selvagens) isoladas de casos de Shigellose, em comparação com os padrões de infecção bem caracterizados como a M90T. Acreditamos que tais estudos poderiam auxiliar no entendimento imunológico da *Shigella* para propósitos vacinais.

Palavras-Chave: Invasão por *Shigella*, M90T, Genes de Invasão, Resposta Imune, Cepas Clínicas (Selvagens).

Abstract

Shigellosis is an enteric disease caused by *Shigella* spp. genus, a gram-negative bacterium which invades gut epithelial cells. Many invasiveness studies are performed with the strain *Shigella flexneri* 5a – M90T- as standard. This review aims to identify the reasons that lead this strain utilization as invasive standard and its main findings. Moreover, we verified the realization of genetic and immunological characterization studies aiming the knowledge about Clinical Strains (Wild) from Shigellosis cases behavior, and its comparison to well-characterized strains like M90T. We believe this kind of studies could improve immunological understanding of *Shigella* infection to vaccine purposes.

Key-words: *Shigella* Invasion, M90T, Clinical Strains (Wild).

1. Introdução

A Shigellose ou Disenteria Bacilar é uma doença entérica causada pelo patógeno *Shigella* spp. Seu mecanismo de ação é tipicamente invasor, com a ruptura do epitélio superficial do intestino, causando dores abdominais e uma severa diarreia mucosanguinolenta. Sua maior área de ocorrência são em locais onde a rota fecal/oral é efetiva,

atingindo principalmente crianças menores que 5 anos.

Atualmente, mais de 100 anos após sua descoberta, muitos de seus mecanismos de invasão e subversão da resposta imune já foram descritos. Ainda assim, estudos adicionais ainda são necessários para desvendar informações desconhecidas principalmente sobre o modo de ação *in vivo*, necessário para obtenção de vacinas.

Nesta revisão, abordamos os principais estudos relacionados à patogenicidade, ensaios *in vivo* e desenvolvimento de vacinas que utilizam a cepa de *Shigella flexneri* subtipo 5a -M90T - como padrão. O objetivo principal foi comparar estes estudos com os que utilizam cepas clínicas (selvagens), verificando abordagens e relevâncias.

2. Metodologia

Os artigos foram consultados no sítio de busca *PubMed* disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> com as seguintes palavras chave: *Shigella* M90T (55 artigos, acesso em 16 de julho de 2013); *Shigella* M90T and Animal Models (3 artigos, acesso em 16 de julho de 2013); *Shigella* M90T and Immunity (9 artigos, acesso em 16 de julho de 2013); *Shigella* M90T and Vaccine (11 artigos, acesso em 16 de julho de 2013); *Shigella* M90T and Clinical *Shigella* (Sem resultados, acesso em 16 de julho de 2013); *Shigella* M90T and Wild *Shigella* (20 artigos, acesso em 16 de julho de 2013); Wild *Shigella* and Animal Models (4 artigos, acesso em 16 de julho de 2013); Wild *Shigella* and Immunity (35 artigos, acesso em 16 de julho de 2013); Wild *Shigella* and Vaccine (35 artigos, acesso em 16 de julho de 2013). Destes, foram selecionados aqueles que abordavam a utilização da cepa *Shigella flexneri* 5a – M90T – como padrão de infecção por *Shigella* e a comparação com Cepas Clínicas (Selvagens).

3. *Shigella* spp. : Histórico e Aspectos Gerais

Em virtude dos vários episódios graves de disenteria no Japão em 1897, um jovem médico do Instituto de Doenças Infecciosas do Japão dedicou seus esforços para encontrar a causa desta doença. Em 1898, Dr. Kiyoshi Shiga realizou um estudo com 36 pacientes onde percebeu a presença de um simples bacilo em comum com todos os casos e confirmou sua descoberta utilizando as premissas do Postulado de Koch. Primeiramente a bactéria descoberta foi nomeada *Bacillus dysenteriae*, pois se acreditava ter relação com o *Bacillus coli* (Hoje, *Escherichia coli*). O nome *Shigella*, em

homenagem ao seu descobridor, só foi oficializado na edição de 1930 do *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Dr. Shiga dedicou os esforços de uma vida para desvendar os segredos de sua descoberta, foi o primeiro a identificar a presença de toxinas – *Shiga Toxinas* – e realizar as primeiras tentativas de imunização. Sua intenção era se aposentar com a cura para a disenteria bacilar. Infelizmente, Dr. Shiga faleceu aos 85 anos (1957) sem a descoberta de uma cura e a *Shigella* permanece como um problema de saúde pública até os dias de hoje com 80 a 160 milhões de casos por ano (PUPO et al., 2006; WHO, 2005; TROFA et al., 1999; KEUSCH, 1998).

