



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD  
INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA  
INTERAÇÃO PATÓGENO HOSPEDEIRO  
(PPGBIO – INTERAÇÃO)**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS APÓS CONTATO CELULAR COM ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *SHIGELLA***

**ALESSANDRA PONTES CAVALCANTE**

**MANAUS - AM**

**2019**



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**ALESSANDRA PONTES CAVALCANTE**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS APÓS CONTATO CELULAR COM ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *SHIGELLA***

Dissertação de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Puccinelli Orlandi

**MANAUS - AM**

**2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

C377a

Cavalcante, Alessandra Pontes

Avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias após contato celular com isolados clínicos de *Shigella*. / Alessandra Pontes Cavalcante. – Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

58 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia Puccinelli Orlandi.

1. Doenças diarreicas 2. Shigella I. Título

CDU 579.842 (811.3) (043.3)

CDD 579.34 22. ed



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz



**ILMD** INSTITUTO LEÔNIDAS  
& MARIA DEANE  
Fiocruz Amazônia

**ALESSANDRA PONTES CAVALCANTE**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS APÓS CONTATO CELULAR COM ISOLADOS  
CLÍNICOS DE *SHIGELLA***

Dissertação de mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre de Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, área de concentração bioquímica, biologia celular e molecular de patógenos e seus vetores.

APROVADA EM: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof(a). Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi  
Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/AM – Presidente

---

Prof(a). Dra. Ormezinda Celeste Christo Fernandes  
Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/AM

---

Prof. Dr. Adolfo José da Mota  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

*Às meus amados pais Ana e Marilên.*

*Às meus amigos*

*e a todos aqueles que torceram por mim até*

*aqui.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido que no meio das crises eu não perdesse a fé durante esse tempo. Obrigada por fazer morada em mim.

A minha mãe que entre crises de raiva, choro e risadas nunca negou colo e sempre foi a minha inspiração. Ao meu pai que sempre estava de prontidão para me buscar/levar em qualquer horário/lugar para realizar os experimentos e do seu jeito contido ficou na torcida por mim. Aos meus irmãos que aguentaram todo o meu estresse (ser irmã mais velha me deu vantagens). Amo vocês incondicionalmente!

Aos amigos: Polyane, João, Isabela, Gabrielly, Lorena, Hallana, Rejina, Felipe, Igor, Janilson, Érica e Ana Tayná que sempre tiveram as palavras de consolo nos meus momentos de desespero e me fizeram gargalhar de todos eles. Aos amigos do Tchibum e ao grupo dos “Selecionados da Biotec” por não terem permitido que eu esquecesse o quanto é maravilhoso não se sentir só nos caminhos da vida. À Andressa, Viviane, Anderson, Nathalia e Bruna por me lembrarem de que antes do ter, o Ser sempre vai valer mais. A todos aqueles que não são mencionados aqui porque estou emocionada demais e por ter um espaço limitado para falar de cada um. Serei eternamente grata! Vocês estão em minhas orações e espero que saibam que podem contar comigo sempre (mesmo eu faltando aos eventos de casamento, aniversários e afins, ok? Renato e Felipe Araújo espero que entendam e saibam que continuo amando vocês).

Aos colegas de trabalho que viraram meus irmãos: Gleiciene (Obrigada por cada conversa e pelo apoio que só nós duas sabemos o quanto foi necessário), Wellington, Danielle, Ingrid, Sarita, Yury, Ivanildes, Tatiane, Elizângela, Paloma, Daniel, Juliane, Ruth, Fernanda, Natália e a todos os alunos do grupo DCDIA (os atuais e os que já estão trilhando outros caminhos): QUE GRUPO! Obrigada! Tê-los no dia-a-dia do laboratório foi um presente divino para aliviar os desafios dos experimentos.

A Leidiane Amorim, Carol Nobre, Maria Carolina e Andréia Santa Rita obrigada por terem me acolhido assim que entrei no laboratório e por toda paciência em explicar cada procedimento. Vocês serão minhas eternas mestras.

Aos amigos de mestrado só posso dizer que: “A TAPIOCA VIROU!” e que orgulho desses mestres e mestras, viu? Minha turma! Meus colegas! Meus amigos! Meus exemplos! Meus criadores de memes favoritos.

A Paula Takita que definitivamente foi um anjo nessa reta final no momento que eu já me sentia sem forças, “respirando por aparelho” (posso fazer um drama?) e que foi a luz do fim do túnel para que eu entendesse imunologia (ainda não sei como você gosta disso) e meus resultados. Obrigada, Paula! Eu jamais vou esquecer isso. Jamais!

A Dra Patrícia Orlandi que após corrigir meu primeiro relatório de iniciação científica me enviou um e-mail parabenizando e escreveu: “Quero você na pesquisa! ”. Foi uma semente que a senhora jogou e quando percebi já estava dando frutos. Para uma aluna que tinha desistido de engenharia química para ser biotecnóloga (sem nem saber do que se tratava, mas que tinha certeza que queria trabalhar na área da saúde) ter um rumo na carreira profissional e se ver apaixonada pela área (apesar dos “perrengues”) foi incrível. Obrigada por ter visto algo em mim que não sei se sozinha conseguiria. Valeu a pena! Está valendo!

Aos professores do programa PPGGIO pelo conhecimento compartilhado.

A Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane - pela estrutura para a realização dos experimentos. Aos técnicos: Sebastião, Patrícia, Juraci, Mota e Maranhão por sempre dar um jeito de ajudar quando algo no laboratório sai do controle; Michele, Gio, as secretárias da coordenação do PPGGIO, aos funcionários, todos que fazem parte da maquinaria dessa Fundação funcionar: muito obrigada!

A Fundação Oswaldo Cruz – Rondônia, em particular ao Laboratório de Microbiologia coordenado pela Dra Najla Benevides e ao Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde coordenado pela Dra Juliana Zuliani que colaboraram bastante nessa reta final do mestrado e principalmente por terem pessoas como o Mauro (a vida vai te recompensar com muito mais alegrias do que você merece só por ter aguentado todos os meus questionamentos, viu? Obrigada mesmo!), Núcia, “Esquerdo”, “Anjo”, George, Maicon, Renata (desculpem os momentos de agonia. E muito obrigada pelos lanches da tarde e todas as gargalhadas contidas neles. Espero revê-los, mas um pouco mais no futuro, ok?), Sula (não esquecerei do nosso combinado!) e todos os alunos que foram super acolhedores com esta mestranda que vos escreve. Muito obrigada!

Por fim, a todos aqueles que em uma mensagem na madrugada ou em um dia qualquer tiravam um momento do dia para perguntar como eu estava (Renata, Caio), enviar figurinhas por qualquer motivo (Everton) e tantos outros que doavam seu tempo para me escutar. Uma vez eu ouvi isso de um amigo e nunca esqueci: “O que uma pessoa tem de mais precioso é o tempo. Se ela tira uma parte desse tempo para doar a você, valorize! ”. (Desculpem-me por não ter doado parte do meu tempo para vocês, ultimamente. Pretendo corrigir essa falha!)

A todos que participaram de maneira direta ou indireta para a finalização deste projeto,

**OBRIGADA!**

*“O verdadeiro heroísmo consiste em persistir por mais um segundo quando tudo parece perdido. ”*

*W. F. Grenfel*



## RESUMO

A *Shigella* é um dos agentes patogênicos comumente associado a doenças diarreicas, sendo classificada em 4 espécies de acordo com a estrutura presente na superfície do antígeno O, as quais são: *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* e *Shigella dysenteriae*. Na região Norte existe poucos estudos sobre esse patógeno, no entanto, em Manaus-Amazonas foi realizado um estudo epidemiológico durante o período de 2007 a 2009 que identificou a *Shigella* como a quinta causa de diarreia. Neste estudo, foram selecionadas duas amostras com perfis de invasão opostos, a SB183 e SF201, com o objetivo de avaliar o potencial inflamatório em macrófago J774 observando a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Além de comparar a capacidade invasiva destes isolados com as cepas padrões *Shigella flexneri* M90T 5a e *Escherichia coli* enteroinvasora EIEC. Como resultado, foi observado que nos testes de invasão celular em HEp-2, as cepas apresentavam perfil de invasão progressivo, no entanto, a M90T foi a cepa que originou o número maior de UFC/mL. Em relação, ao teste de fagocitose foi observado que houve redução da quantidade de células conforme o aumento do tempo de exposição. Quanto a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias, as maiores taxas de expressão de IL-1 $\beta$  ocorreram nos períodos de 30 e 120 minutos. A EIEC e a *Shigella* SB183 demonstraram uma baixa regulação da IL-1 $\beta$  após 180 minutos, sugerindo uma progressão mais lenta na interação com macrófagos para ambas estas bactérias. Para TNF- $\alpha$ , a EIEC e a *Shigella* SB183 agruparam-se com a *Shigella* M90T, isto, associado com as crescentes taxas UFC e o decréscimo de macrófagos por campo, sugerem o sucesso dos isolados em promover a necrose do macrófago, com baixo *clearance* bacteriano, devido a associação de TNF- $\alpha$  com produção de NOS. As associações encontradas neste estudo com SB183 e EIEC sugerem um padrão de invasão e escape do macrófago com uma progressão mais lenta e infecção mais branda para SB183, similar ao encontrado em EIEC. Para a SF201, o perfil de expressão gênica associado ao controle negativo, apesar das altas taxas de invasão, sugere a habilidade deste isolado em manipular o macrófago em determinados pontos da infecção. Ambas, SF201 e SB183, isoladas de fezes de crianças no Amazonas, possuem grande potencial ainda não explorado. Investigações mais profundas são necessárias para elucidar as diferenças entre a manipulação do hospedeiro e os fatores de virulência envolvidos nestas duas amostras.

**Palavras chave:** *Shigella*, citocinas pró-inflamatórias, invasão celular.

## ABSTRACT

*Shigella* is one of the pathogens commonly associated with diarrheal diseases, being classified into 4 species according to the structure present on the surface of antigen O, which are: *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii* and *Shigella dysenteriae*. In the northern region there are few studies on this pathogen, however, in Manaus-Amazonas was carried out an epidemiological study during the period 2007-2009 that identified *Shigella* as the fifth cause of diarrhea. In this study, two samples with opposite invasion profiles, SB183 and SF201, were selected in order to evaluate the inflammatory potential in J774 macrophage observing the gene expression of pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . In addition to comparing the invasive capacity of these isolates with the standard strains *Shigella flexneri* M90T 5a and *Escherichia coli* enteroinvasora EIEC. As a result, it was observed that in the cell invasion tests in HEp-2, the strains presented progressive invasion profile, however, the M90T was the strain that originated the highest number of CFU / mL. Regarding the phagocytosis test, it was observed that there was a reduction in the amount of cells as the exposure time increased. As for the proinflammatory cytokine gene expression, the highest IL-1 $\beta$  expression rates occurred in the 30 and 120 minute periods. EIEC and *Shigella* SB183 demonstrated downregulation of IL-1 $\beta$  after 180 minutes, suggesting a slower progression in macrophage interaction for both these bacteria. For TNF- $\alpha$ , EIEC and *Shigella* SB183 were grouped with *Shigella* M90T, which, associated with increasing CFU rates and decreasing macrophages per field, suggest the success of isolates in promoting low clearance macrophage necrosis due to the association of TNF- $\alpha$  with NOS production. The associations found in this study with SB183 and EIEC suggest a pattern of macrophage invasion and escape with slower progression and milder infection to SB183, similar to that found in EIEC. For SF201, the gene expression profile associated with the negative control, despite the high invasion rates, suggests the ability of this isolate to manipulate the macrophage at certain points of infection. Both SF201 and SB183, isolated from feces of children in the Amazon, have great untapped potential. Further investigation is needed to elucidate the differences between host manipulation and virulence factors involved in these two samples.

**Keywords: *Shigella*, proinflammatory cytokines, cell invasion.**

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1: MODELO DO LPS DA SHIGELLA FLEXNERI 5A (M90T) E A DIVERSIDADE DO ANTÍGENO O.</b>	<b>19</b>
<b>FIGURA 2: INCIDÊNCIA DE SHIGELOSE DE ACORDO COM A REGIÃO GEOGRÁFICA.</b>	<b>21</b>
<b>FIGURA 3: ESTIMATIVA DE CASOS DE SHIGELOSE PROVENIENTES DE 178 PAÍSES ENTRE OS ANOS DE 2012 A 2017.</b>	<b>23</b>
<b>FIGURA 4 - PROCESSO DA PATOGÊNESE DE SHIGELLA SPP.</b>	<b>24</b>
<b>FIGURA 5 - FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES</b>	<b>29</b>
<b>FIGURA 6 – ENSAIO DE INVASÃO EM CÉLULA HEP-2 COM PADRÃO DE SHIGELLA FLEXNERI 5A M90T (ATCC 12022-152) E E. COLI ENTEROINVASORA EIEC (ATCC 1381), NOS TEMPOS DE 30, 60, 120 E 180 MINUTOS. SETAS BRANCAS EVIDENCIAM A PRESENÇA BACTERIANA E INVASÃO.</b>	<b>36</b>
<b>FIGURA 7 - ENSAIO DE INVASÃO EM CÉLULA HEP-2 COM ISOLADOS CLÍNICOS SHIGELLA BOYDII 183 (SB183) E SHIGELLA FLEXNERI 201 (SF201), NOS TEMPOS DE 30, 60, 120 E 180 MINUTOS. SETAS BRANCAS EVIDENCIAM A PRESENÇA BACTERIANA E INVASÃO.</b>	<b>37</b>
<b>FIGURA 8 ENSAIO DE FAGOCITOSE EM MACRÓFAGO J774 COM PADRÃO DE SHIGELLA FLEXNERI 5A M90T (ATCC 12022-152) E E. COLI ENTEROINVASORA EIEC (ATCC 1381), NOS TEMPOS DE 30, 60, 120 E 180 MINUTOS.</b>	<b>43</b>
<b>FIGURA 9: ENSAIO DE FAGOCITOSE EM MACRÓFAGO J774 COM ISOLADOS CLÍNICOS SHIGELLA BOYDII 183 (SB183) E SHIGELLA FLEXNERI 201 (SF201), NOS TEMPOS DE 30, 60, 120 E 180 MINUTOS.</b>	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LISTA DOS ISOLADOS DE SHIGELLA E CEPAS PADRÕES.....	30
TABELA 2 - MIX DA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO DO CDNA .....	35
TABELA 3 – SEQUÊNCIA DOS GENES DE RESPOSTA IMUNE IL-1B E TNF-A.....	35
TABELA 4 – SEQUÊNCIA DO GENE NORMALIZADOR .....	36
TABELA 5 - MIX DA REAÇÃO QPCR.....	36

