UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *SHIGELLA* EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

ANA PAULA MIRANDA BARROS

MANAUS

2016

ANA PAULA MIRANDA BARROS

EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *SHIGELLA* EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia como etapa obrigatória para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Microbiologia aplicada a Biotecnologia.

ORIENTADORA: DRA. PATRÍCIA PUCCINELLI ORLANDI

MANAUS

2016

ANA PAULA MIRANDA BARROS

EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE *SHIGELLA* EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia como etapa obrigatória para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Microbiologia aplicada a Biotecnologia.

APROVADA EM:_____/_____/_____

BANCA EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/AM - Presidente

_____

Profa. Dra. Najla Benevides

FIOCRUZ Rondônia - Membro

_____

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia – INPA - Membro

“Aos meus filhos: Ana Carolina, Ana Luiza, Mario Bisneto e Ana Clara”.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado esta oportunidade;

Aos meus filhos Ana Carolina, Ana Luiza, Ana Clara e Mario Bisneto por me mostrar que não existe sonho impossível;

Aos meus pais pelo exemplo de vida.

Ao meu marido pela torcida velada na realização dos meus objetivos.

Às minhas amigas Alita, Vanda e Tatiane por exatamente tudo. Alita obrigada pela paciência e doçura durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Ao casal Tatiane e Daniel por ter me atendido prontamente com minhas dúvidas acadêmicas.

Aos meus novos amigos Paloma, Daniel, Fernanda, Nani, Samara, Marcelo e Joaquim que estiveram sempre comigo nas dificuldades tornando-as suportáveis;

Aos meus colegas do grupo de pesquisa da Fiocruz de Enterobactérias. Ao Diogo, Natália, Alessandra, Lucas, Edilene, João, Ruth e Gleice;

À equipe de profissionais, Andressa e Tania, do INPA pela presteza no atendimento;

Ao programa Multi- Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia pelos excelentes professores, em particular a Dra. Andrea Ghelfi e Dr. Gustavo Nunes;

A minha orientadora Dra. Patrícia Orlandi por ter depositado em mim confiança durante o desafio de pesquisar, incentivando e estimulando meu crescimento intelectual;

A Msc. Paula Taquita pelo incentivo, paciência e troca de conhecimento incansável durante esta jornada. Serei eternamente grata;

Agradeço especialmente ao Dr. Adolfo José da Mota pela dedicação e ajuda imensurável durante toda a execução do projeto. De forma altruísta recebeu nossa equipe e esteve no comando em momentos fundamentais da pesquisa para nosso crescimento. Muito obrigada.

“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras. Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes. Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos. Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores. Mantenha seus valores positivos, porque seus valores... Tornam-se seu destino.”

MAHATMA GANDHI

RESUMO

BARROS, A.P.M.B. Expressão gênica dos fatores de virulência de amostras clínicas de*Shigella* em modelo experimental murino. 2016. Dissertação de Mestrado – Univerisidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

Introdução: Uma complexa sequência de eventos é iniciada durante o processo de invasão na Shigellose. A *Shigella* spp é um bacilo pertencente à família das enterobactérias cuja estratégia de virulência está relacionada à invasão epitelial e escape do sistema de defesa do hospedeiro. Em modelo *in vivo*, uma das metodologias utilizadas é a infecção pulmonar em murino, que apresenta boa caracterização para estudo do comportamento da *Shigella* durante a colonização de célula epitelial. **Justificativa:** O conhecimento do comportamento de amostras clínicas de *Shigella* selvagens da região amazônica com seus diferentes perfis de virulência e o efeito destes *in vivo* em modelo animal murino é inédito. **Objetivo:** Foi realizada a avaliação dos fatores de virulência expressos durante a infecção por cepas de *Shigella* spp da bacterioteca da Fiocruz em modelo murino. **Material e Métodos:** Foram realizados ensaios de PCR em tempo real para expressão gênica de 18 fatores de virulência com sete amostras de *Shigella* spp oriundas de um estudo realizado com 1500 crianças nos anos de 2007 a 2009 dos Hospitais Públicos de Manaus - Amazonas. Ocorreu a infecção intranasal com as cepas selvagens de *Shigella* em camundongos Balb/c para avaliação *in vivo*. A análise estatística foi submetida no t-Teste de Student para verificar a significância com $p < 0,05$. **Resultados:** O estudo mostrou que os efetores IpaA, IpaB, IpaC e IpaD foram expressos positivamente nas sete amostras clínicas de *Shigella*. Os genes reguladores *VirF* e *VirB* foram expressos negativamente nas amostras testadas. **Conclusão:** O modelo de infecção baseado na inoculação intranasal em camundongos BALB/c é praticável. O quadro clínico patogênico em Balb/c evidenciou a ocorrência do processo infeccioso. A PCR em tempo real permitiu caracterizar as estratégias de virulência de cepas de *Shigella* . No período de 48h de infecção houve expressão positiva nas amostras clínicas dos genes do SST3 *IpaA, IpaB, IpaC* e *IpaD* e regulador *VirA*, e negativa de seus reguladores *VirF* e *VirB*, sugerindo que este panorama reflete os genes de virulência expressos durante a segunda fase da infecção por *Shigella* , mantida pela propagação célula-a-célula, na suas fases iniciais.

Palavras-chave: Expressão Gênica, Modelo Animal, Quantificação Relativa, Fatores de Virulência.

ABSTRACT

BARROS, A.P.M.B. Gene expression of the virulence factors from clinical samples of *Shigella* in a murine experimental model. 2016. Masters Dissertation – Univerisidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

Introduction: A complex sequence of events is initiated during the Shigellose invasion process. *Shigella* spp is a bacillus belonging to the enterobacteria family whose virulence strategy is related to epithelial invasion and escape from the host defense system. At in vivo model, one of the methodologies used is murine pulmonary infection, which presents a good characterization to study the behavior of *Shigella* during epithelial cell colonization. **Rationale:** The knowledge of the behavior of wild *Shigella* clinical samples from the Amazon region carring different virulence profiles and the effect of these in vivo in a murine animal model is unprecedented. **Objective:** The evaluation of the virulence factors expressed during infection by strains of *Shigella* spp from the Fiocruz bacterial library in a murine model was performed. **Material and Methods:** Real-time PCR for gene expression of 18 virulence factors with seven *Shigella* spp samples from a study enrroling 1,500 children from 2007 to 2009 of the Public Hospitals of Manaus-Amazonas was carried out. Intranasal infection in Balb/c mice with the wild strains of *Shigella* occurred for in vivo evaluation. Statistical analysis was performed on Student's t-test to verify significance with $p < 0.05$. **Results:** The study showed that the *IpaA, IpaB, IpaC* and *IpaD* effectors were positively expressed in the seven clinical samples of *Shigella* . The regulatory genes *VirF* and *VirB* were negatively expressed in the samples tested. **Conclusion:** The infection model based on intranasal inoculation in Balb/c mice is feasible. The pathogenic clinical picture in Balb/c evidenced the occurrence of the infectious process. Real-time PCR allowed to characterize the virulence strategies of *Shigella* strains. In the 48-h period of infection, there was positive expression in the clinical samples of SST3 genes *IpaA, IpaB, IpaC* and *IpaD* and regulator genes *VirA*; and negative of their regulators *VirF* and *VirB*, suggesting that this scenario reflects the virulence genes expressed during the second phase of the *Shigella* infection, maintained by cell-to-cell propagation, not its early stages.