Após a descoberta da *Shigella dysenteriae* (1898), outras espécies de *Shigella* foram identificadas: *Shigella flexneri* (por Simon Flexner em 1900); *Shigella boydii* (Mark Boyd em 1915); e *Shigella sonnei* (Carl Sonne entre 1928-1938). Estas espécies foram classificadas como grupos A, B, C e D por ordem de descoberta, possuindo 15, 8, 18 e 1 subtipos, respectivamente, com base nas diferenças nos antígenos de superfície O (PHALIPON e SANSONETTI, 2007; BERGAN, 1979).

A *Shigella* é um patógeno intracelular que atinge principalmente crianças de 0 a 5 anos (KOTLOFF et al., 1999). Apesar de ser associada a países em desenvolvimento devido a rota de transmissão fecal-oral ser elevada em locais com falta de saneamento básico, surtos de Shigellose também são descritos em países desenvolvidos, como em creches na Inglaterra (MAGUIRE et al., 1998), hortaliças como alface e salsa (Europa e Estados Unidos) (NAIMI et al., 2003; KAPPERUD et al., 1995) e contato com água contaminada em Oregon, Estados Unidos (KENEE et al., 1994).

O gênero *Shigella flexneri* é o mais comumente encontrado em países em desenvolvimento, com os sorotipos 1b, 2a, 3a, 4a e 6. Nos países desenvolvidos, são encontrados *Shigella flexneri* 2a e *Shigella sonnei* (KOTLOFF, 1999). *Shigella boydii* possui seus casos limitados à Índia e a *Shigella dysenteriae*, a razão do descobrimento do gênero, é considerado raro

e permanece ausente nos estudos atuais (SANSONETTI, 2006).

4. *Shigella flexneri* subtipo 5a - M90T e a Caracterização do Plasmídeo de Invasão

Um dos primeiros estudos utilizando o subtipo 5a da *Shigella flexneri* M90T foi sobre a determinação da presença de um plasmídeo de invasão através da habilidade de cepas de *Shigella flexneri* de invadir células HeLa e induzir ceratoconjuntivite em Porquinho-da-Índia pelo Teste de Séreny (SÉRENY, 1955). A transmissão do plasmídeo pWR110 da cepa M90T para cepas que perderam a virulência, regenerou a estas amostras seu fenótipo invasivo. Este foi o primeiro estudo a sugerir que o potencial de invasão da *Shigella* possuía uma fonte plasmidial (SANSONETTI et al., 1982).

Para confirmar estes resultados, em 1983 estudos posteriores foram realizados transferindo o plasmídeo pWR110 da *Shigella* M90T para uma *Escherichia coli* não invasiva (K12), conferindo a esta cepa a habilidade de invadir células HeLa confirmando que só a presença do plasmídeo já era suficiente para proporcionar a invasão (SANSONETTI et al., 1983).

Recentemente seu genoma completo foi sequenciado com o objetivo de comparar as cepas de *Shigella flexneri* subtipo 5a (M90T) e 5b (cepa 8401) concluindo que a M90T possui 99,9% do genoma da *Shigella flexneri* e algumas proteínas hipotéticas ausentes nesta comparação. Os autores também concluíram que conhecimento obtido com este estudo são essenciais para a manipulação genética necessária a estudos mais específicos de sua patogenicidade (ONODERA et al., 2012).

Apesar da recente informação sobre a sequencia gênica completa, esta primeira associação com plasmídeo de invasão (SANSONETTI et al., 1982; 1983) determinou a *Shigella* M90T como um bom padrão para estudos sobre os mecanismos de invasão e como isso afetaria o hospedeiro. Deste então, numerosos estudos têm sido realizados para desvendar detalhes de sua patogenicidade.