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - ENSAIO SEMI-QUANTITATIVO COM CÉLULAS HEP-2. TESTE ESTATÍSTICO T-TEST. TODOS OS INTERVALOS DE TEMPO APRESENTAM RELAÇÃO SIGNIFICATIVA COM O PADRÃO DE SHIGELLA M90T. * P<0.05 **P<0.01 .....	38
GRÁFICO 2 – ENSAIO QUANTITATIVO COM CÉLULAS HEP-2 DE UFC/MÇ. TESTE ESTATÍSTICO T-TEST * P<0.05 .....	39
GRÁFICO 3 - MAPA DE CALOR DOS VALORES DE $\Delta\Delta CT$ PARA IL-1B. QUANTO MAIS PRÓXIMO DE BRANCO A EXPRESSÃO É NEGATIVA; QUANTO MAIS AUMENTA A ESCALA DE VERMELHO, MAIS ALTA A EXPRESSÃO POSITIVA. ....	44
GRÁFICO 4 - MAPA DE CALOR DOS VALORES DE $\Delta\Delta CT$ PARA TNF-A. QUANTO MAIS PRÓXIMO DE BRANCO A EXPRESSÃO É NEGATIVA; QUANTO MAIS AUMENTA A ESCALA DE VERMELHO, MAIS ALTA A EXPRESSÃO POSITIVA. ....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>2D</b>	Duas dimensões
<b>Agar SS</b>	Ágar <i>Salmonella Shigella</i>
<b>Agar XLD</b>	Ágar de desoxicolato-lisina-xilose
<b>AM</b>	Amazonas
<b>ATCC</b>	<i>American type culture collection</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>Células M</b>	Células epiteliais membranosas
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centímetro quadrado
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>cT</b>	<i>Cycle threshold</i>
<b>DCDIA</b>	Diagnóstico de Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
<b>Fiocruz</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>g</b>	Força G
<b>GAPDH</b>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<b>IDH</b>	Índice de Desenvolvimento Humano
<b>IFN-γ</b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>ILMD</b>	Instituto Leônidas e Maria Deane
<b>IPA</b>	Antígeno plasmídeo de invasão
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mxi-Spa</b>	Locus que codifica o SST3
<b>N-ag</b>	N-acetil-glicosamina
<b>NF-KB</b>	Fator nuclear <i>kappa B</i>
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintetase
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBS</b>	Tampão fosfato-salino
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>pINV</b>	Plasmídeo de invasão
<b>PMN's</b>	Polimorfonucleares
<b>Rha</b>	Trirahmnose
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>spp.</b>	Espécies
<b>SST3</b>	Sistema de Secreção Tipo III

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de transformação do crescimento beta
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>TNF <math>\beta</math></b>	Fator de Necrose Tumoral beta
<b>TPP</b>	<i>Techno Plastic Products</i>
<b>UFAM</b>	Universidade Federal do Amazonas
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônias

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 <i>SHIGELLA</i> SPP. ....	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA .....	21
2.3 MECANISMO DE INVASÃO DA <i>SHIGELLA</i> .....	23
2.4 INVASÃO COM <i>SHIGELLA</i> EM FAGÓCITOS E NÃO FAGÓCITOS .....	25
3 JUSTIFICATIVA .....	27
4 OBJETIVOS .....	28
4.1 OBJETIVO GERAL.....	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
5 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
5.1 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES .....	29
5.2 SELEÇÃO E REATIVAÇÃO DAS AMOSTRAS EM ESTUDO .....	29
5.3 LINHAGEM CELULAR .....	30
5.3.1 CULTIVO DAS CÉLULAS HEP-2 .....	31
5.3.2 CULTIVO DAS CÉLULAS J774.....	31
5.4 CULTIVO E PREPARO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS.....	32
5.5 TESTE DE INVASÃO QUANTITATIVO EM HEP -2 .....	32
5.6 TESTE DE INVASÃO QUALITATIVO EM HEP-2 E J774.....	33
5.7 EXTRAÇÃO DE RNA EM CULTURA DE J774 .....	33
5.8 TRANSCRIÇÃO DO CDNA.....	34
5.9 SELEÇÃO DE GENES DA RESPOSTA IMUNE.....	35
5.10 PCR EM TEMPO REAL.....	36
5.11 ANÁLISES DOS DADOS DO PCR EM TEMPO REAL.....	36
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6.1 TESTE DE INVASÃO CELULAR COM A LINHAGEM HEP-2.....	37
6.2 TESTE DE FAGOCITOSE CELULAR COM A LINHAGEM J774.....	39
6.3 EXPRESSÃO GÊNICA DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DE MACRÓFAGO (J774) FRENTE AOS ISOLADOS DE <i>SHIGELLA</i> .....	43
7 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas são a segunda causa de mortalidade infantil em países em desenvolvimento, onde as condições sócio-econômicas e higiênico-sanitárias são precárias (LIU et al., 2012; THE et al., 2016; ZAIDI; ESTRADA-GARCÍA, 2014). Este panorama é fortificado com a insuficiência de fatores nutricionais, como por exemplo, deficiência de zinco e vitamina A, e a falta de tratamento de qualidade adequado, contribuindo com episódios frequentes de diarreia que podem afetar em longo prazo o crescimento da criança e o surgimento de infecções secundárias (FISCHER WALKER et al., 2012).

Em 2012, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que 3,6% da carga global de doenças era atribuída às doenças diarreicas (THE et al., 2016). Em 2010, a incidência de diarreia em crianças com idade inferior a 5 anos em países de média e baixa renda foi de 2,9 episódios. Em 2015, cerca de 499 mil mortes de crianças menores de 5 anos no mundo ocorreram ocasionadas por doenças diarreicas (FISCHER WALKER et al., 2012; KOTLOFF et al., 2017).

Entre os agentes etiológicos mais comuns relacionados à diarreia está o Rotavírus que corresponde a 25% dos casos em crianças menores de dois anos, seguida pela *Escherichia coli* e a *Shigella*, que são os patógenos mais prevalentes entre crianças de 24 meses a 59 meses de idade (KOTLOFF et al., 2017; UDDIN; WAHID, 2014).

A *Shigella* é um patógeno transmitido pela via fecal-oral e invasivo ao nível do cólon e do íleo do intestino. O processo invasivo inclui a interiorização das células epiteliais, a multiplicação intracelular e disseminação para células adjacentes e tecidos conectivos (PROSSEDA et al., 2004). No processo invasivo, a *Shigella* adere à membrana da célula do epitélio intestinal e em seguida invade as células M. Estas células sofrem um desarranjo no citoesqueleto facilitando o escape da bactéria às células fagocíticas presentes nos agregados linfoides localizados abaixo do epitélio (HATHAWAY; KRAEHENBUHL, 2000; WASSEF; KEREN; MAILLOUX, 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 $\beta$  e IL-8 produzindo uma resposta inflamatória acentuada e provocando recrutamento dos



neutrófilos (PHALIPON; SANSONETTI, 2007). Esta resposta celular inicial aumenta acentuadamente à medida que o número de bactérias e invasões subsequentes ocorrem, sendo responsável pela manifestação clínica da doença (JENNISON; VERMA, 2004; JENSEN; HARTY; JONES, 1998; SANSONETTI, 2001; SASAKAWA, 2001).

Apesar da redução da taxa de mortalidade causada por infecções diarreicas nas últimas décadas, a sua incidência ainda continua alta (THE et al., 2016). Estudos recentes estimam que cerca de 165 milhões de casos diarreicos que ocorrem anualmente são ocasionados por *Shigella*, sendo este patógeno responsável por 108 mil mortes por ano (VUBIL et al., 2018).

Esses dados tornam-se mais preocupantes quando se observa que ainda existem poucos estudos com o intuito de compreender a interação patógeno-hospedeiro, elaborar estratégias que forneçam dados capazes de aprimorar o controle epidemiológico e, conseqüentemente, possibilitar o desenvolvimento de diagnóstico rápido e eficaz resultando em um tratamento adequado.

Na região Norte, o nosso grupo de pesquisa, Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia (DCDIA), realizou um estudo epidemiológico entre o período de 2007 a 2009, coletando amostras fecais de 1339 crianças que apresentavam um quadro diarreico severo e que foram atendidas nos hospitais públicos de Manaus (AM). Entre esses isolados clínicos foram identificadas 36 amostras positivas para a *Shigella* (CRUZ et al., 2014). Ao realizar a análise genotípica e fenotípica observaram-se perfis heterogêneos de genes de virulência carregados por estes isolados selvagens (CRUZ et al., 2014). Dentre essas amostras, a cepa *S.flexneri* 201 (SF201) demonstrou maior habilidade para invasão celular, danos morfológicos ao tecido infectado ocasionando a destruição de epitélios bronquiais e alveolares resultando em resposta imunológica maior ao ser comparada com a cepa padrão *Shigella flexneri* M90T5a (SERRA, 2013). Desde então, estes isolados de *Shigella* têm sido extensivamente estudados pelo grupo DCDIA como potenciais alvos vacinais.

Estes isolados, demonstraram um espectro de habilidades que foram desde uma intensa multiplicação dentro do citoplasma de linhagens celulares HEp-2 (célula do tipo 2 humano, considerada originária de carcinoma de laringe humana) e J774 (macrófagos de origem murina, originária de sarcoma de células reticulares), como também isolados que não invadiram estas células (REZENDE, 2015). Os isolados mais invasivos e

menos invasivos foram então alvos de diversos estudos: expressão gênica dos genes de virulência (BARROS, 2016), polimorfismo dos genes ipaH (DANTAS, 2016), sequenciamento dos sistemas de secreção (VERÇOSA, 2018) e proteoma em mimetização de contato (BATALHA, 2019). Todos estes resultados direcionam a continuação na caracterização dos isolados de *Shigella flexneri* 201 (SF201) e *S. boydii* 183 (SB183), os quais são os isolados clínicos de *Shigella* alvos do atual estudo.

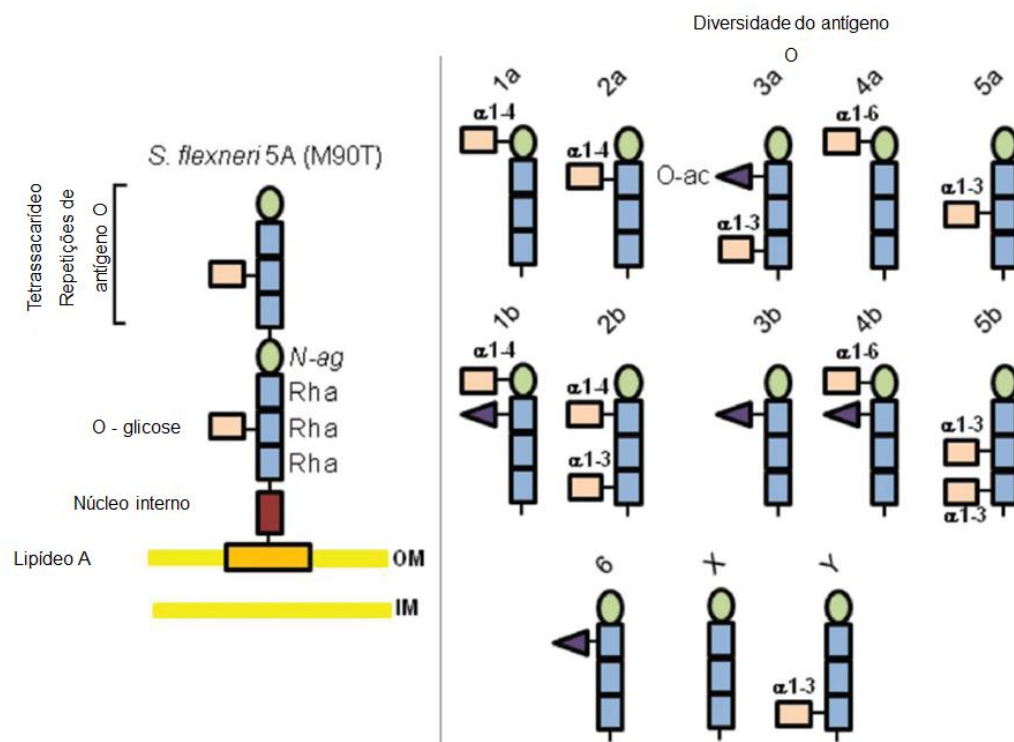
O grande responsável por essa capacidade invasiva da *Shigella* está localizado dentro de um grande plasmídeo de virulência, chamado pINV (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012; NIU et al., 2017). Acredita-se que a *Shigella* adquiriu este plasmídeo de uma *Escherichia coli* não patogênica, logo, a presença dele é uma das principais diferenças entre os gêneros, porém estas espécies dividem uma grande semelhança genética, dificultando sua diferenciação (NIU et al., 2017).

Por esta semelhança, neste estudo propomos a avaliação da inflamação de dois isolados clínicos em cultura de macrófagos J774, em comparação com o padrão de *Shigella flexneri* M90T e de *Escherichia coli* enteroinvasiva EIEC. Acreditamos que este estudo irá elucidar aspectos da patogênese de isolados clínicos de *Shigella* da região Norte e direcionar estudos futuros que visem uma abordagem vacinal, ou probiótica, com estes isolados.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Shigella* spp.

A *Shigella* é um patógeno intracelular, bacilo gram-negativo, não móvel e anaeróbio facultativo (KOTLOFF et al., 2017). Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, o gênero *Shigella* compreende 4 espécies classificadas de acordo com o perfil bioquímico e a estrutura do antígeno O presente no lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa da célula bacteriana, as quais são: *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* e *Shigella boydii* (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012; THE et al., 2016). A variabilidade existente nos componentes da cadeia lateral do antígeno O presente no LPS, resulta em sorotipos diversos entre as espécies, divididos em *S. flexneri* (15 sorotipos), *S. dysenteriae* (15 sorotipos), *S. boydii* (19 sorotipos) e *S. sonnei* (1 sorotipo) (Figura 1) (LIVIO et al., 2014) sendo seus reservatórios naturais os humanos e grandes primatas (DEKKER; FRANK, 2015).



**Figura 1: Modelo do LPS da *Shigella flexneri* 5a (M90T) e a diversidade do antígeno O.**

Fonte: (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012)

A *Shigella flexneri* 5a (M90T) possui em seu antígeno O, as subunidades Trirrahnose (Rha), N-acetil-glicosamina (N-ag) e O-glicose, que ao sofrer o processo

de glicolização tem essas subunidades alteradas no LPS, ocasionando um fator de proteção maior da bactéria contra o hospedeiro (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012).

A *Shigella* possui alta carga de virulência, necessitando apenas de 10 a 100 bactérias para ocasionar a shigelose (ZAIDI; ESTRADA-GARCÍA, 2014). A shigelose é uma disenteria bacilar caracterizada por febre, dor e/ou cólica abdominal e diarreia com muco e sangue. A doença é auto-limitante, raramente se torna sistêmica e possui como via principal de contaminação a fecal-oral, com a ingestão de alimentos e água contaminados (LAMPEL; FORMAL; MAURELLI, 2018). O período de incubação da doença é de 1 a 4 dias, podendo aparecer no segundo ou terceiro dia de infecção muco e sangue nas fezes (DEKKER; FRANK, 2015).

O gênero *Shigella* foi descoberto em 1897 pelo médico Kyoshi Shiga e inicialmente, nomeado como *Bacillus coli* (atualmente, chamada de *Escherichia coli*). No entanto, ao realizarem mais estudos com as amostras dos pacientes de Shiga, foi possível observar que havia diferenças entre os dois patógenos, o que ocasionou a alteração para esta última denominação do nome do gênero para *Shigella* (SASAKAWA, 2010, LIMA;HAVT; LIMA, 2015).