Keywords: Gene Expression, Animal Model, Relative Quantification,and Virulence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Demonstração do declínio da taxa de mortalidade causada por diarréia no Brasil e grandes regiões. 1990- 2007. 20
Figura 2: Processo inflamatório na barreira intestinal 22
Figura 3: O bacilo da *Shigella* é transportado do lúmem até a região basal do epitélio do intestino .. 23
Figura 4: Translocação a passagem dos polimorfonucleares. 24
Figura 5: Os eventos genéticos que contribuiram para a evolução da *Shigella spp* 25
Figura 6: Esquema do Sistema de secreção do tipo III de *Shigella flexneri*. 26
Figura 7: Mapa de localização da Ilha de Patogenicidade da Shigella flexneri. 27
Figura 8: Atividade do Icsa.Legenda: Disseminação intercelularda *Shigella* spp 29
Figura 9: A regulação dos fatores de virulência da *Shigella* 31
Figura 10: Panorama da regulação da expressão gênica em *Shigella* spp. 32
Figura 11: Características da mucosa epitelial no pulmão e no intestino 34
Figura 12: Fluxograma das atividades realizadas 40
Figura 13: Figura esquemática demonstrando a amostragem das amostras clínicas e padrões inoculadas em camundongos. 41
Figura 14: Fluxo de procedimentos do desenho Experimental do Estudo. 45
Figura 15: Tecido fragmentado em equipamento PRECELLYS - TISSUE HOMOGENIZER. 48
Figura 16: Imagens representativas dos camundongos Balb/c após 24 horas de infecção pulmonar apresentando alteração de pelagem. 55
Figura 17: Curvas de dissociaçãofora do padrão dos Iniciadores. PCR em tempo real com amostras de cDNA a partir da infecção por cepa padrão da *Shigella* M90T 60
Figura 18: Imagem representativa da amplificação em triplicata dos iniciadores(AmplificationPlot). . 62
Figura 19: Gel de agarose com produto da extração de RNA 63
Figura 20: Gel de agarose 2%. Legenda-A-Produto da amplificação de RNA com iniciador GAPD mouse 64
Figura 21: Desenho experimental para cálculo da expressão gênica. 65
Figura 22: Imagem representativa do gráfico da curva de eficiência. 66
Figura23: Imagem representativa dos perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse exemplificando padrão de eficiência.(A) IpaB.(B) Vir F. (C) IpaH 4,5. (D) IpaC. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Amostras de *Shigella* sp.selecionadas para estudo. 42
Tabela 2:Pares de iniciadores (*forward* e *reverse*) utilizados para quantificação da expressão dos diferentes genes de virulência associados à invasão celular. 43
Tabela 3: Lista dos genes normalizadores para o PCR em tempo real..... 43
Tabela 4: Utilização das nove diluições para padronização das reações de PCR em tempo real. 50
Tabela 5: Composição da reação de PCR em tempo real (Mix PCR) 51
Tabela 6: Descrição das amostras clínicas de coleções microbiológicas da FIOCRUZ-Amazônia selecionadas para o estudo (DA CRUZ et al., 2014). 53
Tabela 7: Verificação da infecção dos camundongos BALB/c através dos parâmetros de temperatura e pesagem corporal, 24 horas de infecção pulmonar..... 54
Tabela 8: Resultados da análise *in silico* dos genes IpaH 7,8; IpaH 9,8; Icsa; Set1A;SenA e IpaD valor do ΔG *heterodimer*/ *self dimer* no Program IDT DNA. 57
Tabela 9: Lista dos genes plasmidiais selecionados e otimizados para PCR em tempo real com DNA genômico da padrão M90T *Shigella* 58
Tabela 10: Lista dos genes cromossomais selecionados e otimizados para PCR em tempo real. 59
Tabela 11: Resultados da análise *in silico* dos primes de *Shigella* utilizados no PCR real time pareados no DNA de *Mus musculus*..... 59
Tabela 12: Concentrações de *primes sense* e *anti-sense* de todos os iniciadores do estudo.....61
Tabela 13: Resultado representativo da quantificação das amostras de RNA e cDNA. 63
Tabela 14: Resultados da análise da curva de dissociação, amplificação e cT para cepa padrão M90T e amostras: 5, 7, 11,15,17 e 27 68

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Média de variação de peso, em gramas, dos grupos de cepas clínicas infectadas nos camundongos da segunda replicata biológica. 55

Gráfico 2: Média de variação de peso, em gramas, dos grupos de cepas clínicas infectadas nos camundongos da segunda replicata biológica. 565

Gráfico 3: Desvio padrão dos cTs na amplificação dos genes normalizadores em PCR em tempo real. Dados representativos. 65

Gráfico 4: Perfil do valor de cT com diferente genes de virulência (IpaA, IpaB, IpaC e IpaD) da *Shigella* spp em tecido pulmonar de *Mus musculus* após 48 horas da inoculação intranasal no cDNA recuperado das amostras clínicas 5, 7, 11 e 14. 69

Gráfico 5: Perfil do valor de cT com diferente genes responsáveis pela modulação da resposta imunológica (IpaH, IpaH 7,8 e IpgD) da *Shigella* spp em tecido pulmonar. 69

Gráfico 6: Perfil do cT com diferente genes responsáveis pela regulação da expressão do Vir B e da *Shigella* spp em tecido pulmonar de *Mus musculus* após 48 horas da inoculação intranasal no cDNA recuperado das amostras clínicas 5, 7, 11,14, 15, 17 e 27. 70

Gráfico 7: Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes de virulênciaIpaABCD *Shigella* spp medidos por PCR em tempo real usando o Método ΔΔCT. 68

Gráfico 8: Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes de virulênciaVirA,VirB, VirF de*Shigella* spp medidos por PCR em tempo real usando o Método ΔΔCT. 69

Gráfico 9: Gráfico da análise do t-Teste caracterizando as amostras clínicas 5, 7, 11, 14, 15, 17 e 27 com maior expressão gênica para o IpaA, IpaB e IpaC. Valor p do teste-t, conforme definição $p < 0,5$. 73