Em 1987, três estudos revelaram alguns pontos chaves para a invasão: No primeiro foi

utilizado o soro de macacos convalescentes de infecção por *Shigella* e identificado através de *immunoblotting* e eletroforese em gel 2D pelo menos 4 proteínas importantes para a invasão, nomeadas neste estudo como A, B, C e D, todas codificadas pelo mesmo *operon* (BAUDRY et al., 1987); O segundo analisou estas proteínas presentes no nomeado plasmídeo de invasão (*ipa*) em soro de coelho identificando *ipaB* (57 kDa), *ipaC* (43 kDa) e *ipaD* (43 kDa) pertencentes ao *operon ipaBCD*, como as principais responsáveis pelo fenótipo invasivo. A proteína *ipaH* também demonstrou um papel na invasão, porém sendo codificado por uma região diferente de *ipaBCD* (BUYSSSE et al., 1987).

O terceiro estudo utilizou imunofluorescência em células HeLa após a invasão da *Shigella* M90T detectando altos níveis de actina e pequenas microestruturas no momento da penetração bacteriana na célula epitelial. Estes resultados sugeriram que a entrada ocorre de uma forma parecida com a fagocitose com a formação de profusões ao redor da bactéria e que a aquisição de motilidade das cepas de *Shigella* depende da produção de actina (CLERC e SANSONETTI, 1987).

Identificados o plasmídeo de invasão e as principais proteínas relacionadas, estudos posteriores foram realizados com a finalidade de pesquisar quais outros genes eram modulados nesta fase. Em 1986 foi identificado em *Shigella flexneri* 2a o *virG* como essencial a infecção de células adjacentes (MAKINO et al., 1986); Em 1989 foi relacionado o *locus icsA* com a polimerização da F-actina necessária a motilidade inter e intracelular (BERNADINI et al., 1989); Em 1990 foi identificada a presença do *ipaA* e *ipaR* no plasmídeo de invasão (BUYSSSE et al., 1990); Em 1992 foi relatado que todos estes genes estão associados com o *locus spa* (VERKATESAN et al., 1992); Em 1993 foi identificada em *Shigella flexneri* 2a a associação com o *locus MixA* (SASAKAWA et al., 1993). Os *locus Mix* e *spa* são responsáveis pela codificação dos genes do Sistema de Secreção Tipo III (T3SS), hoje conhecidos como os genes

necessários para a invasão da *Shigella* no epitélio do hospedeiro.

No panorama atual é conhecido que a entrada e disseminação lateral em uma infecção por *Shigella* são eventos regulados por proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS) que por sua vez são codificados por genes plasmidiais. *IpaC* polimeriza actina; *ipgD* dissocia a membrana de plasma do esqueleto de actina; *virA* desestabiliza os microtubulos e *ipaA* formam um complexo com vinculina, despolimerizando a actina. Eles são contato dependentes, ativados após o contato com a célula alvo levando a formação de profusões ao redor da bactéria que são lisados por *ipaB* e *ipaC*. Após a invasão nas células epiteliais, a *Shigella* induz uma reorganização do citoesqueleto e provoca a formação de um vacúolo que facilita a entrada e o crescimento intracelular de *Shigella*. O escape para o citoplasma é seguido de um processo de motilidade dependente de actina que leva a bactéria a passar para as células adjacentes. Na presença de macrófagos, várias proteínas são injetadas no citoplasma da célula hospedeira, neste caso, *ipaB* é responsável pelo processo apoptótico da célula infectada (SANSONETTI, 2001).

5. Modelos Animais para Estudos com *Shigella*

Apesar da boa caracterização do comportamento da *Shigella* M90T em células HeLa, para estudos *in vivo*, eram necessários a adoção de modelos animais.

O primeiro modelo animal utilizado para verificação de viabilidade de vacinas atenuadas foi a administração oral em macacos por serem os únicos modelos que mimetizam a infecção igual ao ocorrido em humanos, com a exceção que eles necessitam de uma dose maior de inóculo para provocar a doença (FORMAL et al., 1984).

O modelo de infecção pulmonar foi descrito pela primeira vez em estudos envolvendo a *Shigella flexneri* 2a (VAN DE VERG et al., 1995). A invasão da bactéria ao epitélio bronquial e alveolar levou ao desenvolvimento de uma brônquio-pneumonia aguda que mimetizou o ocorrido na infecção por *Shigella*, com a modulação da

imunidade inata e adaptativa e expressão de várias citocinas importantes para o entendimento da proteção vacinal.