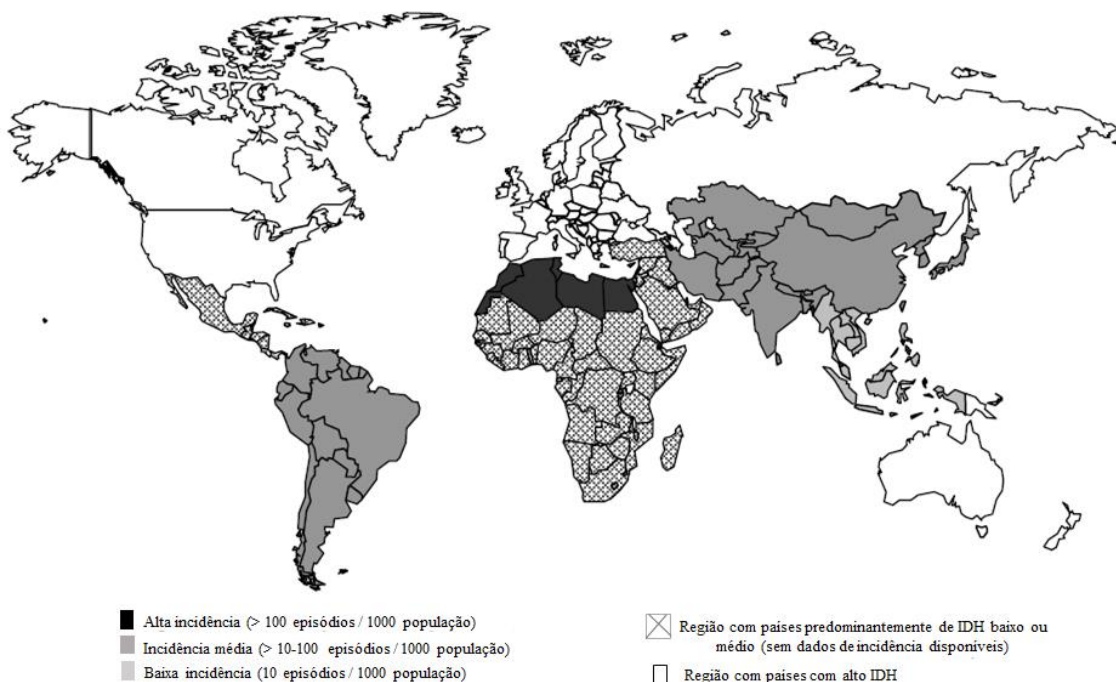
Uma das principais diferenças da *Shigella* é o Sistema de Secreção do Tipo 3, o SST3. Esse sistema concede a ela a capacidade de invadir à mucosa intestinal, contornando a imunidade inata do hospedeiro (ANDERSON; SANSONETTI; MARTEYN, 2016). O grande responsável por essa capacidade invasiva está localizado dentro de um grande plasmídeo de virulência, chamado pINV. Nesse plasmídeo, que contém cerca de 200kb, é encontrado o SST3 (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012; NIU et al., 2017). Acredita-se que a *Shigella* evoluiu ao adquirir esse plasmídeo de uma *Escherichia coli* não patogênica, o que explica sua semelhança com a *E. coli*, dificultando até mesmo a identificação e diferenciação entre estas espécies (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012; NIU et al., 2017).

Geralmente, a identificação de *Shigella* é realizada através de testes bioquímicos ou sorotipagem por aglutinação com anti-soro específico. No entanto, tornam-se inviáveis quando se tem necessidade de diferenciar amostras de *Shigella* e *E.coli* enteroinvasora (EIEC), pois pode ocorrer reação cruzada, surgindo necessidade da

utilização de técnicas de biologia molecular para uma melhor identificação (SAHL et al., 2015).

## 2.2 Epidemiologia

Em 2008, Ram e colaboradores fizeram um levantamento bibliográfico global de casos de shigelose em países com baixo e médio índice de desenvolvimento humano (IDH), entre os anos de 1984 a 2005, onde verificaram dados de morbidade e mortalidade, faixa etária, distribuição geográfica e temporal da shigelose, isolamento de *Shigella* frente a outros agentes patogênicos causadores de diarreia e também a frequência dos quatro subgrupos existentes de *Shigella*. Nesse estudo, a frequência dos subgrupos de *Shigella* foi de 57% de *S. flexneri*, 17% *S. sonnei*, 10% *S. dysenteriae* e 8% *S. boydii* (Figura 2).



**Figura 2: Incidência de Shigelose de acordo com a região geográfica.**

A cor escura no mapa representa a região onde foi verificada alta incidência de shigelose na população, com mais de 100 episódios em 1000 habitantes. A cor cinza escura representa a região onde se observou entre 10 a 100 casos de shigelose em 1000 habitantes e a cor cinza claro representa regiões com baixa incidência de shigelose contendo menos de 10 episódios em 1000 habitantes. A cor branca representa países com IDH alto e que não foram inclusos no estudo. Fonte: (RAM et al., 2008).

Um estudo realizado por Zaidi & Estrada-García, (2014) demonstrou que os subgrupos de *Shigella* variavam de acordo com a região de estudo, sendo a *S. dysenteriae* do tipo 1 endêmica na Índia, a *S. flexneri* predominante na América Latina,

África e Sudeste Asiático e a *S. sonnei* encontrada em países que sofreram mudanças na economia recentemente, como Tailândia, China e Vietnã.

Vubil e colaboradores (2018) realizaram um estudo caso-controle de diarreia e coletaram amostras de fezes de crianças menores de 5 anos no período de 2007 a 2012, no sul de Moçambique, com o intuito de avaliar a resistência a antibióticos e a epidemiologia molecular destes isolados. Neste estudo, o total de isolados analisados foi 67, sendo 59 isolados de casos de diarreia e 8 controles. A espécie mais frequente foi *Shigella flexneri* que correspondia 70,7% dos isolados, seguida por *Shigella sonnei* que correspondia 23,9% dos casos. A resistência antimicrobiana foi positiva para os antibióticos trimetoprim / sulfametoxazol, tetraciclina, cloranfenicol e ampicilina.

A variedade de cepas dentro de um mesmo país foi observada por Lima e colaboradores (2015) que inferiu que a existência dessas diferenças entre as espécies estão relacionadas às condições sócio-econômicas de cada região.

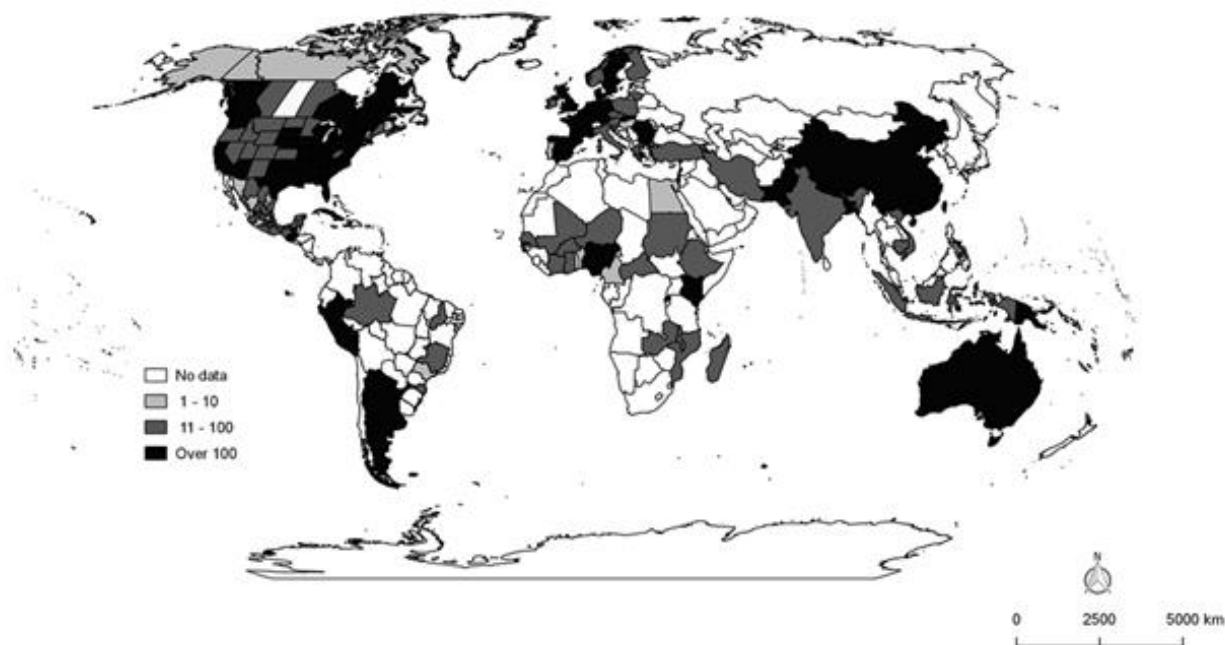
O estudo de Cruz e colaboradores (2014) e de Sousa e colaboradores (2013) validam esses dados, uma vez que dentro do Brasil conseguiram resultados distintos entre as espécies mais prevalentes de *Shigella*, sendo a *S. flexneri* prevalente em Manaus e *S. sonnei* prevalente em Belo Horizonte.

Na região Norte destacam-se três estudos: o estudo realizado por Orlandi e colaboradores (2001) em Porto Velho no Estado de Rondônia, no qual 130 casos de diarreia foram analisados e destes 10 casos (7,7%) foram positivos para *Shigella* spp., os quais 8 foram identificados como *Shigella flexneri* e 2 como *Shigella sonnei*.

O segundo estudo foi realizado por Bastos & Loureiro (2010) no Pará, onde foram isoladas 50 amostras de *Shigella*, destas 32 amostras (64%) foram identificadas como *Shigella flexneri* e 18 amostras (36%) como *Shigella sonnei*.

O terceiro estudo foi realizado no Instituto Evandro Chagas, no Pará, por Bastos e colaboradores (2012), onde coletaram amostras fecais de crianças menores de 5 anos, no período de 1979 a 2009 e obtiveram 122 casos positivos para *Shigella* spp., dos quais 66,4% correspondiam a *Shigella flexneri* e 32,8% correspondiam a *Shigella sonnei*.

Diante de poucos estudos com dados atuais sobre a epidemiologia de casos de shigelose no mundo, o grupo DCDIA realizou um levantamento de estudos com dados epidemiológicos entre os anos de 2012 a 2017 provenientes de 178 países (Figura 3).



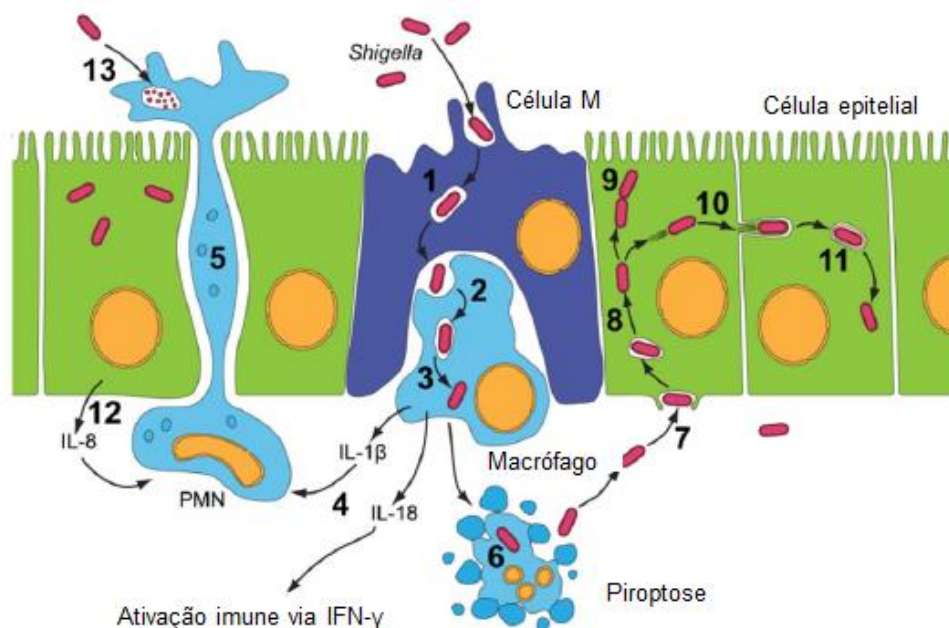
**Figura 3: Estimativa de casos de Shigelose provenientes de 178 países entre os anos de 2012 a 2017.**

A cor escura no mapa representa a região onde foi verificada alta incidência de Shigelose na população, com mais de 100 episódios em 1000 habitantes. A cor cinza escura representa a região onde se observou entre 11 a 100 casos de Shigelose em 1000 habitantes e a cor cinza claro representa regiões com baixa incidência de Shigelose contendo menos de 10 episódios em 1000 habitantes. A cor branca representa países que não foram obtidos dados de casos de Shigelose no período de 2012 a 2017. Fonte: Grupo DCDIA.

Para a realização do mapa foram coletados os dados semelhantes ao que Ram e colaboradores (2008) listaram. Ao compará-los observa-se que houve uma alteração de padrão de frequência de casos em algumas regiões. Na Argentina, Peru, Nigéria, Quênia e China apresentaram mais de 100 casos de shigelose enquanto no período de 1984 a 2005 os casos não passavam de 100 em cada 1000 habitantes.

### **2.3 Mecanismo de invasão da *Shigella***

A patogênese da *Shigella* é caracterizada por três etapas: invasão de células epiteliais do intestino, propagação dentro dos enterócitos através do contato célula a célula e a ruptura da mucosa, ocasionando inflamação intensa no cólon e reto (Figura 4) (AGAISSÉ, 2016; SCHROEDER; HILBI, 2008; ZAIDI; ESTRADA-GARCÍA, 2014).



**Figura 4: Processo da patogênese de *Shigella* spp.**

Fonte: Mattock & Blocker, 2017.

O processo se inicia com as bactérias que se encontram no lúmen gastrointestinal sendo translocadas através das células epiteliais membranosas (células M) para o tecido linfóide da mucosa subjacente que contém várias células do sistema imune inato, principalmente macrófagos. Este processo é conhecido como transcitose (Figura 4) (HATHAWAY; KRAEHENBUHL, 2000).

As bactérias são fagocitadas por macrófagos residentes das células M que são induzidos ao processo de apoptose. Com o processo de apoptose, ocorre a ativação da Caspase-1 que faz a clivagem das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18, as quais possuem papel importante no controle do processo de inflamação aguda e resposta imune exacerbada (ASHIDA; KIM; SASAKAWA, 2014). A IL-18 é responsável por ativar as células *natural-Killer* (NK), ocasionando a produção de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e promovendo uma resposta antibacteriana eficaz, enquanto que a IL-1 $\beta$  está associada com o recrutamento de neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares - PMN's) para a região da inflamação. Além disso, há o estímulo do fator de expressão NF- $\kappa$ B, envolvido no processo de regulação e secreção da quimiocina IL-8 que ao ser secretada proporciona recrutamento de mais PMN's para o local da infecção, resultando em um processo inflamatório maior do tecido e facilitando a transmigração das bactérias externas para a submucosa devido ao desarranjo causado no epitélio (SCHROEDER; HILBI, 2008; UDDIN; WAHID, 2014).



A imunidade inata gerada pela *Shigella* é caracterizada pela indução de inflamação aguda, podendo persistir por meses. Em estudos sobre as citocinas relacionadas com os sintomas clínicos e controle da infecção em humanos, temos a expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ; e anti-inflamatórias: IL-10 e TGF- $\beta$  (JENNISON; VERMA, 2004; PHALIPON; SANSONETTI, 2007).

As bactérias liberadas após o processo apoptótico do macrófago se direcionam para os enterócitos e são englobadas para o interior das células dentro de vacúolos, iniciando o processo denominado invasão basolateral. Dentro do citoplasma, há a ruptura do vacúolo e liberação das bactérias que, imediatamente, inicia a síntese de actina em um dos polos da própria célula bacteriana, permitindo sua locomoção por protrusão e auxiliando a sua disseminação entre as células epiteliais adjacentes sem que sejam detectadas pelo sistema imune do hospedeiro. Todos estes processos são regulados pelas proteínas do sistema de secreção tipo 3. Devido ao processo de protrusão, são feitos pequenos “orifícios” na lateral da célula que permite sua entrada na célula vizinha onde se multiplicará e recomeçará o processo para invadir a próxima célula (Figura 4) (SCHROEDER; HILBI, 2008).

#### **2.4 Invasão com *Shigella* em fagócitos e não fagócitos**

Uma das metodologias mais utilizadas em estudos sobre os mecanismos de patogênese de *Shigella* é a invasão em cultura de célula. Esta permite a investigação dos fatores que levam ao processo de sobrevivência, disseminação e sintomatologia em um ambiente controlado (CRUZ et al., 2014).