Gráfico 10: Gráfico da análise do t-Teste caracterizando as amostras clínicas 5, 7, 11, 14, 15, 17 e 27 com maior expressão gênica para o *VirF*, *VirB* e *VirA*. Valor p do teste-t, conforme definição $p < 0,5$. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool”
cDNA	Ácido Desoxidoribonucléico Complementar
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
Ct	cicleTreshold
ΔCT	“Delta CicleTreshold
IPA	Antígeno plasmideo de invasão
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	Ácido Ribonucleico Mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
BLAST	“Basic Local Alignment Search Tool”
NCBI	´National Center for Biotechnology Information”
ng	Nanograma
mM	Milimolar
NOD	Domínio de L
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
nm	Nanômetro
EIEC	*Escherichia Coli*Enteroinvasiva
SST3	Sistema de Secreção Tipo III

SUMARIO

RESUMO 7
LISTA DE TABELAS 10
LISTA DE GRÁFICOS 11
LISTA DE ABREVIATURAS 12
INTRODUÇÃO 16
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
1.1 *Shigella* spp. 18
1.2 EPIDEMIOLOGIA 19
1.3 PATOGENICIDADE 22
1.4. GENES DE VIRULÊNCIA DO ESTUDO 25
1.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA 30
1.6 MODELO ANIMAL 33
1.7 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA NA EXPRESSÃO GÊNICA 35
2. JUSTIFICATIVA 37
3. OBJETIVOS 38
3.1. OBJETIVO GERAL 38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 38
4. METODOLOGIA 39
4.1. ASPECTOS ÉTICOS 39
4.2. DESENHO EXPERIMENTAL 39
4.3. AMOSTRAGEM 41
4.4. SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE *Shigella* spp. 41
Tabela 1: Amostras de *Shigella* sp. selecionadas para estudo 42
4.5. SELEÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Shigella* sp. 42
4.6. SELEÇÃO E DESENVOLVIMENTO DOS INICIADORES 44
4.7. MODELO ANIMAL 44
4.7.1 Modelo Animal Escolhido 45
4.7.2.Tratamento experimental 45
4.7.3. Preparo das Cepas para Inoculação 46
4.7.4. Inoculação Intranasal em Camundongos Balb/C 46
4.7.5. Eutanásia e Metodologia de Retirada do Pulmão 47
4.8. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS. 47

4.9. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL 47
4.10. PCR CONVENCIONAL 48
4.11. SÍNTESE DO cDNA 49
4.12. GENES DE REFERÊNCIA - NORMALIZADORES 50
4.13. PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL 50
4.14 PCR EM TEMPO REAL 51
4.15. ANÁLISE DOS DADOS 52
5. RESULTADOS 53
5.1. DEFINIÇÃO DAS AMOSTRAS BACTERIANAS 53
5.3. PADRONIZAÇÃO DOS INICIADORES DE INTERESSE 56
5.3.1.Padronização das Reações da PCR em Tempo Real 57
5.3.1.1.Lista dos Genes Otimizados Após Análise *in silico* 58
5.3.1.2. Análise *in silico* dos Iniciadores de Interesse em DNA Genômico de *Mus musculus* 59
5.3.1.3. Padronização das Concentrações dos Iniciadores da PCR em Tempo Real. 61
5.3.1.4. RNA e cDNA Obtido para Verificação de Expressão Gênica. 62
5.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE INTERESSE 64
5.4.1 Método para Análise de Dados da Expressão Gênica em PCR em Tempo Real. 64
5.4.2. Ciclo Limiar dos Genes Normalizadores como Controle Endógeno (M90T) na Quantificação em PCR em Tempo Real. 65
5.4.3. Curva de Eficiência do Iniciador Contituinte no cDNA da Cepa M90T 66
5.4.4. Expressão dos Iniciadores Cromossomais e Plasmidiais Envolvidos na Infecção Pulmonar em Modelo Murino 67
7. CONCLUSÃO 82
8.PERSPECTIVAS FUTURAS 83
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 84
11. ANEXOS 98

INTRODUÇÃO

As doenças diarréicas são apontadas como a segunda causa de mortalidade apesar da redução substancial nas últimas duas décadas. Independentemente deste declínio, as patologias preveníveis da infância continuam como um dos principais problemas de saúde pública desafiando às autoridades sanitárias internacionais (WHO, 2013). Segundo Wardlaw (2010), 10% da mortalidade infantil ocorrem em países de baixo recurso sem a intervenção necessária de prevenção e controle.

A diarreia inclui uma grande variedade de agentes etiológicos virais, bacterianos e parasitários. Dentre os agentes bacterianos que comumente causam diarreia mundialmente, a *Shigella spp*. destaca-se por causar uma infecção grave relacionada com um mecanismo eficiente de virulência pré-determinado ao microambiente do hospedeiro (ORLANDI et al., 2001; SOBEL et al., 2004; VARELA et al., 2015).

A *Shigella spp* envolve vários fatores de virulência que coordenam uma complexa associação entre a célula bacteriana e o epitélio intestinal resultando em uma intensa resposta inflamatória aguda regulada por sequências cromossômicas e plasmidiais (SANSONETTI, 2006; WHO, 2013).

Esta espécie provoca uma resposta imune no sistema de defesa onde os fatores de virulência favorecem a invasão do microrganismo e destroem a mucosa intestinal (OGAWA et al., 2008; GALÀN, 2006). É instalado então um quadro invasivo altamente infeccioso chamado de shigelose (HALE et al., 1996), conhecido como uma doença de veiculação hídrica ou alimentar (KOTLOFF et al., 1999; SANSONETI et al., 2001).

Acredita-se que o fato da ingestão de uma pequena dose infecciosa ser o suficiente para causar a shigelose seja a explicação da ampla disseminação desta doença em ambientes superlotados e de saneamento inadequado. A reidratação oral não apresenta efeito, sendo o tratamento padrão o uso de antibióticos. Em consequência do aumento da prevalência generalizada de cepas resistentes aos antibióticos e a persistência das más condições sanitárias, a vacinação apresenta ter atualmente o melhor custo beneficio (WHO, 2005; GHOSH, 2011; ZHANG et al., 2014).

Aproximadamente 90% das infecções de shigelose acometem crianças menores de 5 anos, a maioria residindo nos países em desenvolvimento (ANDRADE et al., 1999; WHO, 2013; LIVIO et al., 2014; FONTAINE et al., 1988). Apenas 44% das crianças com diarréia

em países de baixa renda recebem o tratamento recomendado, e os dados de tendência limitada sugerem que houve pouco progresso desde 2000 (WHO, 2009; KOTLOFF et al., 2013).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, os indicadores de mortalidade infantil registram a ocorrência de 1,6% (756 números) de óbitos em 2011 em virtude das doenças diarreicas. Na região Amazônica, apesar das limitações da qualidade e da informação da causa de óbito, há registros no DATASUS, em anos recentes, de que a proporção de óbitos por doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade é cerca de 2,7 % (BRASIL, 2011). Os raros estudos realizados na Amazônia Ocidental quanto à etiologia da diarreia aguda em Manaus, relatam a presença predominante de *Shigella flexneri* como uma das cepas circulantes na região (SOUSA et al., 2013; DA CRUZ et al., 2014).