Em 1996 foi descrito a utilização da ligação de intestino de coelho para a verificação da modulação de resposta imune. Este novo modelo animal posto foi uma abordagem diferente de sua antiga utilização, a determinação do fenótipo invasivo apenas pela presença de secreção. Os Folículos Associados ao Epitélio (FAE) que recobrem as Placas de Peyer representam uma porta de entrada para microrganismos invasivos. Este é um bom modelo para observação de alterações morfológicas e migração celular para o local da infecção (SANSONETTI et al., 1996).

Devido à inabilidade de desenvolvimento de infecção intestinal em camundongos adultos, Fernandez e colaboradores (2003) propuseram a inoculação oral em camundongos recém-nascidos com quatro dias de vida. Como resultados eles obtiveram lesões intestinais e produção de citocinas similares à inflamação observadas em pacientes com Shigellose, sua utilização é destinada para estudos que visam estudar os efeitos da infecção em intestinos imaturos.

Shim e colaboradores (2007) propuseram um modelo de inoculação retal em Porquinho-da-Índia nos quais uma severa reto-colite é desenvolvida com a modulação de várias citocinas similares a infecção da *Shigella*. Quando vacinados com uma vacina viva atenuada de *S. flexneri* 2a SC602, as cobaias demonstraram uma diminuição dos sintomas, caracterizando este modelo como uma opção para o teste de vacinas.

Todos estes modelos experimentais foram desenhados devido à necessidade de esclarecimento do comportamento das cepas de *Shigella* em organismos vivos, principalmente as cepas mutantes, com a intenção de avaliar candidatos para vacinas. Hoje, os macacos participam das últimas fases de caracterização, devido ao comportamento similar ao ocorrido em humanos infectados (SHIPLEY et al., 2010).

6. Estudos Imunológicos Utilizando a *Shigella* M90T

Os estudos imunológicos são principalmente aqueles envolvendo a utilização de cepas de *Shigella* com deleção de algum gene alvo com finalidades de elucidação de rotas metabólicas e imunológicas ou visando o desenvolvimento de vacinas.

Após a entrada da *Shigella* na célula região basal do epitélio hospedeiro através das células M, a bactéria é fagocitada por macrófagos ativando a sinalização celular. (MANTIS et al., 1996). A habilidade de escapar dos macrófagos é dependente da secreção das proteínas do Sistema de Secreção Tipo III (T3SS), principalmente o *ipaB* e *ipaC* (BARZU et al., 1997; ZYCHLINSKY et al., 1994), deixando a *Shigella* livre para invadir a região basal e susceptível das células epiteliais.

A invasão por *Shigella* regula várias citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , TNF- β , IL-1 β e IL-18 (RAQUIB et al., 1995), responsáveis pela indução de uma resposta imune. Estes sinais liberados por macrófagos e lise de células epiteliais levam ao recrutamento de neutrófilos, que também parecem ser dependentes das invasinas *ipa* (RENESTO et al., 1996). Estas células são essenciais para a característica de dano tecidual severo da shigellose uma vez que esta é causada pela necrose destas células por *ipaB* e *ipaC* (FRANÇOIS et al., 2000; MANDIC-MULEC et al., 1997).

A ideia principal por trás da construção de mutantes de *Shigella* é o desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas. A cepa candidata à vacina deve ter seu potencial inflamatório e de virulência cuidadosamente definido, com a intenção de definir dano tecidual ao hospedeiro, que deve ser mínimo, e a resposta inflamatória necessária para a estimulação da resposta imune mais efetiva. Assim, grande parte dos estudos imunológicos de *Shigella* são efetuados com cepas mutantes, como a deleção de *icsA* em *Shigella flexneri* 2a (COSTER et al., 1999), atenuação do *VirG* em *Shigella sonnei* (HARTMAN e

VERKATESEN, 1998) e em *Shigella dysenteriae* 1 (KLEE et al., 1997).

Muitos utilizam a atenuação em cepas de *Shigella flexneri* 2a, devido esta ser um dos sorotipos mais encontrados no mundo (PASETTI et al., 2003; KOPROWSKI et al., 2000; KOTLOFF et al., 2000; KOTLOFF et al., 1996; NORIEGA et al., 1996; NORIEGA et al., 1995). Apesar da larga utilização desta cepa para fins vacinais, há estudos que usam mutantes de *Shigella flexneri* 5a M90T. A deleção de genes que regulam a síntese de aminoácidos aromáticos (como os mutantes de *aro*) e nucleotídeos (purina *pur*) são um dos alvos mais utilizados.