Para o estudo de células em *Shigella*, Bernardini e colaboradores (1989) observaram que as células HeLa e Henle não se assemelham às células epiteliais intestinais por não apresentarem confluência necessária na monocamada durante o processo de invasão. Para estudar o processo de entrada da *S. flexneri* em um sistema que refletia a situação *in vivo*, foi utilizada a célula Caco-2, que apresentou um revestimento epitelial confluyente.

Quanto ao tempo, a *S. flexneri* expressa uma capacidade limitada para interromper as junções celulares, sendo então pouco invasiva em ensaio celular. Após testar com períodos de 1, 2, 4 horas, observou-se um grau limitado de invasão após 1 hora e de uma forma mais significativa após 2 horas de incubação (HIGH et al., 1992).

Em células HEp-2, estudos demonstraram que a enterotoxina sigA, que reside na ilha de patogenicidade de *S. flexneri*, possui um efeito citopático desempenhando um papel na acumulação de fluído intestinal associado à infecção pela *S. flexneri* (AL-HASANI et al., 2000).

Quanto à fagocitose por células fagocíticas, Nonaka e colaboradores (2003) utilizaram as células U937 e a J774 induzindo o contato com cepas de *Shigella flexneri* YSH6000. Como resultado, observaram que a cepa utilizada promovia dois tipos de morte celular: a apoptose e a necrose, as quais ocorreram em células hospedeiras diferentes. As células infectadas semelhantes aos macrófagos perderam rapidamente a integridade da membrana plasmática devido a formação de poros realizados pela bactéria por meio dos genes de virulência ipaBCDA que aceleram o processo de indução a necrose. Enquanto que, o processo apoptótico ocorreu independente dos genes ipaBCDA e não necessita de internalização bacteriana, sugerindo que a morte celular rápida depende da virulência da *S. flexneri* e da expressão dos genes ipaBCD e outras proteínas.

### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar da redução da taxa de mortalidade causada por infecções diarreicas nas últimas décadas, a sua incidência ainda continua alta (THE et al., 2016). Mesmo com estudos visando à compreensão do processo patológico da *Shigella*, ainda não se tem uma vacina eficaz devido à variabilidade existente no antígeno das cepas o que ainda afeta na taxa de mortalidade infantil (YANG ET AL., 2014; HOSANGADI ET AL., 2017).

Na região Norte, o nosso grupo de pesquisa, Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia (DCDIA), realizou um estudo epidemiológico entre o período de 2007 a 2009. Neste estudo, foram identificadas isolados de *Shigella* (CRUZ et al., 2014). Desde 2007, várias caracterizações têm sido realizadas nestes isolados: avaliação de taxas de invasão (REZENDE, 2016); expressão gênica dos genes de virulência (BARROS, 2016); polimorfismo dos genes ipaH (DANTAS, 2016); sequenciamento dos sistemas de secreção (VERÇOSA, 2018) e proteoma em mimetização de contato (BATALHA, 2019). Todos estes resultados direcionam a continuação na caracterização dos isolados de *Shigella flexneri* 201 (SF201) e *S. boydii* 183 (SB183), os isolados clínicos de *Shigella* alvos do atual estudo.

Neste estudo propomos a avaliação da inflamação destes dois isolados clínicos em cultura de macrófagos J774, em comparação com o padrão de *Shigella flexneri* M90T e de *Escherichia coli* enteroinvasiva EIEC, o último devido a semelhança genética que estas espécies dividem. Acreditamos que este estudo irá elucidar aspectos da patogênese de isolados clínicos de *Shigella* da região Norte e direcionar estudos futuros que visem uma abordagem vacinal ou probiótica, com estes isolados.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial inflamatório dos isolados clínicos *Shigella flexneri* 201 (SF201) e *Shigella boydii* 183 (SB183) em macrófago J774.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a suscetibilidade de células HEp-2 à invasão pelos isolados clínicos SF201 e SB183;
- Avaliar expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófago J774 em contato com os isolados clínicos SF201 e SB183;
- Comparar o potencial inflamatório dos isolados clínicos de *Shigella* pela habilidade invasiva e indução de citocinas pró-inflamatórias em macrófago.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Fluxograma de atividades

As atividades realizadas neste estudo foram executadas de acordo com o fluxograma a seguir (Figura 5). Os isolados foram selecionados baseados em resultados de estudos anteriores e foram realizados dois tipos de cultivos celulares, em células epiteliais HEP-2 e macrófagos J774. Os intervalos de tempo de análise foram em 30, 60, 120 e 180 minutos. O teste de contato dos isolados clínicos com macrófagos, de cada intervalo, foi submetido à extração de RNA, transcrição em cDNA e expressão gênica em PCR em tempo real de citocinas pró-inflamatórias.

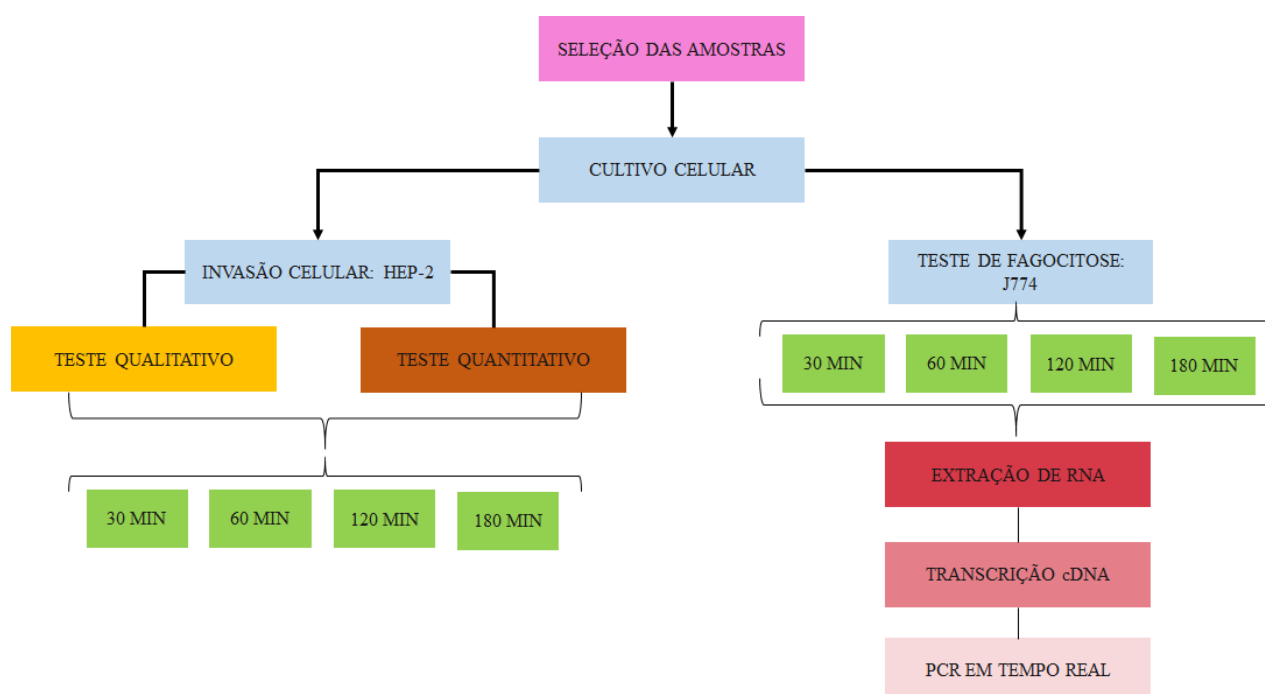


Figura 5: Fluxograma de atividades

### 5.2 Seleção e reativação das amostras em estudo

Neste estudo, foram selecionadas amostras de *Shigella* spp. a partir da bacterioteca do grupo de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas da Amazônia – DCDIA, do Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz (ILMD – FIOCRUZ – Amazônia), que foram isoladas de amostras fecais de crianças de 0 – 10 anos de idade, com diarreia, coletadas no período de 2007 a 2009 em hospitais infantis de Manaus localizados nas zonas leste, norte e oeste. Tais amostras estão inclusas dentro de um projeto maior submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa sob a

numeração: CEP/UFAM 266/2006 (Anexo 1). Os isolados selecionados para este estudo são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1 - Lista dos isolados de *Shigella* e cepas padrões**

Quantidade	Identificação Cepa/Bacterioteca
<b>FIOCRUZ – ILM D</b>	
<b>1</b>	<i>Shigella boydii</i> 183 (SB183)
<b>2</b>	<i>Shigella flexneri</i> 27 (SF201)
<b>3</b>	<b>ATCC 12022-152 (<i>Shigella flexneri</i> 5a M90T)</b>
<b>4</b>	<b>ATCC 1381 (<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora EIEC)</b>

A reativação das amostras foi realizada por meio da inoculação destas em 3 mL de caldo LB (Luria Bertani) por 24 horas a 37°C, de acordo com as orientações fornecidas pela ATCC (do inglês, *American Type Culture Collection*) para amostras microbiológicas congeladas a longo prazo. Em seguida, as amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo os meios de cultura Agar SS, Agar XLD e Agar MacConkey. Uma colônia isolada foi utilizada para identificação em testes bioquímicos da galeria EPM, MILI e Citrato de Simmons. As amostras positivas para a identificação bioquímica de *Shigella* foram extraídas por calor (colônia bacteriana ressuspensa em 30 µL de tampão TE, aquecida em banho seco a 100°C por 15 minutos e rapidamente congelada em nitrogênio líquido), e tiveram sua identificação confirmada em nível de espécie por meio da PCR padronizada por Ojha e colaboradores (2013). Após confirmação da identidade, as amostras foram armazenadas em ágar nutriente em tubo de criopreservação com óleo mineral na superfície até o uso.

Como controles selecionados para este estudo, tem-se as cepas padrão *Escherichia coli* enteroinvasora – EIEC (ATCC1381) e *Shigella flexneri* 5a M90T (ATCC12022-152) (Tabela 1).

### **5.3 Linhagem celular**

A célula utilizada para o teste de invasão celular qualitativo e quantitativo foi a HEp-2, obtida de carcinoma de laringe humana, seguindo a técnica descrita por (FRANCIS et al., 1991) com modificações.

### 5.3.1 Cultivo das células HEp-2

As células HEp-2 foram cultivadas em 3 frascos plásticos de 25cm<sup>2</sup> de superfície de crescimento (Corning) TPP, contendo 3 mL de meio de cultivo DMEM – SFB 10% e mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por três a quatro dias. Após este período, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada com 1 mL de solução tampão salina – fosfato (PBS 1X), pH 7,4 (PBS – V). O PBS 1X foi retirado, deixando os frascos bem secos e adicionou-se em cada frasco 1 mL da solução de tripsina a 0,25% mantendo contato por 6 minutos no interior da estufa para desprender as células do frasco. Logo após, foi agitado manualmente e levemente, cada frasco para que as células se desprendessem por completo. O conteúdo dos frascos foi transferido para um tubo tipo falcon estéril de 15 mL, respectivamente. Em cada tubo tipo falcon, foram adicionados 3 mL de DMEM - SFB 10% (afim de inibir a ação da tripsina na célula) e centrifugados por 4 minutos a 1500 rpm.

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram descartados, os *pellets* ressuspensos com o restante de meio que sobrou no falcon e transferidos para apenas um tubo falcon de 15 mL. Foram retirados 10 µL da solução homogênea para o procedimento de contagem do número de células viáveis da ressuspensão celular utilizando-se do método de exclusão pelo corante Azul Tripán (SCHREK, 1936). Em seguida, foi realizada a diluição apropriada em DMEM – SFB 10% (v/v) de modo a se obter uma concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL.

Para a realização do teste de invasão celular, uma alíquota de 1 mL da solução diluída foi distribuída em cada uma das lamínulas colocadas em cada orifício das placas de cultura de células de 24 orifícios (Costar).

Em seguida, os cultivos celulares foram incubados em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas para se obter uma monocamada celular em cada lamínula com confluência entre 60 a 70%.

### 5.3.2 Cultivo das células J774

O cultivo de células J774 foi realizado para o teste de fagocitose sob as mesmas condições descritas para o cultivo de células HEp-2, com apenas uma modificação: para o desprendimento das células J774 foi utilizado um *scraper*, uma vez que este tipo de célula se adere mais ao frasco de cultura que a célula HEp-2.

#### **5.4 Cultivo e preparo das amostras bacterianas**

A partir do estoque em ágar nutriente, as amostras bacterianas foram semeadas em 3 mL de caldo LB e incubadas a 37°C por 16/18 horas. Em seguida, foi medida a densidade óptica de cada crescimento bacteriano, no comprimento de onda de 600 nm, por meio do espectrofotômetro. Cada isolado crescido foi diluído em caldo LB para atingir a concentração de aproximadamente de  $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL. Esta diluição foi realizada até 15 minutos antes de cada ensaio, devido à habilidade das bactérias se multiplicarem rapidamente após este tempo.

#### **5.5 Teste de invasão quantitativo em HEp -2**

Inicialmente, foi retirado o meio de cultura das placas e foram feitas três lavagens com PBS 1X para a retirada das células que não aderiram às lamínulas. Em seguida, foram adicionados 950µL de meio DMEM – SFB 10% estéril em todos os poços. Nos poços usados como controle não se adicionou cultura bacteriana e nos poços que foram reservados para a interação da bactéria com a célula foram adicionados 50 µL de cultura bacteriana (conforme descrito no item 5.4) que foram incubadas por 30, 60, 120 e 180 minutos a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Cada amostra foi feita em triplicata.

Após cada tempo de incubação, foi retirado o meio de cultura dos poços da placa e realizadas 4 lavagens com PBS 1X para retirar as bactérias que não invadiram as células dos poços reservados para a interação da bactéria e a célula. Foi acrescentado 1 mL de meio DMEM – SFB 10% com gentamicina na concentração de 100 µg/mL, que foi incubado por 1 hora na estufa de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. O restante do meio de cultura foi retirado, seguido de outra etapa de lavagens com PBS 1X (4 vezes) para retirada das bactérias que não foram internalizadas. Após isso, foram adicionados 400µL de Triton X-100 a 1%, para que ocorresse o rompimento da membrana da célula e a placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 1,6 mL de caldo LB líquido em cada poço e foi realizada a homogeneização. De cada solução homogeneizada, foram transferidos 100 µL de cada poço para um microtubo contendo 900 µL de solução salina (0,85%) e homogeneizados. Desta solução, foram transferidos 50 µL para placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (HiMedia), que foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Ao término das 24 horas, as placas de Petri foram retiradas da estufa e se fez a contagem de colônias crescidas em cada placa.



As cepas ATCC de *Escherichia coli* e *Shigella flexneri* M90T foram utilizadas como controle positivo. Para controle negativo, foi utilizado PBS 1X para substituir a solução de cultura bacteriana.

### **5.6 Teste de invasão qualitativo em HEp-2 e J774**

O teste foi realizado conforme descrito no item 5.5, com a seguinte modificação: após o período de 1 hora, o meio DMEM – SFB 10% com gentamicina (100 µg/mL) foi descartado e realizaram-se 4 lavagens com PBS 1X para retirar as bactérias que não invadiram a célula. Em seguida, foi realizado o processo de fixação e coloração das células com a adição de 200 µL de solução fixadora Bowin por 10 minutos. Após este tempo, foi retirada a solução fixadora, realizada 4 lavagens com PBS 1X para retirar o excesso da solução e cada lamínula foi corada com 200 µL das soluções do Kit de coloração Panótico Rápido (Laboclin), sendo 45 segundos para o corante vermelho e 15 segundos para o corante azul. Imediatamente, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com água destilada para retirada do excesso de corante e fixadas em lâminas, que foram postas para secar à temperatura ambiente.