As novas tecnologias moleculares tem determinado características da patogenicidade da *S. flexneri*, abrangendo estudos com as estirpes M90T (sorotipo 5a), 2457T (sorotipo 2a), e YSH6000 (sorotipo 2a) em estudos como a análise *in vitro* de cultura de células intestinais, e infecção de vários hospedeiros animais, incluindo primatas, coelho, cobaia, ou rato (SANSONETTI et al., 1982; SANSONETTI , 2006; DI MARTINO et al., 2016; SHIM et al., 2007). No entanto nenhum desses delineamentos experimentais constituem cepas clínicas selvagens de *Shigella*. As pesquisas subjacentes contribuem para fundamentar o desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Shigella* spp.

Inserida na família da *Enterobacteriaceae*, os bacilos do gênero *Shigella* são bactérias gram-negativas, não fermentadoras de lactose, sem motilidade, não esporuladoras, anaeróbias facultativas, fermentadoras de glicose com produção de ácido, geralmente sem gás, não hidrolisadoras da ureia, não produtoras de gás sulfídrico, não descarboxiladoras de lisina e, além disso, não utilizam citrato e nem acetato de sódio como única fonte de carbono (NIYOGI, 2005; TORTORA, 2016; MURRAY, 2006;WHO, 2005).

Shigella spp é filogeneticamente relacionada tanto com a *Samonella* quanto com a *Escherichia* (TORTORA, 2016; MURRAY, 2006; TRABULSI, 2008). Na década de 40, através de estudos de hibridização de DNA, a cepa de *Shigella* foi distinguida da *E.coli* e classificada em quatro espécies, de acordo com as características bioquímicas e sorológicas em *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*e, *Shigella sonnei* (WHO, 2005) designados como sorogrupos A, B, C e D, respectivamente. Uma vez que este gênero demonstra ausência dos antígenos flagelar H e o capsular K, a variabilidade fica atribuída ao antígeno O ou somático que fornece uma base importante para esta sorotipagem (NIYOGI, 2005).

O sorogrupo A (*Shigella dysenteriae*), a produtora de toxina Shiga, e o sorogrupo B (*Shigella flexneri*) são responsáveis pela a maioria das formas graves da doença. Os sorogrupos C (*Shigella boydii)* e D (*Shigella sonnei*) costumam causar uma shigelose relativamente leve e mais branda comumente relacionada aos chamados casos da diarreia dos viajantes (SANSONETTI, 2006; NJUGUNA, 2013; TORTORA, 2016).

O gênero é fenotipicamente caracterizado em subgrupos (WHO, 2005) com exceção da *S. sonnei* (NIYOGI, 2005; SANSONETTI, 2006). Quarenta e nove sorotipos de *Shigella* são reconhecidos: 20 são de *S. boydii*, 15 de *S.dysenteriae* e 13 de *S. flexneri* enquanto que *S. sonnei* tem somente um sorotipo. *Shigella* tem como único hospedeiro o ser humano, mas em alguns casos pode infectar primatas superiores (HALE, 1996; WHO, 2005; NIYOGI, 2005; FOSTER et al., 2011; JOH et al.,2013).

A toxina Shiga uma citotoxina potente que causa a doença mais grave, prolongada e com maior freqüência fatal do que a doença causada por outras espécies de *Shigella* spp. Esta exotoxina é liberada durante a lise da célula, agindo como bloqueadora da síntese proteica, especificamente na subunidade 60S de ribossomos (NIYOGI, 2005; TORTORA, 2016; MURRAY, 2006; TRABULSI, 2008; WHO, 2005). Existem evidências de que o efeito primário da toxina no cólon é o dano aos vasos sanguíneos, causando trombose capilar e inflamação, em consequência, a colite hemorrágica. A toxina desempenha, ainda, papel central na patogênese da Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), induzindo lesão do endotélio renal e alteração da função plaquetária (SANSONETTI, 2006).

O enteropatógeno *Shigella* sp. apresenta uma diarreia inflamatória severa que se destaca pela baixa quantidade de inóculos necessário (10 a 100 microrganismos) para causar infecção (KOTLOFF et al., 2013; TRABULSI et al., 2008).

Após a contaminação oral, as bactérias passam por células do estômago e do intestino delgado antes de atingir o cólon, onde invadem a mucosa, iniciando a fase aguda chamada reto-colite destrutiva que provoca os sintomas disentéricos: febre, cólicas intestinais e emissão de fezes muco-purulenta com sangue (HALE, 1996; NIYOGI, 2005).

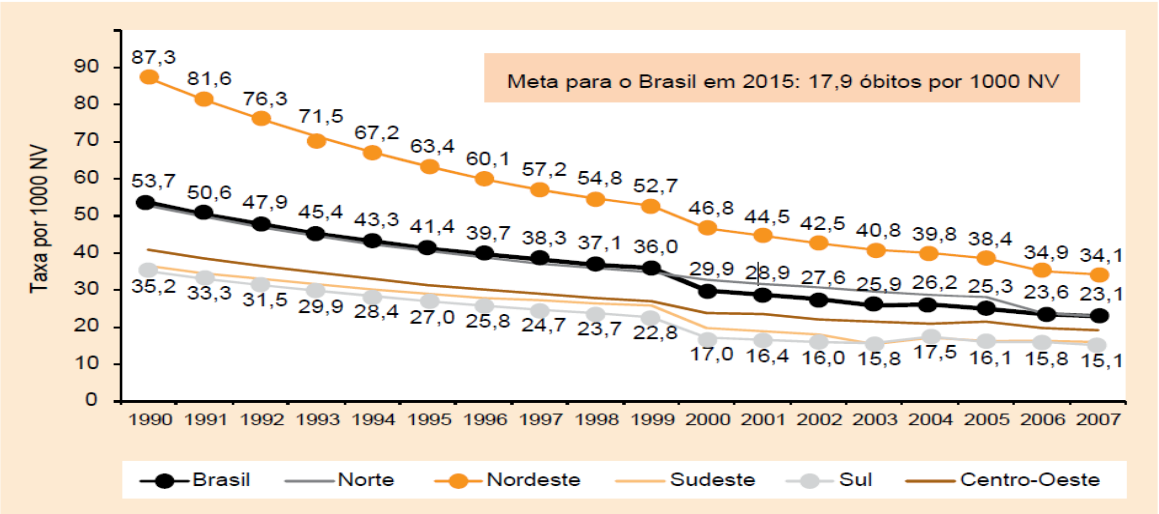
Os sintomas podem alternar de diarreia leve a disenteria bacilar inflamatória grave (NJUGUNA et al., 2013; TORTORA, 2016; MURRAY, 2006; TRABULSI, 2008; WHO, 2005; FARTHING et al., 2013) devido à invasão das células epiteliais da mucosa intestinal por bacilos de *Shigella* spp.. A continuidade do processo infeccioso evolui o quadro para disenteria causado pela formação de abscessos e ulcerações. A patogenia é diferenciada entre as espécies e define os principais fatores da evolução clínica na doença. As quatro espécies de *Shigella* afetam tanto o trato intestinal como o extra intestinal. A diarréia é caracterizada por amostras fecais iniciais líquidas, seguida, nos casos mais graves, pela produção de fezes muco sanguinolentas (KHAN et al., 2013). Outros sintomas diretos da diarreia infantil nos países com recursos limitados incluem desnutrição, retardo do crescimento e perturbação do desenvolvimento cognitivo (WARDLAW et al., 2010).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