Estas deleções demonstraram atenuação da virulência *in vitro* e *in vivo* nos estudos de Cersini e colaboradores (1998). Posteriormente, também foram divulgados estudos com diversos mutantes de purina (*pur*) em modelo pulmonar de camundongo para avaliar suas respostas imunes. Estes estudos revelaram que os mutantes foram eficientes em induzir respostas pró-inflamatórias mesmo após 72h de infecção, com grande regulação dos antígenos de Complexo Principal de Histocompatibilidade Classe II (MHC-II), demonstrando uma efetiva habilidade de ativar a imunidade do hospedeiro (CERSINE et al., 2003).

Também utilizando deleções em *aro* e *pur*, Bernadini e colaboradores (2001) demonstraram que imunizações intragástricas ou intranasais em porquinho-da-índia causaram proteção na indução de ceratoconjuntivite. A inoculação intranasal com as cepas mutantes causaram baixos danos teciduais e altos títulos de Imunoglobulina – IgA.

Apesar destes inúmeros estudos, ainda não se obteve sucesso em desenvolver uma vacina contra *Shigella* eficaz. Sansonetti (2006) questionou em um artigo de opinião a viabilidade na pesquisa de vacinas contra a Shigellose devido ao tempo decorrido e variações em seus dados epidemiológicos. Ele acredita que os dados são subestimados pela ausência de pesquisa em países chaves como a África. Além disso, as mutações ocorridas em cepas selvagens, principalmente as referentes a resistência microbiana que estão

cada vez mais elevados, deixam claro que esta doença pode causar altos níveis de mortalidade novamente e a pesquisa vacinal seria de grande necessidade.

7. Considerações Finais

A utilização da cepa de *Shigella flexneri* 5a - M90T – foi essencial para desvendar os mecanismos de invasão da Shigellose. O plasmídeo de invasão apresentado por esta cepa e ausente em cepas avirulentas culminou com a descoberta dos genes *ipa*'s, hoje conhecidos como principais determinantes do potencial de invasão da *Shigella*. Os estudos utilizando a M90T levaram a um conhecimento virtual de como esta bactéria se comporta em humanos e quais seriam as principais rotas para o desenvolvimento de uma vacina eficaz.

Apesar dos grandes conhecimentos obtidos, há escassez de estudos com a caracterização genética e imunológica de cepas clínicas (selvagens) isoladas de pacientes que desenvolveram a doença. Consideramos essa ausência de estudos uma falha no conhecimento sobre a patogenicidade da Shigellose, pois não levam em consideração as mutações naturais que podem causar alterações na virulência, não encontrada em cepas controladas. Acreditamos que estas cepas clínicas, em comparação com as cepas padrões, possam ajudar a compreender melhor a modulação da resposta imune, levando ao conhecimento necessário ao desenvolvimento eficaz de uma vacina contra *Shigella*.

Agradecimentos

Agradeço as correções e opiniões da minha orientadora Dra. Patrícia Orlandi e meu Co-Orientador Dr. André Mariúba. Agradeço também a minha amiga Maria Edilene Martins de Almeida, quem me ajudou a escolher este tema de revisão.

Divulgação

Este artigo de revisão é inédito. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação.

Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, desta revisão, por meio eletrônico.