Assim como os ensaios com a célula HEp-2, os ensaios realizados com as células J774 foram realizados em duplicata, na qual uma placa de cultura era direcionada para o teste qualitativo e a segunda placa era direcionada para o teste quantitativo (HEp-2) e para extração de RNA (J774). Como controle negativo das células, foi reservada uma lamínula em cada ensaio com cada tipo de célula sem bactérias.

Para a leitura, as lâminas foram observadas em microscópio óptico, com os aumentos de 400 e 1000 vezes. Foram contadas as bactérias internalizadas de 300 células para cada membro da triplicata, perfazendo uma média de 21 campos por lamínula. Os resultados foram anotados e a média retirada. Gráficos e análises estatísticas foram feitos no programa Graphpad Prisma versão 5.

### **5.7 Extração de RNA em cultura de J774**

A extração de RNA foi realizada pelo método de Trizol® (Invitrogen, Life Technologies, USA), conforme a orientação do fabricante. Após o tempo de contato das bactérias com a célula J774, o meio foi descartado e os poços foram lavados 3 vezes com PBS 1X. Foram acrescentados 750 µL de Trizol® em cada poço e a placa foi

armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$ . No dia seguinte, fez-se a homogeneização em cada poço para que as células se desprendessem do fundo da placa e cada replicata foi transferida para um microtubo. Em cada microtubo, foram adicionados  $200\ \mu\text{L}$  de clorofórmio e homogeneizados por 15 segundos no vortex para que ocorresse o rompimento da célula. Em seguida, foi feita a centrifugação a  $12000\ \text{rpm}$  por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Após a centrifugação, a solução aquosa de cada replicata foi transferida para um novo microtubo, adicionou-se  $500\ \mu\text{L}$  de isopropanol 100% e foi homogeneizado por 15 segundos no vortex. Os microtubos foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente e ao término do tempo, a solução foi centrifugada a  $12000\ \text{x g}$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , sendo descartado o sobrenadante ao final do processo.

O pellet foi lavado com  $1\ \text{mL}$  de etanol 75%, homogeneizado no vortex e centrifugado a  $7500\ \text{x g}$  durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Novamente, se descartou o sobrenadante e foi colocado para secar o pellet de RNA retido em cada microtubo dentro do fluxo até total evaporação do etanol. Após a secagem, foram adicionados  $30\ \mu\text{L}$  de RNase-free em cada pellet, feita a ressuspensão em cada tubo e incubados a  $60^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

A análise para a pureza da extração foi realizada pela quantificação em espectrofotômetro Biodrop através dos valores obtidos pela razão 260/230 para verificar se havia resíduos do composto fenólico utilizado durante o processo de extração de RNA.

### **5.8 Transcrição do cDNA**

A síntese da fita complementar de DNA (cDNA) foi realizada conforme descrito por Guerreiro e colaboradores (2013). A transcrição do cDNA foi realizada pelo Kit High – Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, EUA), conforme a orientação do fabricante. Nos tubos com as amostras descongeladas de RNA, foram adicionados os reagentes listados na Tabela 2. Após este procedimento, foi realizada uma centrifugação breve para retirada de bolhas e a solução foi incubada em um termociclador com a seguinte configuração  $25^{\circ}\text{C}/10\text{min}$ ,  $37^{\circ}\text{C}/120\ \text{min}$ ,  $85^{\circ}\text{C}/5\ \text{min}$  e  $4^{\circ}\text{C}/\infty$ . O cDNA transcrito foi quantificado para que fosse feito o ajuste da concentração das amostras de cDNA em  $10\ \text{ng}/\mu\text{L}$ .

**Tabela 2 - Mix da Reação de Transcrição do cDNA**

Componentes	Volume
10X RT Buffer	2.0µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8µL
10X RT Random Primers	2.0µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0µL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	4.2µL
RNA	10µL
Total por Reação	20µL

### 5.9 Seleção de genes da resposta imune

Para este estudo, foram selecionados os genes IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias e que são produzidas principalmente por macrófagos ativados (MURPHY et al., 2010), para se realizar a análise da expressão gênica dos isolados clínicos selecionados.

Os genes selecionados foram utilizados da biblioteca de genes de resposta imune que se encontra no Laboratório de Imunologia Celular Aplicada à Saúde na FIOCRUZ de Rondônia, os quais têm as sequências disponíveis no banco de dados online Yenbank e estão listados na tabela abaixo:

**Tabela 3 – Sequência dos genes de resposta imune IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$** 

Gene	Sequência	Comp.	TM	Local.	Ampli. (pb)	GenBank	Primer Bank
IL-1B (Mouse)	F: GCAACTGTTTCCTGAACTCAACT	22	60.7	4-25	89	NM_008361	6680415a1
	R: ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT	21	61.4	92-72			
TNF- $\alpha$ (mouse)	F: CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	23	60.9	230-252	61	NM_013693	7305585a1
	R: GCTACGACGTGGGCTACAG	19	62.1	290-272			

A verificação da expressão gênica nas amostras foi avaliada em conjunto com o normalizador de expressão, um gene constitutivo e que deve ser expresso da mesma forma, independente da condição que o experimento for realizado. O gene selecionado para normalizador foi o GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), frequentemente utilizado como gene de controle interno para explicar diferenças entre a quantidade de RNA expressa (SCHMITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000), listado na tabela a seguir.

**Tabela 4 – Sequência do gene normalizador**

Gene	Sequência	Comp.	TM	Local.	Ampli. (pb)	GenBank	Primer Bank
GAPDH (Mouse)	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	21	62.6	8-28	123	NM_008084	6679937a1
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23	60.2	130-108			

### 5.10 PCR em Tempo Real

O procedimento de PCR em Tempo Real foi realizado por meio do equipamento Rotor-Gene Q com 72 microtubos poços contendo os reagentes listados na Tabela 5.

**Tabela 5 - Mix da reação qPCR.**

Reagente	Concentração Final
2X SYBR® Green PCR Master Mix	12,5µL
Iniciador sense (5pmol/µL)	0,5µL
Iniciador anti-sense (5pmol/µL)	0,5µL
cDNA	1,0µL
Água Milli Q	10,5µL

Cada reação continha 25 µL finais e a ciclagem foi utilizada conforme instruções do fabricante. A desnaturação inicial foi de 95°C durante 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto.

### 5.11 Análises dos dados do PCR em tempo real

O método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  foi utilizado para se obter uma quantificação relativa dos dados obtidos por meio da PCR real time. Este método permite que os níveis de expressão gênica relativos possam ser calculados entre as condições de tratamentos as quais as amostras foram submetidas. A partir do ciclo limiar (cT) gerados pelo sistema foi realizada a quantificação relativa, no qual o valor normalizado para  $\Delta\Delta CT$  foi a diferença entre o ciclo limiar dos genes-alvo e do gene de referência da célula J774.

Os dados foram apresentados usando mapas de calor (Heatmaps) em 2D para demonstrar a intensidade de expressão, gerados pelo programa BioVinci versão 1.1.5 desenvolvido por BioTuring Inc. (San Diego, Califórnia, EUA).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o potencial inflamatório de dois isolados clínicos provenientes de crianças com diarreia em Manaus. Estes isolados de *Shigella* têm sido extensivamente estudados pelo grupo DCDIA como potenciais alvos vacinais ou de probióticos. Desde o ano de 2007, temos caracterização de virulência por PCR (CRUZ et al., 2014), expressão gênica in vivo (SERRA, 2013), expressão gênica dos genes de virulência (BARROS, 2016), polimorfismo dos genes ipaH (DANTAS, 2016), sequenciamento dos sistemas de secreção (VERÇOSA, 2018) e proteoma em mimetização de contato (BATALHA, 2019). Todos estes resultados direcionam a continuação na caracterização dos isolados de *Shigella flexneri* 201 e *S. boydii* 183, os isolados clínicos de *Shigella* alvos do atual estudo.

### 6.1 Teste de invasão celular com a linhagem HEp-2

Alguns estudos como o de Pupo e colaboradores (2000) apontaram, através de análises filogenéticas que a *Shigella* tem uma possível ancestralidade com a bactéria *Escherichia coli*, uma vez que diferentes cepas de *Shigella* foram originadas inúmeras vezes de diferentes ramos de *Escherichia coli*. Os dois patógenos possuem um sistema de secreção do tipo III (SST3), um plasmídeo de virulência que possibilita a codificação de proteínas que dão características invasivas para estas cepas (BLIVEN; MAURELLI, 2012; DI MARTINO et al., 2013). No entanto, a habilidade de disseminação de EIEC é menor que *Shigella* facilitando o controle da patogênese pelo sistema imune (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Por isso, para fins de comparação, neste estudo decidimos manter, não só a cepa padrão de *Shigella flexneri* 5a M90T, como também a cepa padrão de EIEC.

O teste de invasão celular em célula HEp-2 foi realizado com os dois isolados clínicos SB183 e SF201 nos intervalos de tempo de 30, 60, 120 e 180 minutos. Apesar de seguir como base o experimento dos estudos de Francis e colaboradores (1991) e Omid e colaboradores (2017) que realizaram seus experimentos em 2 horas somente, optou-se por estes tempos para que fosse possível avaliar a capacidade invasiva de cada cepa de forma contínua para observar se existiam diferenças entre as mesmas. O teste de invasão divide-se em qualitativo e quantitativo. No ensaio qualitativo, foi possível observar que a invasão iniciou no período de 30 minutos para todos os isolados de

*Shigella* (SB183 e SF201), seguindo o resultado encontrado na cepa padrão M90T (Figuras 6 e 7)

Para EIEC, no entanto, a invasão qualitativa iniciou em 120 minutos, não sendo observadas células com vacúolo endocítico até este período (Figura 6). Moreno e colaboradores (2009) observaram que a EIEC, durante os tempos de contato com a célula Caco-2 (células do epitélio intestinal humano), expressava menor quantidade de genes de virulência que a *Shigella flexneri*, dentre os quais estavam os genes *virF* responsável por ativar a transcrição do gene regulador *virB*, e este por sua vez ativa os promotores de transcrição de invasinas (*ipa*), *Mxi* e *Spa*, responsáveis por codificar sistema de secreção do tipo III (KANE et al., 2002) ocasionando um processo de invasão celular mais lento de EIEC.

No ensaio quantitativo, foram realizados dois procedimentos distintos: a contagem de bactérias internalizadas por meio de visualização no microscópio em 300 células e outra contagem feita após o rompimento celular. Em um total de 300 células por triplicata, verificou-se a quantidade de bactérias invasoras (Gráfico 1).

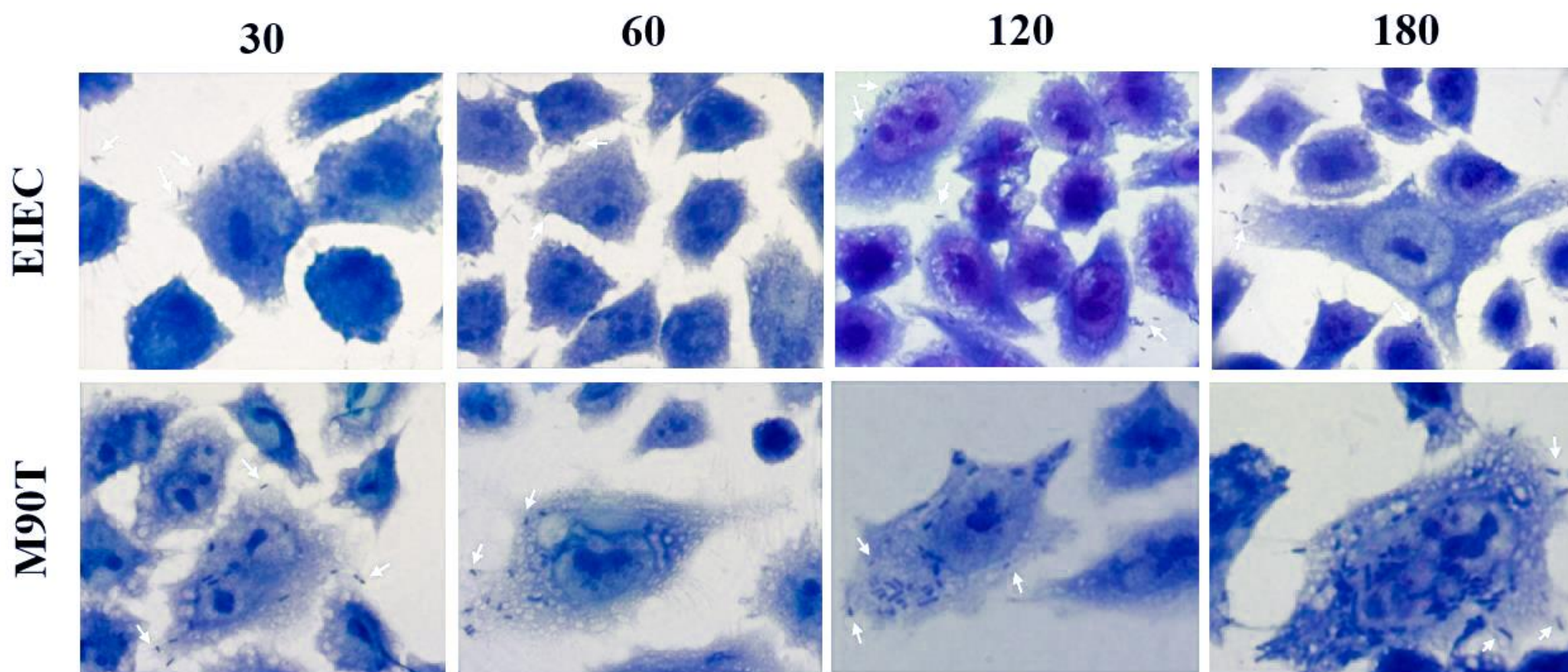


Figura 6: Ensaio de invasão em célula Hep-2 com padrão de *Shigella flexneri* 5a M90T (ATCC 12022-152) e *E. coli* enteroinvasora EIEC (ATCC 1381), nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos. Setas brancas evidenciam a presença bacteriana e invasão.