São registrados mundialmente por ano dois bilhões de casos de doença diarreica segundo Farthing e colaboradores (2013). Nos países em desenvolvimento aproximadamente

2,0 milhões de crianças com menos de 5 anos de idade morrem por causa de diarreia. É a segunda causa de morte depois da pneumonia nesta faixa etária. Na África e no sudeste Asiático ocorrem 78% de todas as mortes infantis provocadas pela diarréia (BOSCHI-PINTO et al., 2008; WHO, 2005; SHAKOOR et al., 2012; NJUGUNA, 2013; ZHANG et al., 2014).

No Brasil, as principais causas de óbito no primeiro ano de vida são: perinatais, pneumonia e a diarreia, associadas à desnutrição. A taxa de mortalidade na infância, de 1990 a 2007 (**Figura 1**) apresentou declínio, com uma redução de 55,2% neste período para o Brasil (queda anual média de 4,4%). Essa queda ocorreu em todas as regiões, em especial na região Nordeste (60%), seguida da região Sul (57%). A queda da mortalidade na infância está ocorrendo especificamente pela queda dos óbitos nos menores de um ano de idade (BRASIL, 2011).



Fonte: SIM-CGIAE/Dasis/SVS/MS.

Figura 1: Demonstração do declínio da taxa de mortalidade causada por diarréia no Brasil e grandes regiões. 1990- 2007.

A shigelose representa uma doença de alto impacto à saúde pública, principalmente em países menos desenvolvidos. A doença atinge, por ano, aproximadamente 165 milhões de pessoas, sendo 163 milhões de casos em países em desenvolvimento e 1,5 milhão em países desenvolvido. Dentre todos esses casos, estima-se que 1,1 milhão de pessoas morrem vítimas da doença (WHO, 2013; KOTLOFFet al., 2013; ZHANG et al.,2014).

Em estudo realizado pela Global Entérica Multicenter (GEMS), foi demonstrado um expansivo número de casos de doenças diareica pediátrica de moderada a grave, tendo entre

os patógenos bacterianos mais comuns na África Subsaariana e no Sul da Ásia a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Shigella* spp. A *Shigella* spp.foi a enterobactéria mais prevalente entre as crianças de 2-5 anos de idade.

Segundo Bardhan e coloboradores (2010) foi estimado que disenteria por *Shigella* spp apresenta a incidência de 13,2 casos em 1.000 crianças por ano menores de 5 anos na Ásia (ZHANG et al., 2014; JOH et al., 2013).

S. flexneri e *S. sonnei* são os gêneros mais comumente isolado nos países em desenvolvimento, com frequencia aproximada de 60% a 15%, respectivamente. Os sorogrupos *S. dysenteriae* e *S. boydii* ocorrem com freqüência equivalente (LIMA et al., 2015).

Considerando os sorogrupos descritos anteriormente, o sorogrupo B (*S. flexneri)* predomina em áreas endêmicas, sendo responsável por aproximadamente 50% dos casos infecciosos. O sorogrupo A (*S. dysenteriae*) corresponde a 30% dos casos infecciosos, sendo um dos principais responsáveis por epidemias em países subdesenvolvidos (SANSONETTI et al., 2001; SANSONETTI , 2006).

Registros de estudos realizados no Brasil mostram que as espécies de *Shigella* mais frequentemente isolados no país são *S. flexneri* e *S. sonnei*, isolado principalmente de crianças menores de 5 anos de idade (SOUSA et al., 2013).

Peirano et al. (2006) observaram diferença na incidência do isolamento geográfico da *Shigella* entre as regiões brasileiras. *S. flexneri* apresentou isolamento maior no Nordeste, e *S. sonnei* foram mais constatemente isoladas no Sudeste. Estas duas regiões brasileiras são social e economicamente muito diferentes, sendo mais propensas a ter cidades desenvolvidas no Sudeste.

S. boydii e *S. sonnei* geralmente causam quadro patogênico leve são predominantes encontrados em áreas mais desenvolvidas. Epidemias de shigelose são quase sempre provocadas pela *S. dysenteriae* tipo I, produtora da toxina de Shiga (NA-UBOL et al., 2006), ocorre com mais frequência do que outros gêneros de *Shigella* e provoca epidemias de grande porte, muitas vezes regionais, regularmente com altas taxas de ataque e elevada letalidade (WHO, 2013).

1.3 PATOGENICIDADE

A *Shigella* spp. depende da sua capacidade de invadir as células epiteliais em procedimento de invasão da mucosa do colón com a translocação através das células M e fagocitose por macrófagos residentes (PHALIPON et al., 2007).

Este modelo de invasão em células epiteliais do colón é referenciado como medida essencial para a patogênese da shigellose. As bactérias sem a ilha de patogenicidade (IPA) no plasmídeo, onde estão inseridos os genes responsáveis pelos fatores de virulência, são consideradas avirulentas (PHALIPON et al.,2007; PHILPOTT et al.,2000).

As espécies de *Shigella* usam mecanismos de adaptação ao meio ácido do estômago. A via GDAR (Glutamato Dependente da Resistência a Ácidos) é eficaz para esta resistência dando continuidade ao processo infeccioso na mucosa do colóne do reto após sua sobrevivência ao meio ácido do estômago (SANSONETTI, 2006; PHALIPON et al.,2007; YANG et al., 2015).

Uma interação complexa entre a bactéria invasora e a célula hospedeira é desencadeda onde, em todas as fases, o resultado é amplificar a inflamação (DORMAN et al., 2001). O processo inflamatório na barreira do epitélio intestinal pela *Shigella* spp. aborda mecanismo de adesão, invasão, replicação e disseminação intracelular. O microambiente intestinal influencia cada fator do curso desta infecção (RAQIB et al., 1995; FERNANDEZ et al.,2008, SANSONETTI , 2006) (**Figura 2**).