Referências

- BARZU, S., BENJELLOUN-TOUJIMI, Z., PHALIPON, A., SANSONETTI, P., PARSOT, C. Functional Analysis of the *Shigella flexneri* IpaC Invasin by Insertional Mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1599–1605, 1997.
- BAUDRY, B., MAURELLI, A. T., CLERC, P., SADOFF, J. C., SANSONETTI, P. J. Localization of Plasmid Loci Necessary for the Entry of *Shigella flexneri* into HeLa Cells, and Characterization of One Locus Encoding Four Immunogenic Polypeptides. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 3403-3413, 1987.
- BERGAN, T., CHAPTER, V. Bacteriophage Typing of *Shigella*. **Methods in Microbiology**, v. 13, p. 177-286, 1979.
- BERNADINI, M. L., J. MOUNIER, H., D'HAUTEVILLE, M., COQUIS-RONDON., SANSONETTI, P. J. Identification of *icsA*, a plasmid locus of *Shigella flexneri* which governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. **Proceeding of the National. Academy of Science**, v. 86, n. 10, p. 3867–3871, 1989.
- BERNARDINI, M. L., ARONDEL, J., MARTINI, I., AIDARA, A., SANSONETTI, P. J. Parameters Underlying Successful Protection with Live Attenuated Mutants in Experimental Shigellosis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2., p. 1072–1083, 2001.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D., HITCHENS, A. P. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, The Williams & Wilkins Company 6th Edition, Baltimore, Md, 1948
- BUYSSE, J., STOVER, C. K., OAKS, E.V., VENKATESAN, M., KOPECKO, D.J. Molecular Cloning of Invasion Plasmid Antigen (*ipa*) Genes from *Shigella flexneri*: Analysis of *ipa* Gene Products and Genetic Mapping. **Journal Bacteriology**, v. 169, n. 6, p. 2561-2569, 1987.

- BUYSSE, J.M., VENKATESAN, M., MILLS, J.A., OAKS, E.V. Molecular characterization of a trans-acting, positive effector (ipaR) of invasion plasmid antigen synthesis in *Shigella flexneri* serotype 5, **Microb Pathog.** V. 3, p. 197-211, 1990.
- CERSINI, A., MARTINO, M. C., MARTINI, I., ROSSI, G., BERNARDINI, M. L. Analysis of Virulence and Inflammatory Potential of *Shigella flexneri* Purine Biosynthesis Mutants. **Infection and Immunity**, v, 71, n. 12, p. 7002-7013, 2003.
- CLERC, P., SANSONETTI, P. J. Entry of *Shigella flexneri* into HeLa Cells: Evidence for Directed Phagocytosis Involving Actin Polymerization and Myosin Accumulation. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 11, p. p.2681-2688, 1987.
- COSTER, T. S., HOGE, C. W., VAN DE VERG, L. L., HARTMAN, A. B., OAKS, O. V., VENKATESAN, M. M., COHEN, D., ROBIN, G., FONTAINE-THOMPSON, A., SANSONETTI, P. J., HALE, T. L. Vaccination against Shigellosis with Attenuated *Shigella flexneri* 2a Strain SC602. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3437-3443, 1999.
- FERNANDEZ, M.I., SANSONETTI, P. J. *Shigella* interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. **International Journal of Medicine and Microbiology**. v. 293, n. 1, p. 55-67, 2003.
- FORMAL, S. B; HALE, T. L; KAPFER, C; COGAN, J. P; SNOY P. J; CHUNG, R; WINGFIELD, M. E; ELISBERG, B. L; BARON, L. S. Oral vaccination of monkeys with an invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. **Infection and Immunity**, v. 46, n. 2, p. 465-469, 1984.
- FRANÇOIS, M., CABEC, V. L., DUPONT, M-A, SANSONETTI, P. J., MARIDONNEAU-PARINI, I. Induction of Necrosis in Human Neutrophils by *Shigella flexneri* Requires Type III Secretion, IpaB and IpaC Invasins, and Actin Polymerization. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1289-1296, 2000.
- HARTMAN, A. B., VENKATESAN, M. M. Construction of a Stable Attenuated *Shigella sonnei virG* Vaccine Strain, WRSS1, and Protective Efficacy and Immunogenicity in the Guinea Pig Keratoconjunctivitis Model. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4572-4576, 1998.
- KAPPERUD, G., RØRVIK, L. M., HASSELTVEDT, V., HØIBY, E. A., IVERSEN, B. G., STAVELAND, K., JOHNSEN, G., LEITAO, J., HERIKSTAD, H., ANDERSSON, Y., LANGELAND, G., GONDROSEN, B., LASSEN, J. Outbreak of *Shigella sonnei* Infection Traced to Imported Iceberg Lettuce. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 609-614. 1995.
- KEENE, W. E., McANULY, J. M., HOESLY, F. C., WILLIAMS, P. Jr., HEDBERG, K., OXMAN, G. L., BARRETT, T. J., PFALLER, M. A., FLEMING, D. W. A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 9, p. 579, 1994.
- KEUSCH, G. T. The Rediscovery of Shiga Toxin and Its Role in Clinical Disease. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 51, Suppl. 1, p. S5-S22, 1998.
- KLEE, S. R., TZSCHASCHEL, B. D., FALT, I., KARNELL, A., LINDBERG, A. A., TIMMIS, K N., GUZMÁN, C. A. Construction and Characterization of a Live Attenuated Vaccine Candidate against *Shigella dysenteriae* Type 1. **Infection and Immunity**, v.65, n. 6, p. 2112-2118, 1997.
- KOPROWSKI, H., LEVINE, M. M., ANDERSON, R. J., LOSONSKY, G., PIZZA, M., BARRY, E. M. Construction and Attenuated *Shigella flexneri* 2a Vaccine Strain CVD 1204 Expressing Colonization Factor Antigen I and Mutant Heat-Labile Enterotoxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli* . **Infection and Immunity**, v.68, n.9, p. 4884-4892, 2000.
- KOTLOFF, K. L., NORIEGA, F. R., SAMANDARI, T., SZTEIN, M. B., LOSONSKY, G. A., NATARO, J. P., PICKING, W. D., BARRY, E. M., LEVINE, M. M. *Shigella flexneri* 2a Strain CVD 1207, with Specific Deletions in *virG*, *sen*, *set*, and *guaBA*, Is Highly Attenuated in Humans. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1034-1039, 2000.
- KOTLOFF, K. L., NORIEGA, F., LOSONSKY, G. A. , SZTEIN, M. B., WASSERMAN, S. S., NATARO, J.