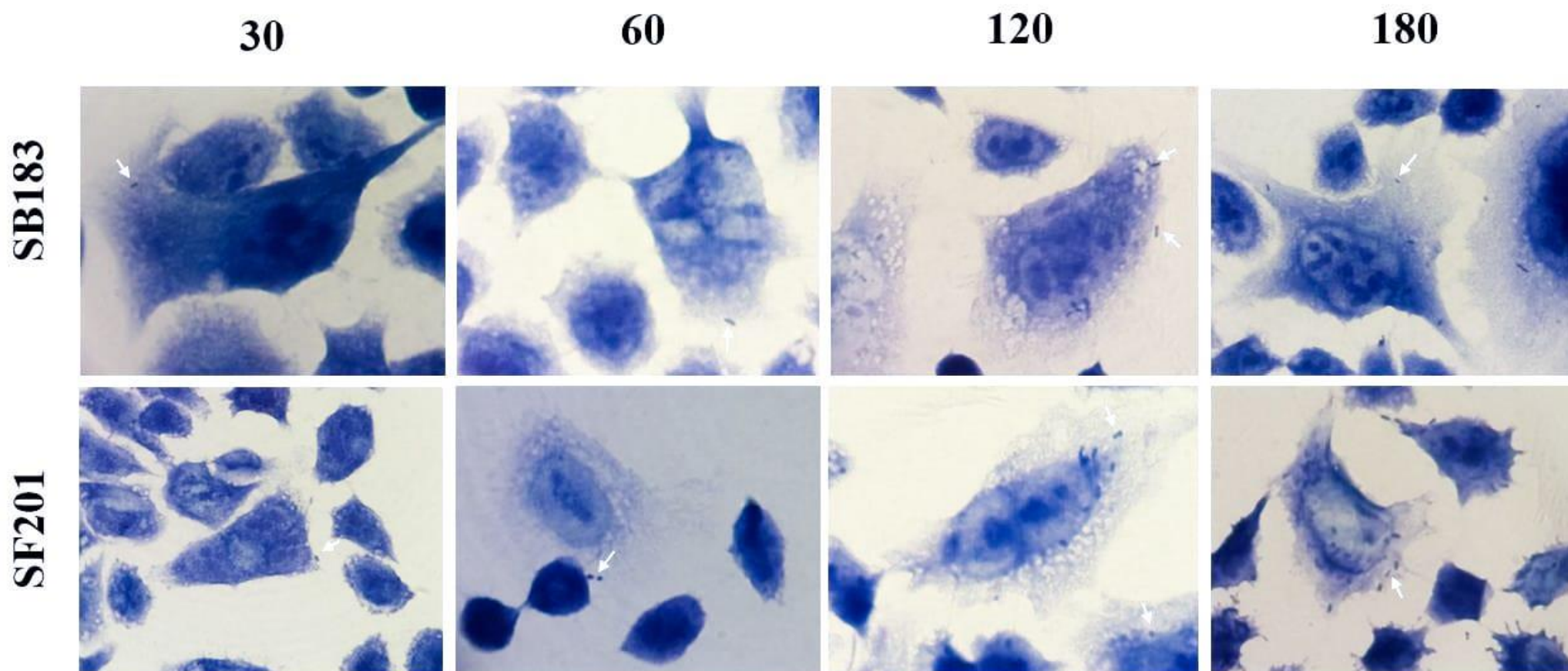
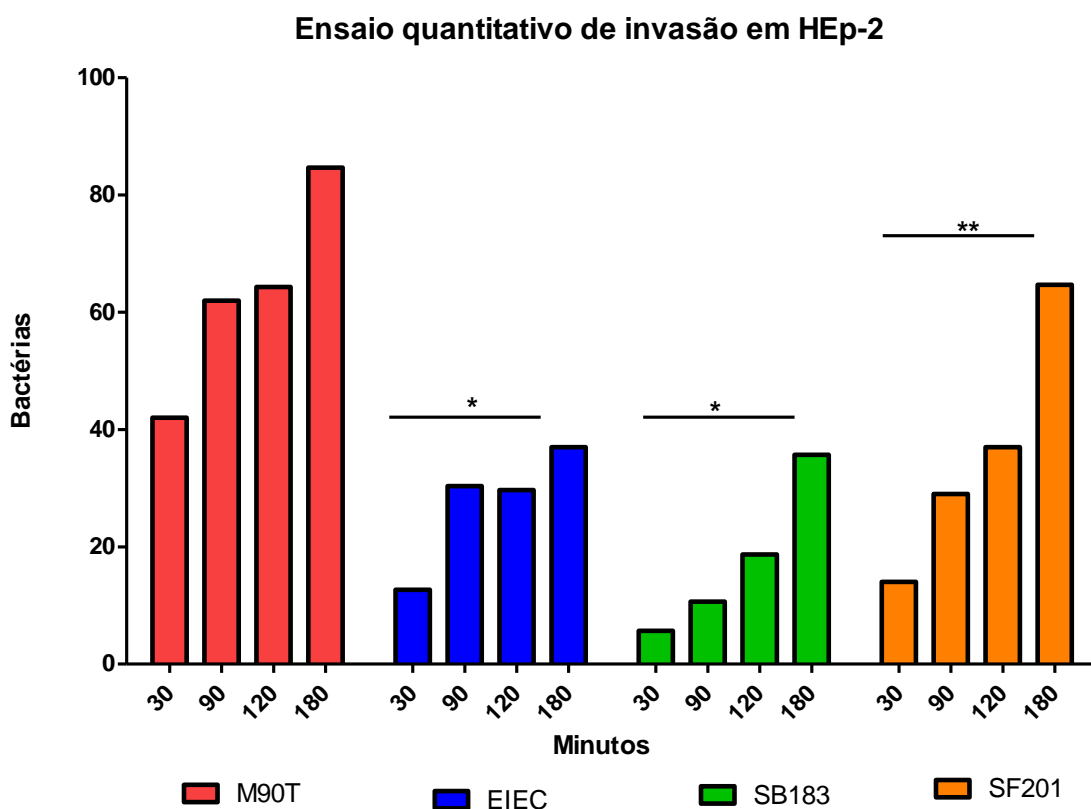


Figura 7: Ensaio de invasão em célula Hep-2 com isolados clínicos *Shigella boydii* 183 (SB183) e *Shigella flexneri* 201 (SF201), nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos. Setas brancas evidenciam a presença bacteriana e invasão.



Dentre todos os intervalos de tempo estudados, a cepa padrão M90T foi a única que apresentou correlação significativa com as demais amostras, sendo  $P < 0.05$  para a relação entre M90T e EIEC,  $P < 0.05$  para M90T e SB184 e  $P < 0.01$  para M90T e SF201 (Gráfico 1). De modo geral, as amostras apresentaram um aumento de concentração de bactérias internalizadas com o decorrer do tempo, sendo o pico em 180 minutos. A M90T teve as maiores taxas de internalização em todos os tempos, seguida da SB201. EIEC e SB183 tiveram perfis similares.



**Gráfico 1: Ensaio semi-quantitativo com células HEp-2. Teste estatístico T-test. Todos os intervalos de tempo apresentam relação significativa com o padrão de *Shigella* M90T. \*  $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$**

Além da contagem de bactérias internalizadas por meio de visualização no microscópio, foi realizado o rompimento da membrana celular para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em ágar Mueller Hinton. Os resultados deste ensaio encontram-se no Gráfico 2.

Da mesma forma que no microscópio, as amostras apresentaram um aumento de concentração de bactérias internalizadas com o decorrer do tempo, a exceção da EIEC e SB183, cujo pico de invasão ocorreu em 120 minutos. A M90T teve as maiores taxas de internalização em todos os tempos, seguida da SB201. Os intervalos de tempo

do padrão M90T apresentaram correlação estatística com o isolado SF201 ( $P < 0.05$ ) e a EIEC com o isolado SB183 (Gráfico 2).

Nos trabalhos realizados por Francis e colaboradores (1991), Omid e colaboradores (2017) e Moreno e colaboradores (2009), investigando processos diferentes da patogênese de *Shigella*, demonstraram que ocorre um aumento do número de unidades formadoras de colônias conforme o tempo decorria sendo compatível com os resultados deste estudo.

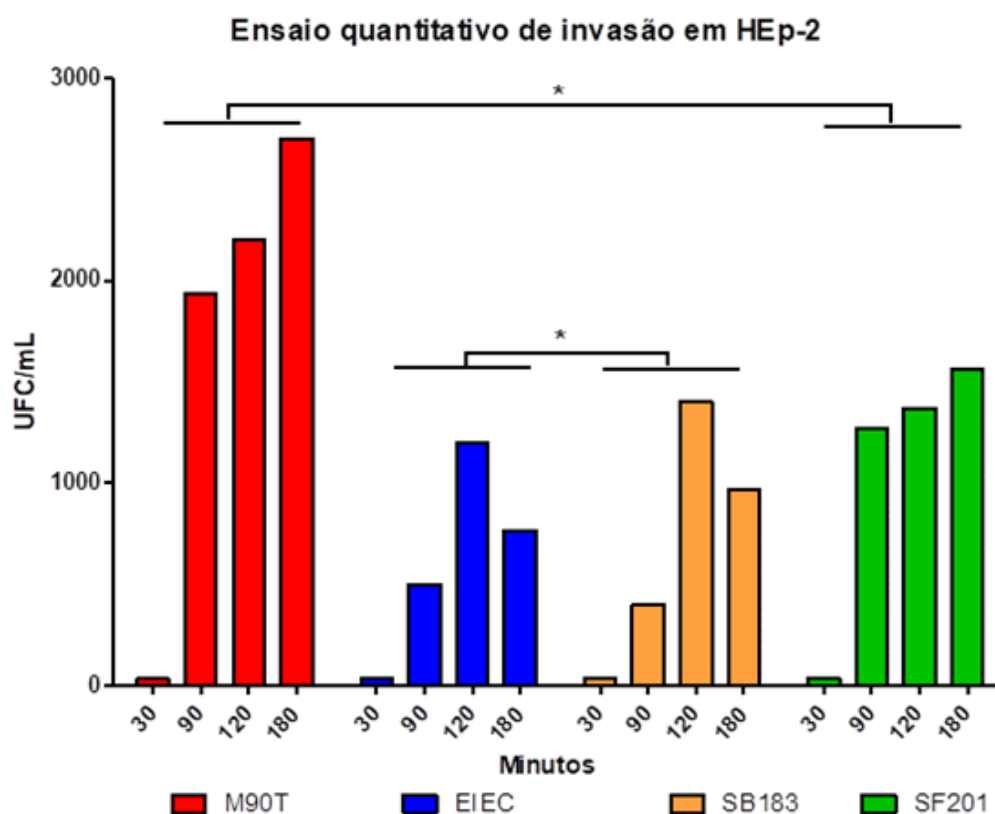


Gráfico 2: Ensaio quantitativo com células HEp-2 de UFC/mÇ. Teste estatístico T-test \*  $P < 0.05$

## 6.2 Teste de fagocitose celular com a linhagem J774

O teste de fagocitose qualitativo possibilitou observar a capacidade fagocítica da célula J774 por meio da visualização das bactérias internalizadas e rompimento do macrófago, conforme o período de tempo progredia (Figura 8 e Figura 9).

Uma das principais células do sistema imune para eliminação de patógenos é o macrófago que tem capacidade de englobar e eliminar bactérias ao mesmo tempo em que ativa a resposta do sistema imune. Na shigelose, o macrófago é o primeiro

obstáculo a ser encontrado pela bactéria, que ao translocar as células M são fagocitadas por macrófagos residentes. Para prosseguir com a invasão de enterócitos, as *Shigellas* precisam escapar do fagossomo e ter tempo para se direcionar para o citoplasma ou invadir as células epiteliais vizinhas antes que o sistema imune seja ativado e a resposta inflamatória não permita sua disseminação (SANSONETTI, 2001).

Neste ensaio foi observado que, conforme o tempo de contato foi aumentando, o número de macrófagos visíveis por campo diminuiu para todas as amostras testadas (Figura 8 e Figura 9).

A *Shigella* e a EIEC possuem uma maquinaria que permite a liberação de proteínas efetoras que atuam na membrana do macrófago rompendo a sua estrutura e que permite a bactéria adentrar para o citoplasma ou interior de outra célula (SANSONETTI, 2001). Ensaio realizado por Moreno, Martinez & Moreira-Filho (2010) demonstraram que as taxas de morte de macrófago por EIEC e *Shigella flexneri* são opostas. No tempo de infecção de duas horas, a *Shigella flexneri* demonstrou ser mais eficiente no processo de morte celular com 50% de macrófagos a menos do que EIEC. Nossos resultados foram compatíveis com os citados anteriormente, sendo facilmente visível a diminuição de células J774 por meio do microscópio.

Em um estudo de Nonaka e colaboradores (2003) foi demonstrado que linhagens semelhantes a macrófago infectadas com o isolado de *S. flexneri* YSH6000 sofriam morte celular devido a rápida indução de necrose, que tem um mecanismo mediado por uma formação de poro na membrana das células hospedeiras dependente dos genes de virulência ipaABCD. Estas observações apontam a habilidade de *Shigella* de matar células hospedeiras, comandando sua maquinaria e levando a necrose, papel essencial na infecção, sobrevivência e escape de respostas imunes.

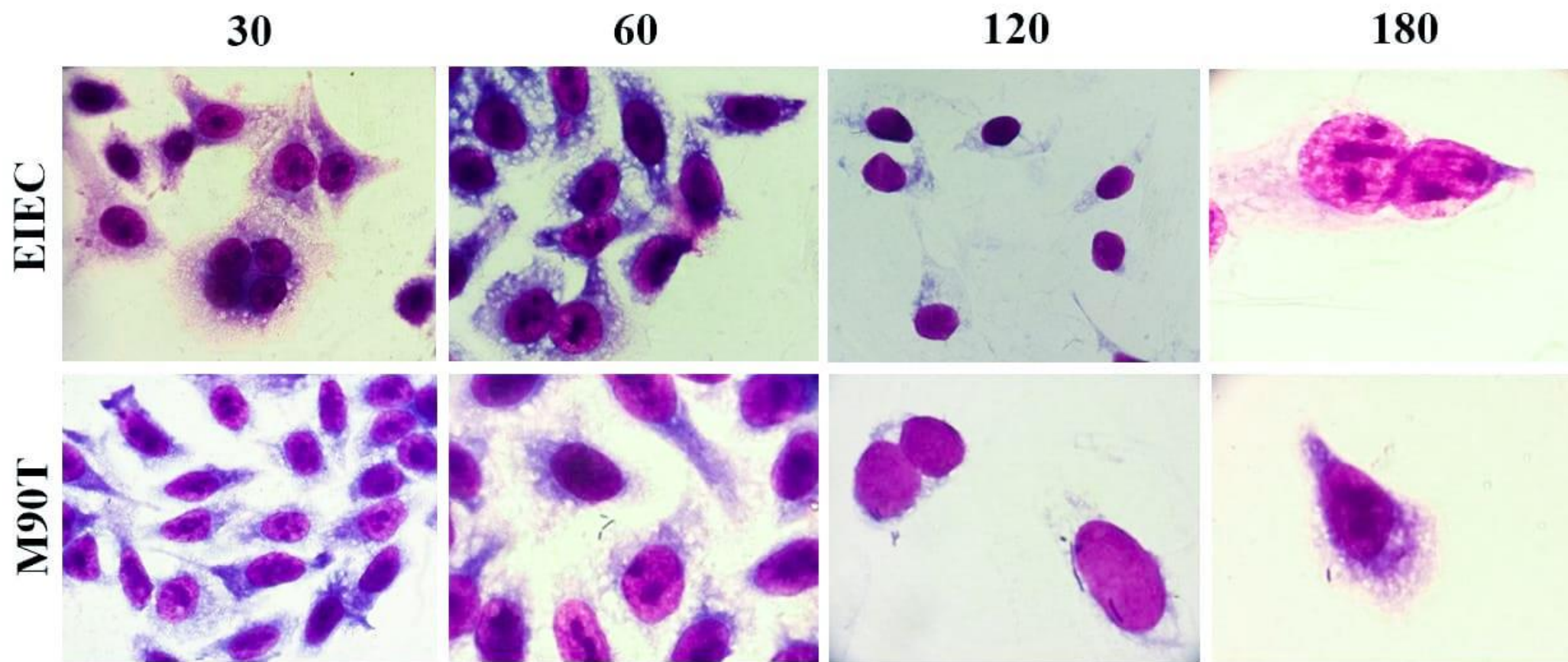


Figura 8: Ensaio de fagocitose em macrófago J774 com padrão de *Shigella flexneri* 5a M90T (ATCC 12022-152) e *E. coli* enteroinvasora EIEC (ATCC 1381), nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos.