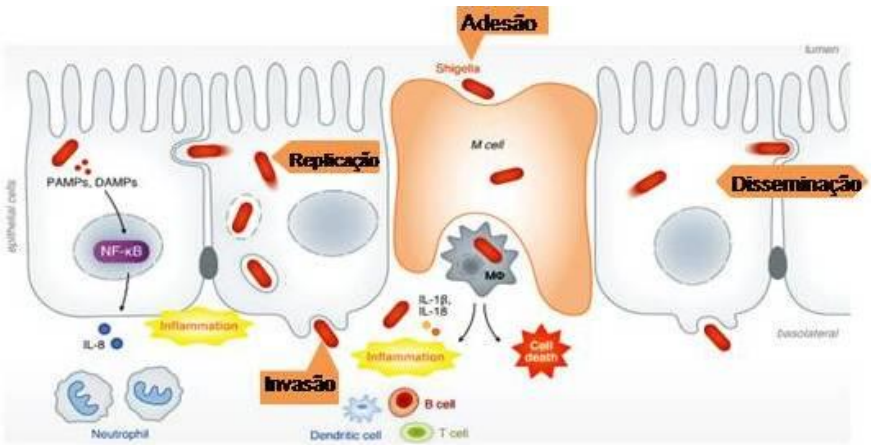


Figura 2:Processo inflamatório na barreira intestinal. Legenda: Os macrófagos encontram-se entre as primeiras células que a *S. flexneri* entra em contato após a transcitose através de células M a partir do lúmen para a cúpula subepitelial. Os fagócitos funcionais englobam a *Shigella* aumentando sua absorção. (Fonte: Ashida et al.,2015).

Realizada a transcitose pelas células M, as *Shigellas* são liberadas em lâmina própria onde elas tanto podem ser fagocitadas por macrófagos, quanto podem também invadir outras células epiteliais (**Figura 3**). Os macrófagos liberam IL-1 após apoptose induzida pelo bacilo produzindo uma resposta inflamatória acentuada. A ativação da resposta da imunológica do hospedeiro aumenta acentuadamente à medida que o numero de bactérias e invasões ocorrem (SANSONETTI, 2006; SCHROEDER, 2008).

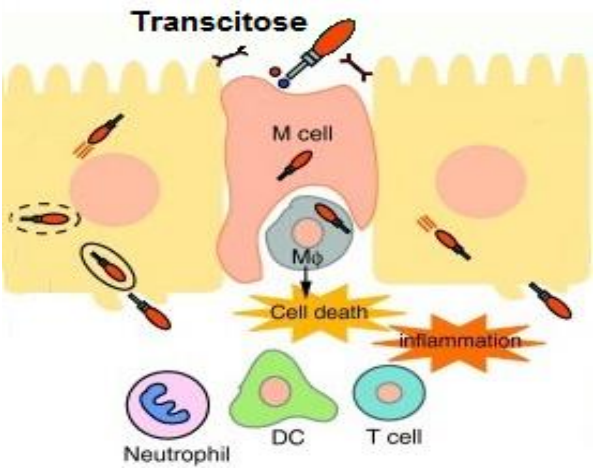


Figura 3:O bacilo da *Shigella* é transportado do lúmem até a região basal do epitélio do intestino. **Legenda:** A enterobactéria ganha a membrana basolateral das células M e os macrófagos em espera assumem o bacilo entregue na região luminal Inicia uma resposta imune na mucosa. A transcitose na célula M são exploradas como uma via para a invasão do revestimento epitelial impermeável por um número acentuado de agentes, incluindo *S. flexneri.* Fonte:Adaptado Ashida et al.(2011).

Ainda intracelularmente, as *Shigellas* induzem a liberação de IL-8 juntamente com a IL-1β dos macrófagos, ocasionando assim uma nova migração de neutrófilos (PMN) para as camadas epiteliais do lúmen. Estas células respondem ao ataque bacteriano no controle da infecção, confinando-as extracelularmente na mucosa parecendo ser o fim do processo infeccioso. Porém esta movimentação de polimorfonucleares causa o afastamento das junções oclusivas (**Figura 4**) nas células epiteliais, deixando-as expostas a um acesso adicional no tecido independente da célula M (SUZUKI et al., 2001; SANSONETTI et al., 2001; SCHROEDER, 2008, AGAISSE et al., 2016).

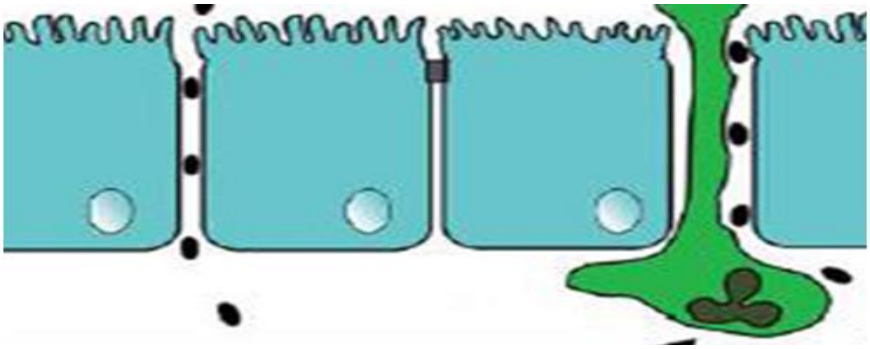


Figura 4: Translocação a passagem dos polimorfonucleares.**Legenda**: Deslocamento da camada basal para o lúmem através do rompimento das junções oclusivas favorecendo a entrada de novos microrganismos da Shigella . Fonte: Adaptado Jennison; Verma, 2004.

A bactéria liberada por macrófagos e as provenientes do distanciamento dos enterócitos, uma vez na região basolateral, podem invandir as células epiteliais colunares do intestino dando inicio a uma nova etapada infecção. Nos enterócitos a *Shigella* intracelular lisa os vacúolos endocíticos passando para o citoplasma eucariótico, se replicam e iniciam seu movimento adjacente de disseminação entre as células num processo dependente de actina (BERNARDINI et al.,2001; BARTA et al.,2012).

A inflamação maciça promove a infecção inicial por *S. flexneri* contudo, estudos recentes, fornecem evidências de que as bactérias segregam efetores que regulam estes sinais pró-inflamatórios no intuito de equilibrar a gravidade da inflamação para um estágio favorável para as *Shigellas* (BLOCKER et al.,1999; BLOCKER et al.,2008).