- P., LEVINE, M. M. Safety, Immunogenicity, and Transmissibility in Humans of CVD 1203, a Live Oral *Shigella flexneri* 2a Vaccine Candidate Attenuated by Deletions in *aroA* and *virG*. **Infection and Immunity**, v.64, n. 11, p. 4542–4548, 1996.
- KOTLOFF, K.L., WINICKOFF, J.P., IVANOFF, B., CLEMENS, J.D., SWEDLOW, D.L., SANSONETTI, P.J., ADAK, G.K., LEVINE, M.M. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bull World Health Organ**, v.77, n. 8, p.651-666, 1999.
- MAGUIRE, H.C., SENG, C., CHAMBERS, S., CHEASTY, T., DOUBLE, G., SOLTANPOOR, N., MORSE, D. *Shigella* outbreak in a school associated with eating canteen food and person to person spread. **Communication of Disease Public Health**, v. 1, n. 4, p. 279-80, 1998.
- MAKINO, S., SASAKAWA, C., KAMATA, K., KURATA, T., YOSHIKAWA, M. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *Shigella flexneri* 2a. **Cell**, v. 46, n. 4, p. 551-5, 1986.
- MANDIC-MULEC, I., WEISS, J., ZYCHLINSKY, A. *Shigella flexneri* is trapped in polymorphonuclear leukocyte vacuoles and efficiently killed. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p.110–115, 1997.
- MANTIS, N., PRÉVOST, M. C., SANSONETTI, P. Analysis of epithelial cell stress response during infection by *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2474-2482, 1996.
- NAIMI, T.S., WICKLUND, J.H., OLSEN, S.J., KRAUSE, G., WELLS, J.G., BARTKUS, J.M., BOXRUD, D. J., SULLIVAN, M., KASSENBERG, H., BESSER, J.M., MINTZ, E.D., OSTERHOLM, M.T., HEDBERG, C.W. Concurrent Outbreaks of *Shigella sonnei* and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections Associated with Parsley: Implications for Surveillance and Control of Foodborne Illness. **Journal Food Protection**, v.66, n. 4, p. 535-541. 2003.
- NORIEGA, F. R., LOSONSKY, G., LAUDERBAUGH, C., LIAO, F. M., WANG, J. Y., LEVINE, M. M. Engineered *guaB-A virG Shigella flexneri* 2a Strain CVD 1205: Construction, Safety, Immunogenicity, and Potential Efficacy as a Mucosal Vaccine. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 8, p. 3055–3061, 1996.
- NORIEGA, F. R., WANG, J. Y., LOSONSKY, G., MANEVAL, D. R., HONE, D. M., LEVINE, M. M. Construction and characterization of attenuated *aroA virG Shigella flexneri* 2a strain CVD 1203, a prototype live oral vaccine. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 11, p.5168–5172, 1995.
- ONODERA, N. T., RYU, J., DURBIC, T., NISLOW, C., ARCHIBALD, J. M., ROHDE, J. R. Genome sequence of *Shigella flexneri* serotype 5a strain M90T Sm. **Journal of Bacteriology**, v.194, n.11, p.3022, 2012.
- PASETTI, M.F., BARRY, E. M., LOSONSKY, G., SINGH, M., MEDINA-MORENO, S. M., POLO, J. M., ULMER, J., ROBINSON, H., SZTEIN, M. B., LEVINE, M. M. Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhi and *Shigella flexneri* 2a Strains Mucosally Deliver DNA Vaccines Encoding Measles Virus Hemagglutinin, Inducing Specific Immune Responses and Protection in Cotton Rats. **Journal of Virology**, v. 77, n. 9, p. 5209–5217, 2003.
- PHALIPON, A. SANSONETTI, P. J. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 119-129, 2007.
- PUPPO, G. M., LAN, R., REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **PNAS**, v. 97, n. 19, p. 10567-10572, 2000.
- RENESTO, P., MOUNIER, J., SANSONETTI, P. J. Induction of adherence and degranulation of polymorphonuclear leukocytes: a new expression of the invasive phenotype of *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v.64, n.3, p.719-23, 1996.
- SANSONETTI, P. J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-