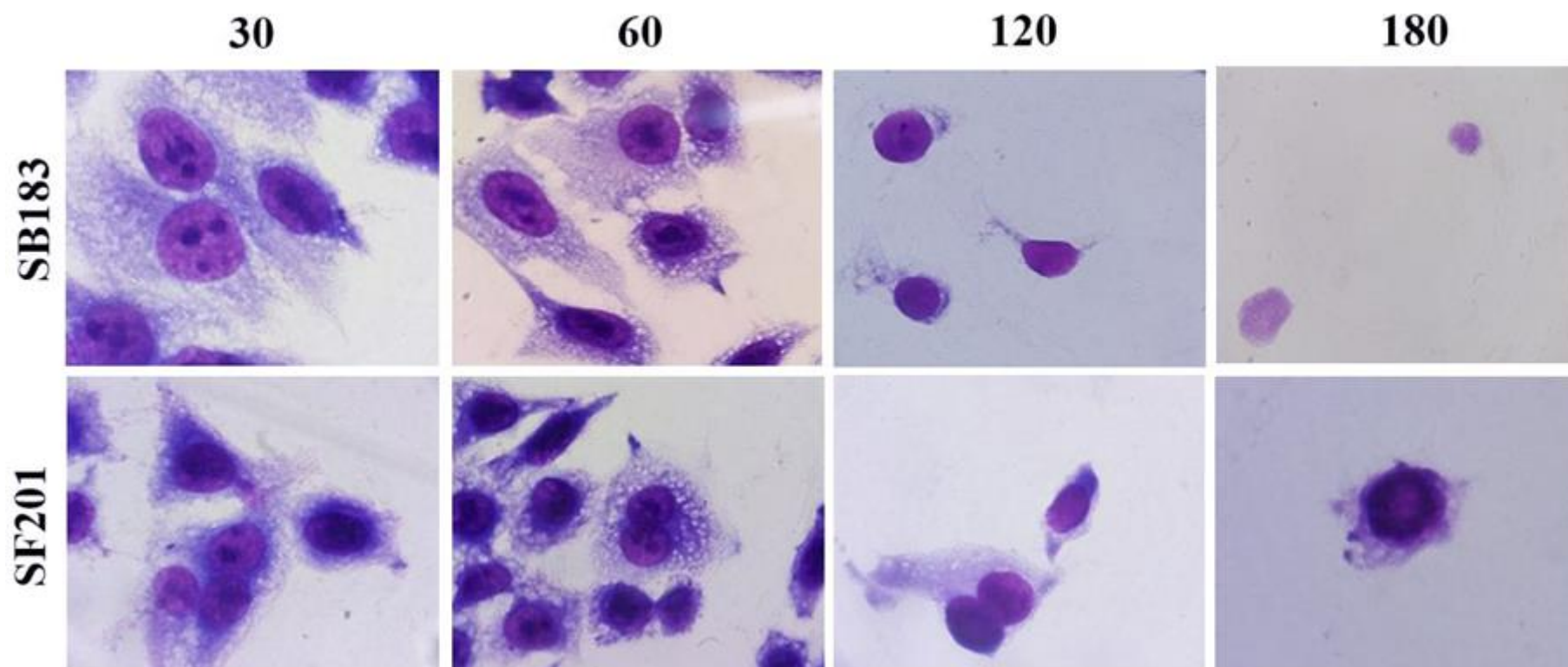


Figura 9: Ensaio de fagocitose em macrófago J774 com isolados clínicos *Shigella boydii* 183 (SB183) e *Shigella flexneri* 201 (SF201), nos tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos.

### 6.3 Expressão gênica de mediadores inflamatórios de macrófago (J774) frente aos isolados de *Shigella*

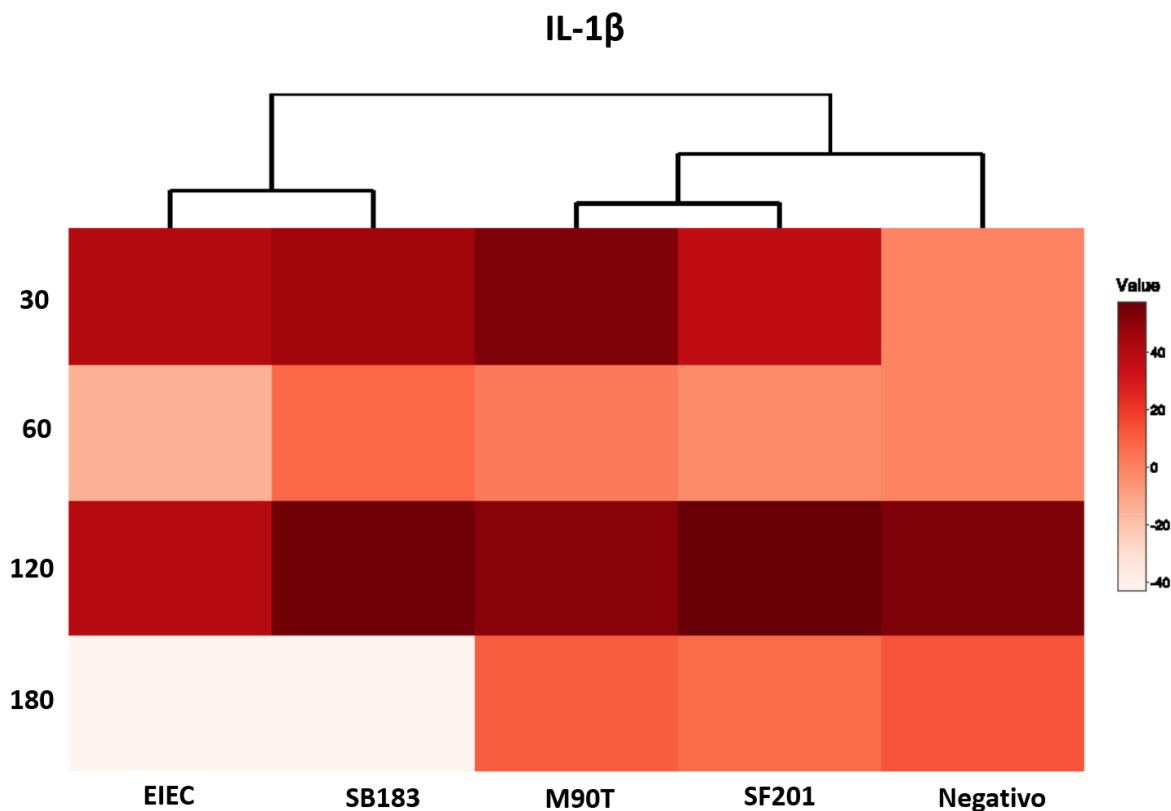
Foi realizada a extração de RNA da cultura celular da linhagem de macrófago murino J774 após os intervalos de tempo de 30, 60, 120 e 180 minutos. Após a extração, foi realizada a quantificação de RNA em equipamento Biodrop para verificar a pureza da amostra. Todas as extrações encontravam-se na faixa de 1,5 a 1,8 na razão 260/230. Após esta confirmação, foi realizada a construção do cDNA e realizada a PCR em tempo real.

Os genes selecionados para este estudo foram IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Estes genes são considerados pró-inflamatórios, uma vez que são expressos pelo macrófago. A invasão por *Shigella* regula várias citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  e IL-18 (YANG et al., 2014) responsáveis pela indução de uma resposta imune. Estes sinais liberados por macrófagos e a ruptura de células epiteliais levam ao recrutamento de neutrófilos que também parecem ser dependentes das invasinas tipo ipa (RENESTO; MOUNIER; SANSONETTI, 1996). Estas células são essenciais para a característica de dano tecidual severo da shigelose uma vez que é causada pela necrose mediada pelas proteínas ipaB e ipaC (FRANÇOIS et al., 2000; MANDIC-MULEC; WEISS; ZYCHLINSKY, 1997). Os resultados da PCR em tempo real foram normalizados com o gene housekeeping GAPDH e o  $\Delta\Delta CT$  calculado. Os resultados da expressão foram dispostos em um mapa de calor para melhor visualização (Gráfico 3 e Gráfico 4).

Para o gene IL-1 $\beta$ , as amostras agruparam-se em dois clusters. A EIEC e a *Shigella* SB183 agruparam-se num cluster único, enquanto a M90T e a *Shigella* SF201 agruparam-se num subcluster, juntamente com o controle negativo. Para todas as amostras, as maiores taxas de expressão de IL-1 $\beta$  ocorreram nos períodos de 30 e 120 minutos (Gráfico 3).

Para a expressão de IL-1 $\beta$  por macrófagos em *Shigella flexneri*, é necessária uma ativação anterior de caspase-1, pois esta cliva IL-1 $\beta$ . Camundongos knockout para caspase-1 falharam na produção de IL-1 $\beta$  (LI et al., 1995). Em um estudo sobre a ativação de caspase-1 em macrófagos demonstrou que um isolado selvagem de *S. flexneri* realizou a ativação de pro-IL-1 $\beta$  em sua forma de 18 kDa logo após 30 minutos de contato. Presença ou ausência de plasmídeo de virulência não afetou esta primeira

ativação, sendo a expressão induzida por LPS (SCHROEDER; JANN; HILBI, 2007). Este fato também foi observado neste estudo, onde todos os isolados e o controle apresentaram expressão após 30 minutos, mas não o controle negativo (Gráfico 3).



**Gráfico 3:** Mapa de calor dos valores de  $\Delta\Delta CT$  para IL-1 $\beta$ . Quanto mais próximo de branco a expressão é negativa; quanto mais aumenta a escala de vermelho, mais alta a expressão positiva.

Apesar de a EIEC expressar os mesmos genes de virulência que *Shigella*, a dose infecciosa necessária para causar é 3 vezes maior (106 para EIEC contra 102 para *Shigella*) e a infecção parece ser mais branda, sugerindo uma diferença entre modulação do hospedeiro (PASQUA et al., 2017).

Estudos de Moreno & Martinez & Moreira-Filho (2010) comparando infecções de EIEC e *Shigella flexneri* em macrófago J774 demonstraram que a *S. flexneri* realiza a morte de macrófagos mais rapidamente e intensamente que a EIEC.

Para o isolado SB183 e EIEC após 180 minutos houve uma baixa regulação da IL-1 $\beta$  (Gráfico 3). Este dado, somado a menor capacidade invasiva demonstrado no ensaio quantitativo de invasão em célula HEP-2 (Gráfico 4), com uma associação positiva entre a SB183 e a EIEC de  $P < 0.05$ , sugere uma progressão mais lenta na interação com macrófagos para ambas estas bactérias.

Para TNF- $\alpha$ , as amostras agruparam-se em dois clusters. A EIEC e a *Shigella* SB183 agruparam-se num subcluster, juntamente com a *Shigella* M90T, enquanto *Shigella* SF201 agrupou-se em um cluster único com o controle negativo (Gráfico 4).

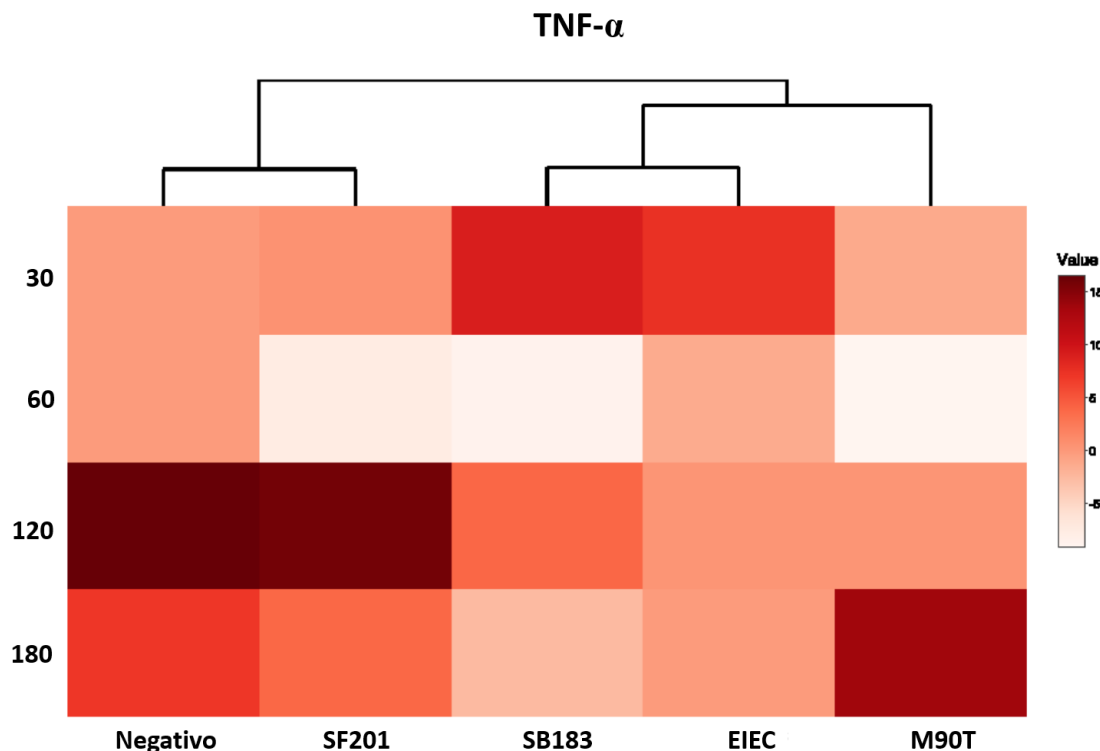


Gráfico 4: Mapa de calor dos valores de  $\Delta\Delta CT$  para TNF- $\alpha$ . Quanto mais próximo de branco a expressão é negativa; quanto mais aumenta a escala de vermelho, mais alta a expressão positiva.

As amostras SB183 e EIEC provocaram uma alta regulação da expressão de TNF- $\alpha$  logo no início da invasão (30 minutos), porém após este período, a expressão desta citocina manteve-se próximo de zero.

As citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  são multifuncionais com muitas possíveis fontes, sendo produzidas por macrófagos nos estágios primários da resposta antimicrobiana (AKIRA et al., 2018; SCHNUPF; SANSONETTI, 2012). Uma das maneiras de realizar o *clearance* bacteriano por macrófagos ocorre pela produção de óxido nítrico, presente nos vacúolos fagocíticos. O óxido nítrico sintetase (NOS) é produzido por células fagocíticas como macrófagos, monócitos e neutrófilos, é ativado por um primeiro sinal de IFN- $\gamma$ , podendo ter o TNF- $\alpha$  como segundo sinal (JENNISON; VERMA, 2004; PHALIPON; SANSONETTI, 2007).

A M90T, que se agrupou com SB183 e EIEC para a expressão de TNF- $\alpha$ , também apresentou uma baixa expressão em todos os intervalos de tempo, a exceção de



180 minutos onde houve uma alta expressão desta citocina. Nosso estudo abrangeu os tempos de 30, 60, 120 e 180 minutos, ocorrendo expressão visível de TNF- $\alpha$  apenas a partir de 180 minutos (3h), ainda com expressão aproximada de  $\Delta\Delta$ CT 13. Em estudos de Moreno, Martinez & Moreira-Filho (2010) em macrófagos J774 com *Shigella* e EIEC foi demonstrado que a indução de TNF, IL-1 e IL-10 ocorreu apenas após 6h de infecção, no entanto, sem diferenças significativas na expressão de citocinas destas duas bactérias. Estudos de Sanchez-Villamil, Tapia-Pastrana & Navarro-Garcia (2016) também não apontou diferença entre a cinética de liberação das citocinas IL-8 e TNF- $\alpha$  para *Shigella* e EIEC.

A associação entre TNF- $\alpha$  e produção de óxido nítrico (NOS) pelo macrófago explica esta ausência de expressão de TNF- $\alpha$  ou sua expressão tardia, uma vez que o NOS está associado ao *clearance* bacteriano pela fagocitose. As crescentes taxas de UFC com a progressão temporal (Gráfico 4) associada com o decréscimo de macrófagos por campo (Figura 8 e Figura 9), sugerem o sucesso dos isolados em promover a necrose do macrófago, com baixo *clearance* bacteriano. Uma análise com o período maior de tempo seria necessária para confirmar este comportamento.