Nessa situação as defesas do organismo são vencidas ocasionando uma inflamação que causa um quadro de disenteria bacilar. Esta destruição tecidual grave causada por *Shigella* spp. resulta na dificuldade para absorção de água, nutrientes e solutos, que pode causar a diarreia aquosa, bem como a presença de fezes muco-sanguinolentas e febre. Uma perturbação da homeostase do eletrólito e as alterações nos processos de transporte de membranas são típicos de doenças diarréicas e colite aguda (SHIM et al., 2007).

A distribuição deste processo na mucosa do colón origina a expansão da infecção ocasionando a liberação de ATP e fluxos de Ca^{2+} em células ainda não infectadas do revestimento epitelial, criando um estado altamente favorável para a eficiência da invasão (TRAN et al., 2009).

A doença é essencialmente limitada a mucosa intestinal e a disseminação sistêmica é rara podendo ocorrer em crianças desnutridas (TANG et al., 2014). A toxina Shiga é

citotóxica para uma variedade de tipos de células sendo responsável pelo desenvolvimento de lesões vasculares no cólon, no rim, e no sistema nervoso central (TÓTH et al., 2016). Devido a elevada toxicidade da toxina Shiga, infecções por *S. dysenteriae* sorotipo 1 são frequentemente associadas a complicações com risco de vida. As enterotoxinas shET-1 e shET-2 têm um papel importante na alteração do eletrólito e transporte de água no intestino durante a fase aquosa inicial da doença(FONTAINE et al., 1998).

1.4. GENES DE VIRULÊNCIA DO ESTUDO

O estudo do seqüenciamento de DNA da *Shigella* associado à análise filogenética evidencia que existe uma relação evolutiva da sua origem a partir da estirpe de *Escherichia coli*. As regiões genéticas conservadas no núcleo confirmam que o gênero é composto de vários conjuntos de genes intercalados na *E. coli* (**Figura 5**) (LAN et al., 2004; THE et al, 2016).

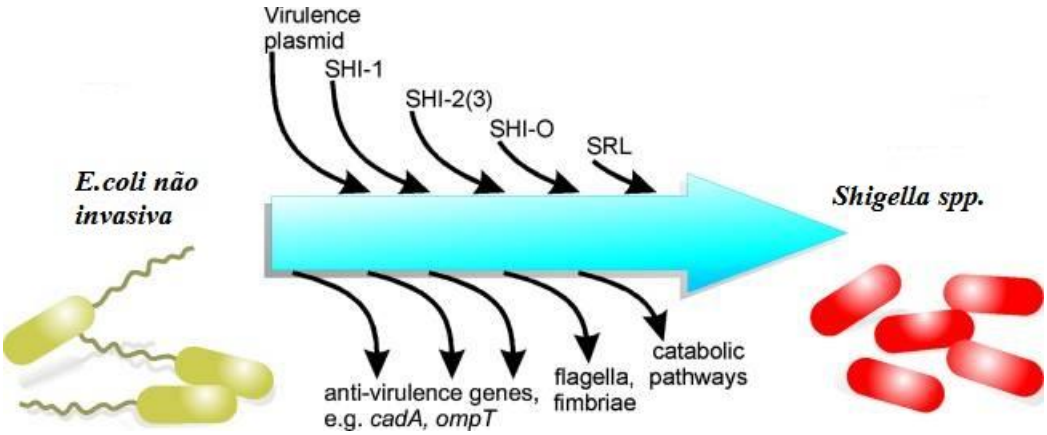


Figura 5: Os eventos genéticos que contribuiram para a evolução da *Shigella spp*.**Legenda**: A partir de antepassados de *E. Coli*. Evolução através da aquisição de grandes ilhas de plasmídeo de virulência e patogenicidade cromossômica, bem como através da perda de lo loci genéticos, que não são funcionais intracelularmente ou impedem a virulência. Fonte: Adaptado Schoroeder 2008.

Todos os estágios da doença realizados pela *Shigella* spp, desde a adesão até a invasão dos enterócitos, é mediado por genes de virulência plasmidiais e cromossomais (SANSONETTI, 2001). Os genes plasmidiais da *Shigella* conferem o fenótipo invasivo, este processo também é encontrado em *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC) (PARSOTet al., 1996).

A importância dos genes na produção dos fatores de virulência submete-se a uma maquinaria molecular de especial interesse para o estudo da interação patogeno-hospedeiro. O

O mecanismo da patogênese na shigelose depende do fornecimento de proteínas efetoras de virulência para o interior das células eucarióticas através do sistema de secreção tipo III (SST3) (**Figura 6**), codificado a partir do plasmideo de virulência com 220kb pelo gene *mxi-spa* (TRAN et al., 2009;ASHIDA et al., 2015). As bactérias que possuem este sistema são capazes de injetar proteínas bacterianas chamadas de efetores diretamente em células hospedeiras através das membranas, onde podem manipular o sistema imune e a função celular (SINGER et al.,2008).

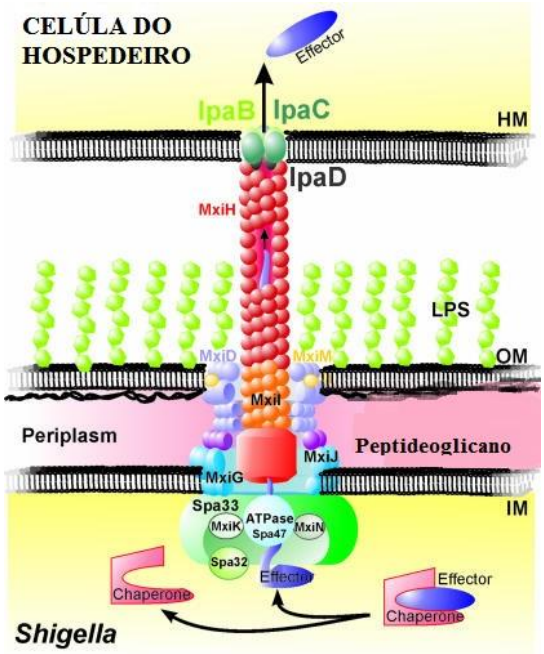


Figura 6: Esquema do Sistema de secreção do tipo III de *Shigella* ***flexneri.*****Legenda**: O Complexo de ponta é composto de IpaD e IpaB, que adapta uma conformação fechada (inativos) e uma conformação aberta (ativos) a ativação da secreção leva à expressão mxi-ipgC-dep dependente. Fonte. Adaptado de Schroeder, (2008).

A maquinaria do SST3 é codificada por 20 genes denominados *mxi* (membrane expression of *ipa*) e *spa* (surface presentation antigen) formam um *cluster* que são divididos em 2 *operons* (BLOCKER et al., 2008; SANSONETTI, 2006). Este sistema é evolutivamente conservado na *Shigella spp*. Os dois operons *mxi/SPA* e o *ipaABCD* possuem os genes essenciais para ativação do SST3, sendo justapostos no centro do plasmideo de virulência e são orientados inversamente conforme exemplificado na **Figura 7** (BLOCKER et al., 2008; MARLOVITS et al., 2010).