eukaryote cross-talks. **FEM Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p.3-14, 2001.

SANSONETTI, P. J. Shigellosis: An Old Disease in New Clothes?. **PLOS Medicine**, v. 3, n. 9, e:354, 2006.

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. 2752-64, 1996.

SANSONETTI, P.J., HALE,T.L., DAMMIN G.J., KAPFER, C., COLLINS, FORMAL, S.B . Alterations in the pathogenicity of *Escherichia coli* K-12 after transfer of plasmid and chromosomal genes from *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 3, p. 1392-1402, 1983.

SANSONETTI, P.J., KOPECKO, D.J., FORMAL, S.B. Involvement of a Plasmid in the Invasive Ability of *Shigella Flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 35, n. 3, p.852-60, 1982.

SASKAWA, C., KOMATSU, K., TOBE, T., SUZUKI, T., YOSHIKAWA, M. Eight genes in region 5 that form an operon are essential for invasion of epithelial cells by *S. flexneri* 2a. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 8, p. 2334–2346, 1993.

SERENY, B. Experimental *shigella* keratoconjunctivitis: a preliminary report. **Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, 2:293–296, 1955.

SHIM, D. H., SUZUKI, T., CHANG, S. Y., PARK, S. M., SANSONETTI, P. J., SASAKAWA, C., KWEON, M. N. New animal model of shigellosis in the Guinea pig: its usefulness for protective efficacy studies. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2476-82, 2007.

SHIPLEY, S. T., PANDA, A., KHAN, A. Q., KRIEL, E. H., MACIEL, M. JR., LIVIO, S., NATARO, J. P.,LEVINE, M. M., SZTEIN, M. B., DETOLLA, L. J.

A challenge model for *Shigella dysenteriae* 1 in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). **Comparative Medicine**, v.60, n. 1, p.54-61,2010.

TROFA, A. F., UENO-OLSEN, H., YOSHIKAWA, M.,OIWA, R. Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the Dysentery Bacillus. **The Infectious Diseases Society of America**, v. 29, n. 5, p. 1303–6, 1999.

VAN DE VERG, L., MALLET, C. P., COLLINS, H. H., LARSEN, T., HAMMACK, C., HALE, T. Antibody and Cytokine Responses in a Mouse Pulmonary Model of *Shigella flexneri* Serotype 2a Infection. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5 , p.1947-1954, 1995.

VENKATESAN, M. M., BUYSSE, J. M., OAKS, E. V. Surface presentation of *Shigella flexneri* invasion plasmid antigens requires the products of the spa locus. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n.6, p.1990-2001, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. Guidelines for the Control of Shigellosis, including Epidemics due to *Shigella dysenteriae* 1. : **World Health Organization**,2005.Disponivel<<http://www.who.int/cholera/publications/shigellosis/en/>> Acessado em: 15 de maio de 2013.

ZYCHLINSKY A., FITTING, C., CAVAILLON, J. M., SANSONETTI, P. J. Interleukin I is released by murine macrophages during apoptosis induced by *Shigella flexneri*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 3, p. 1328-1332, 1994.