O segundo cluster abrangeu a SF201 e o controle negativo. Ambos tiveram uma expressão gênica similar, sugerindo que a SF201 não influenciou na expressão basal de TNF- $\alpha$  pelo macrófago. Em ambas as citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  a expressão gênica pelo macrófago quando em contato com a bactéria SF201 manteve-se similar ou associada ao controle negativo. Isto, aliada as altas taxas de invasão evidenciadas neste estudo, é um dado importante pois sugere um não reconhecimento pelo macrófago da presença desta bactéria ou uma modulação na maquinaria proteica desta célula pela SF201 ao seu favor. Como já é descrito na literatura, a *Shigella* após ser internalizada, realiza o escape do vacúolo fagocítico dependente do sistema de secreção tipo III. Os mecanismos pelo qual a *S. flexneri* e a EIEC manipulam o ambiente intestinal do hospedeiro são diferentes, sugerindo que existem genes específicos atuando em cada caso e um diferente final no curso da infecção por cada bactéria (UDDIN; WAHID, 2014). A manipulação do hospedeiro pela *Shigella* para passar imperceptível pode justificar este comportamento. Esta tendência também foi acompanhada pelo padrão M90T para IL1- $\beta$ , mas não para TNF- $\alpha$ . Estudos adicionais sobre a expressão de genes de virulência da SF201 em macrófago J774 são necessários para confirmar esta tendência.

O ponto chave para a invasão epitelial de *Shigella* e EIEC encontra-se na habilidade de escape de macrófagos e indução de morte dependente de caspase-1. Atualmente, sabe-se que a EIEC é menos eficiente em promover a morte de macrófagos nas primeiras 4h de infecção (MORENO; MARTINEZ; MOREIRA-FILHO, 2010) provavelmente pela modulação de seus genes de virulência. Quanto a expressão de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, e IL-10), Moreno, Martinez & Moreira-Filho (2010) não encontraram diferenças para a linhagem J774, porém em outros estudos foi observada uma maior expressão para *Shigella* com a linhagem celular THP-1 (PASQUA et al., 2017; SANCHEZ-VILLAMIL; TAPIA-PASTRANA; NAVARRO-GARCIA, 2016).

Uma vez que muitos estudos são feitos com bactérias padrões, aqui nós evidenciamos dois isolados clínicos de crianças com diarreia da Manaus, AM.

A SB183 é uma *Shigella* da espécie *boydii*, descrita como responsável pelos menores números de casos de shigelose (1-2%) dos números totais e confinada ao continente indiano, motivos pelo qual pouco se sabe sobre a sua virulência (MATTOCK; BLOCKER, 2017). Apesar disso, estudos realizados pelo grupo DCDIA com o sequenciamento completo desta bactéria, revelou a presença de sistemas de secreção adicionais. Além do sistema de secreção tipo III (SST3), necessário para o fenótipo invasivo, a SB183 possui o sistema de secreção tipo IV (SST6), de nicho ocupacional (VERÇOSA, 2018). Esta variação pode estar relacionada com a possível adaptabilidade desta bactéria a flora comensal do estômago, principalmente porque a SB183 foi isolada de uma criança co-infetada com rotavírus, sendo o vírus entérico a causa da diarreia.

Isto, somado a correlação entre as taxas de invasão em Hep-2 (Gráfico 4) e expressão de ambas IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  de forma similar entre SB183 e EIEC, sugere um padrão de invasão e escape do macrófago com uma progressão mais lenta e infecção mais branda, similar ao encontrado em EIEC.

Para a expressão de TNF- $\alpha$ , como a SB183 tem demonstrado um comportamento similar a EIEC e estudos de Moreno, Martinez & Moreira-Filho (2010) demonstram uma expressão em apenas 6h de contato acreditamos que mais tempo seria necessário para ocorrer a expressão de TNF- $\alpha$ , uma vez que nossos dados sugerem uma progressão lenta de infecção deste isolado.

A SF201 é uma *Shigella* da espécie *flexneri*, a mais frequente em países em desenvolvimento no mundo todo (MATTOCK; BLOCKER, 2017). O plasmídeo de virulência de *Shigella* foi descoberto em uma *flexneri*, a *S. flexneri* 5a M90T, utilizada como padrão neste estudo. O perfil de expressão gênica associado ao controle negativo, apesar das altas taxas de invasão, sugere a habilidade deste isolado em manipular o macrófago em determinados pontos da infecção.

Ambas, SF201 e SB183, possuem grande potencial ainda não explorado. Investigações mais profundas são necessárias para elucidar as diferenças entre a manipulação do hospedeiro e os fatores de virulência envolvidos nestas duas amostras.

## 7 CONCLUSÕES

- No ensaio qualitativo de invasão em célula HEP-2, foi possível observar que a invasão iniciou no período de 30 minutos para os isolados de *Shigella* SB183, SF201 e para o padrão M90T. Para EIEC, no entanto, a invasão qualitativa iniciou em 120 minutos, não sendo observadas bactérias com vacúolo endocítico até este período;
- No ensaio quantitativo de invasão em célula HEP-2, contagem no microscópio ótico, as amostras apresentaram um aumento de concentração de bactérias internalizadas com o decorrer do tempo, sendo o pico em 180 minutos. A M90T teve as maiores taxas de internalização em todos os tempos, seguida da SB201. EIEC e SB183 tiveram perfis similares. A cepa padrão M90T foi a única que apresentou correlação significativa com as demais amostras;
- No ensaio qualitativo de invasão em célula HEP-2, contagem de UFC/mL, as amostras apresentaram um aumento de concentração de bactérias internalizadas com o decorrer do tempo, a exceção da EIEC e SB183, cujo o pico de invasão ocorreu em 120 minutos. A M90T teve as maiores taxas de internalização em todos os tempos, seguida da SB201. Os intervalos de tempo do padrão M90T apresentaram correlação estatística com o isolado SF201 ( $P < 0.05$ ) e a EIEC com o isolado SB183 ( $P < 0.05$ );
- No ensaio qualitativo de fagocitose por macrófago J774, conforme o tempo de contato foi aumentando, o número de macrófagos visíveis por campo diminuiu para todas as amostras testadas;
- As maiores taxas de expressão de IL-1 $\beta$  ocorreram nos períodos de 30 e 120 minutos. Esta ativação imediata para todas as amostras após o contato sugere uma resposta ao LPS bacteriano, não a fatores de virulência da bactéria;

- Para o gene IL-1 $\beta$ , a EIEC e a *Shigella* SB183 agruparam-se num cluster único, ocorrendo uma baixa regulação da IL-1 $\beta$  após 180 minutos. Este dado sugere uma progressão mais lenta na interação com macrófagos para ambas estas bactérias;
- Para TNF- $\alpha$ , a EIEC e a *Shigella* SB183 agruparam-se num subcluster, juntamente com a *Shigella* M90T, ocorrendo expressão visível de TNF-  $\alpha$  apenas a partir de 3h para M90T. Uma vez que TNF-  $\alpha$  está associado a produção de óxido nítrico (NOS) no macrófago e o *clearance* bacteriano, as crescentes taxas de UFC com a progressão temporal, associada com o decréscimo de macrófagos por campo, sugerem o sucesso dos isolados em promover a necrose do macrófago, com baixo *clearance* bacteriano;
- Para TNF- $\alpha$ , a *Shigella* SF201 agrupou-se em um cluster único com o controle negativo. Ambos tiveram uma expressão gênica similar, sugerindo que a SF201 não influenciou na expressão basal de TNF- $\alpha$  pelo macrófago;
- As associações encontradas neste estudo com SB183 e EIEC - correlação entre as taxas de invasão em Hep-2 e expressão de ambas IL1- $\beta$  e TNF- $\alpha$  de forma similar – sugerem um padrão de invasão e escape do macrófago com uma progressão mais lenta e infecção mais branda para SB183, similar ao encontrado em EIEC;
- Para a SF201, o perfil de expressão gênica associado ao controle negativo, apesar das altas taxas de invasão, sugere a habilidade deste isolado em manipular o macrófago em determinados pontos da infecção;

Ambas, SF201 e SB183 possuem grande potencial ainda não explorado. Investigações mais profundas são necessárias para elucidar as diferenças entre a manipulação do hospedeiro e os fatores de virulência envolvidos nestas duas amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAISSE, H. Molecular and Cellular Mechanisms of *Shigella flexneri* Dissemination. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. March, p. 1–10, 2016.
- AKIRA, S. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL6 and related molecules (IL1 and TNF). **The FASEB Journal**, v. 5, n. 1, p. 2860–2867, 2018.
- AL-HASANI, K. et al. The sigA gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri 2a* encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2457–2463, 2000.
- ANDERSON, M.; SANSONETTI, P. J.; MARTEYN, B. S. *Shigella* Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. April, p. 1–9, 2016.
- ASHIDA, H.; KIM, M.; SASAKAWA, C. Manipulation of the host cell death pathway by *Shigella*. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 1757–1766, 2014.
- BARROS, A. P. M. **Expressão gênica dos fatores de virulência de amostras clínicas de *Shigella* em modelo experimental murino.** [s.l: s.n.].
- BASTOS, F. C.; 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.
- BATALHA, F. DE A. **ANÁLISE PROTEÔMICA DO PERFIL DE VIRULÊNCIA DE CEPA CLÍNICA DE *Shigella flexneri* ISOLADA EM MANAUS - AM.** [s.l: s.n.].
- BERNARDINI, M. L. et al. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 10, p. 3867–3871, 1989.
- BLIVEN, K. A.; MAURELLI, A. T. Antivirulence genes: Insights into pathogen evolution through gene loss. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 12, p. 4061–4070, 2012.
- CRUZ, C. B. N. DA et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- DANTAS, P. I. DE S. **Variabilidade genética dos principais fatores de virulência em amostras Clínicas de *Shigella flexneri*.** [s.l: s.n.].
- DEKKER, J. P.; FRANK, K. M. *Salmonella, Shigella, and Yersinia.* **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 35, n. 2, p. 225–246, 2015.

DI MARTINO, M. L. et al. Molecular evolution of the nicotinic acid requirement within the *Shigella*/EIEC pathotype. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 8, p. 651–661, 2013.

FISCHER WALKER, C. L. et al. Diarrhea incidence in low- and middle-income countries in 1990 and 2010: a systematic review. **BMC Public Health**, v. 12, n. 1, 2012.

FRANCIS, C. L. et al. Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 with mammalian cells in vitro. **Journal of Infectious Diseases**, v. 164, n. 4, p. 693–703, 1991.

FRANÇOIS, M. et al. 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.

GUERREIRO, L. T. A. et al. Gene Expression Profiling Specifies Chemokine, Mitochondrial and Lipid Metabolism Signatures in Leprosy. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013. 51

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

HIGH, N. et al. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 5, p. 1991–1999, 1992.

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

JENSEN, V. B.; HARTY, J. T.; 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.

KANE, C. D. et al. MxiE regulates intracellular expression of factors secreted by the *Shigella flexneri* 2a type III secretion system. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4409–4419, 2002.

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

KOTLOFF, KAREN L. et al. Shigellosis. **The Lancet**, p. 1–12, 2017.

LAMPEL, K. A.; FORMAL, S. B.; MAURELLI, A. T. A Brief History of *Shigella*. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

LI, P. et al. Mice deficient in IL-1 $\beta$ -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 $\beta$  and resistant to endotoxic shock. **Cell**, v. 80, p. 401–411, 1995.

LIMA, I. F. N.; HAVT, A.; LIMA, A. A. M. Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 30–37, 2015.

LIU, L. et al. Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. **The Lancet**, v. 379, n. 9832, p. 2151–2161, 2012.

LIVIO, S. et al. *Shigella* isolates from the global enteric multicenter study inform vaccine development. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 7, p. 933–941, 2014.

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.

MARTEYN, B. S.; GAZI, A. D.; SANSONETTI, P. J. *Shigella*: A model of virulence regulation in vivo. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 104–120, 2012.

MATTOCK, E.; BLOCKER, A. J. How Do the Virulence Factors of *Shigella* Work Together to Cause Disease? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. March, p. 1–24, 2017.

MORENO, A. R. M.; MARTINEZ, M. B.; MOREIRA-FILHO, C. A. Expression of bacterial virulence factors and cytokines during in vitro macrophage infection by enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: A comparative study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 6, p. 786–791, 2010.

MURPHY, K. et al. **Imunobiologia by Janeway**. [s.l: s.n.].  
NIU, C. et al. Role of the virulence plasmid in acid resistance of *Shigella flexneri*. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–9, 2017.

NONAKA, T. et al. *Shigella*-induced necrosis and apoptosis of U937 cells and J774 macrophages. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2513–2527, 2003.

OJHA, S. C. et al. A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

OMIDI, S. et al. Invasion of HEp-2 cells by *Shigella* spp. isolated from acute pediatric diarrhea. **GMS infectious diseases**, v. 5, p. Doc05, 2017.

ORLANDI, P. P. et al. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infan- 52  
poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: A preliminary study. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 621–625, 2001.

PASQUA, M. et al. The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–12, 2017.

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. 2007;(September 2006):1-11. **Immunology and Cell Biology 2007**, n. November 2006, p. 1–11, 2007.

PROSSEDA, G. et al. The virF promoter in *Shigella*: More than just a curved DNA



stretch. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 523–537, 2004.

PUPO, G. M.; LAN, R.; REEVES, P. R. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 19, p. 10567–10572, 2000.

RAM, P. K. et al. 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.

RAMOS MORENO, A. C.; GONÇALVES FERREIRA, L.; BAQUERIZO MARTINEZ, M. Enteroinvasive *Escherichia coli* vs. *Shigella flexneri*: How different patterns of gene expression affect virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 301, n. 2, p. 156–163, 2009.

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. 719–723, 1996.

REZENDE, A. DE O. **Investigação de genes de virulência associados ao processo invasivo de diferentes cepas de *Shigella* spp. de origem clínica.** [s.l.: s.n.].

SAHL, J. W. et al. Defining the phylogenomics of *Shigella* species: A pathway to diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 951–960, 2015.

SANCHEZ-VILLAMIL, J.; TAPIA-PASTRANA, G.; NAVARRO-GARCIA, F. Pathogenic Lifestyles of *E. coli* Pathotypes in a Standardized Epithelial Cell Model Influence Inflammatory Signaling Pathways and Cytokines Secretion. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. October, p. 1–17, 2016.

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

SASAKAWA, C. MINIREVIEW Molecular Basis of the Intracellular Spreading of *Shigella*. **American Society for Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5959–5966, 2001.

SASAKAWA, C. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 3, p. 229–243, 2010.

SCHMITTGEN, T. D.; ZAKRAJSEK, B. A. Effect of experimental treatmentfile:///Users/dantecaceresburgos/Desktop/tesis/thellin-1999.pdf 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. 1–9, 2012.

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.

SCHROEDER, G. N.; JANN, N. J.; HILBI, H. Intracellular type III secretion by cytoplasmic *Shigella flexneri* promotes caspase-1-dependent macrophage cell death. **Microbiology**, v. 153, n. 9, p. 2862–2876, 2007.

SERRA, P. T. **Análise investigativa dos fatores de virulência de cepas selvagens de *Shigella* sp. in vivo e seu potencial inflamatório.** [s.l: s.n.].

SOUSA, M. Â. B. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 30–35, 2013.

THE, H. C. et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235–250, 2016.

UDDIN, A.; WAHID, S. Relationship among *Shigella* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1131–1138, 2014.

VERÇOSA, J. V. DE M. **GENÔMICA COMPARATIVA DE *SHIGELLA* SPP. ISOLADAS DE CRIANÇAS COM DOENÇAS DIARREICAS NA AMAZÔNIA.** [s.l: s.n.].

VUBIL, D. et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of *Shigella* isolates recovered from children aged less than 5 years in Manhica, Southern Mozambique. **International Journal of Antimicrobial Agents**, p. 1–24, 2018.

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.

YANG, J. Y. et al. A mouse model of shigellosis by intraperitoneal infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 203–215, 2014.

ZAIDI, M. B.; ESTRADA-GARCÍA, T. *Shigella*: A Highly Virulent and Elusive Pathogen. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 2, p. 81–87, 2014.

## ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



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

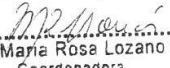


### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

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