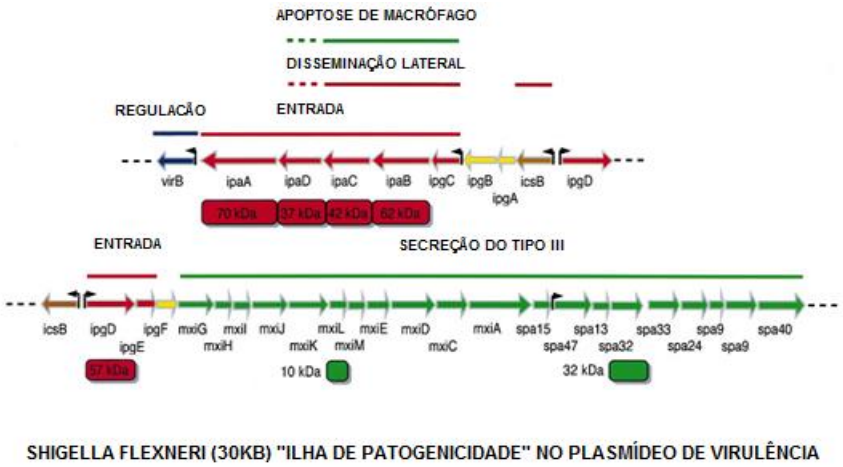


Figura 7: Mapa de localização da Ilha de Patogenicidade da Shigella flexneri. **Legenda:** IPA: 30kb com os dois operons mxi/27ro e o ipaABCD orientados inversamente e necessários para a entrada celular da bactéria (em vermelho) e escape de macrófagos (em verde). Fonte: Adaptado de Sansonetti, 2001.

As proteínas IpaA, IpaB, IpaC e IpaD favorecem os eventos de contato com a superfície celular epitelial (BLOCKER et al., 1999). Este aparelho de secreção é constituído de dois anéis que proporcionam um trajeto contínuo entre as membranas interna e externa, incluindo a camada de peptidoglicano (MOTA et al., 2005; MARTEYN et al.,2010).

A IPA, o fragmento plasmidial conservado de 31 kb, é importante para originar a entrada do bacilo de *Shigella* nas células epiteliais via macropinocitose e a ativação de polimorfonucleares (PMN) através de proteínas efetoras. Os dois *loci* gênicos distintos que codificam proteínas associadas com a invasão de células eucarióticas, induzem a reestruturação do citoesqueleto celular na região de contato com a célula bacteriana (BLOCKER et al., 1999; BLOCKER et al., 2008). O *operon Ipa* inserido neste *lócus*, que codifica as proteínas da invasão, é responsável também pela polimerização de monômeros de actina (DI MARTINO et al., 2016).

É necessário um grande plasmídeo de virulência para iniciar a infecção, no entanto, vários *loci* cromossômicos são importantes para uma resposta inflamatória completa (INGERSOLL et al., 2006). As outras proteínas são codificadas por outros genes fora da ilha de patogenicidade (IPA).

Cepas mutantes com ausência das proteínas IpaA, IpaB, IpaC, IpaD e IpgD são incapazes de ativar a mobilização de proteínas do citoesqueleto da célula hospedeira sendo, portanto, incapazes de desencadear um quadro infeccioso disseminado (DORMAN et al., 2001; ADLER et al. 1989).

A proteína de invasão IpaA promove a despolimerização da actina após a entrada celular restaurando sua arquitetura. Esta invasina se liga ao domínio N-terminal da vinculina e estimula a associação da vinculina com f-actina ocasionando a redução de filamentos de actina promovendo a entrada do bacilo após adesão local (KOPPOLU et al., 2013).

O *IpaB* detecta o contato com membranas das células hospedeiras fazendo associação com *IpaC* e induz a secreção de todos os demais efetores do SST3. Esta proteína tem a função de indução e escape dos macrófagos. O produto de gene *Ipa C* provoca a polimerização da actina e induz a formação de saliências na membrana celular do procarioto e eucarioto (FARFAN et al.,2011; BARTA et al., 2012).

O Ipa D é uma proteína em forma de um haltere com uma espiral molecular enrolada que é estabilizada por dois domínios laterais globulares, sendo responsável pelo controle da entrada de efetores secretados. O *IpaD* está localizado na região terminal do SST3 e, quando exposto aos sais biliares altera, sua conformação na invasão promovendo o recrutamento do *IpaB* e provocando a formação de um complexo (DICKENSON et al., 2013). A proteína Ipg D realiza uma sinalização anti apoptótica desencadeada pela ativação de fosfatidilinositol 3 quinase para obter o escape da resposta imune do hospedeiro (ROEHRICH et al., 2013).

Apesar de não totalmente elucidado, os antígenos de invasão plasmidial IpaH (Ipah4,5 e IpaH 7,8) apresentam uma proteína chamada ubiquitina ligase que, ao se ligar a outra proteína no citoplasma do hospedeiro, acabam sinalizando para célula sua degradação ou apenas mudança de lugar (SANSONETI et al., 2001). E esta ubiquitinação é essencial, pois é refletida em alguns processos como a diminuição da resposta inflamatória ou até mesmo sua supressão (ASHIDA et al., 2015).

As proteínas da família IpaH tem um alvo específico devido ao seu domínio de localização e substrato único e, portanto, faz uma contribuição distinta à promoção da patogênese bacteriana. A *Shigella* entrega as proteínas Ipa H9.8 e Ipa H4.5 inibindo a ativação de NF-kB (responsável pela resposta inflamatória contra Damp´s e Pamp´s) e novamente é observado a modulação da resposta do hospedeiro a favor da bactéria (SINGER et al., 2008; ASHIDA et al., 2015).

O efetor VirA, apesar de está envolvido no escape do macrófago, tem sido demonstrado agir como uma protease de cisteina digerindo alfa-tubulina e degradando, assim, a rede de microtúbulos para promover a motilidade da *Shigella* .O VirA elimina a rede de

microtubulos presentes no citoplasma celular. Por conseguinte, as ações dos efetores de SST3 ficam disponíveis para promover a invasão e sua posterior disseminação (AGAISSE, 2016). Os genes cromossomais *Vir F* e *Vir B* participam da regulação da expressão dos genes de invasão (FAHERTY et al., 2016).

O *IcsA* é responsável pela motilidade a base de actina entre as células intestinais, ligando-se a n-WASP. A indução da polimerização da actina em um dos pólos da célula microbiana promove o movimento lateral entre as células entorocíticas. A IcsA favorece agora a disseminação da enterobactéria no tecido intestinal (**Figura 8**) (BERNARDINIet al., 2001; KILLACKEY et al., 2016).

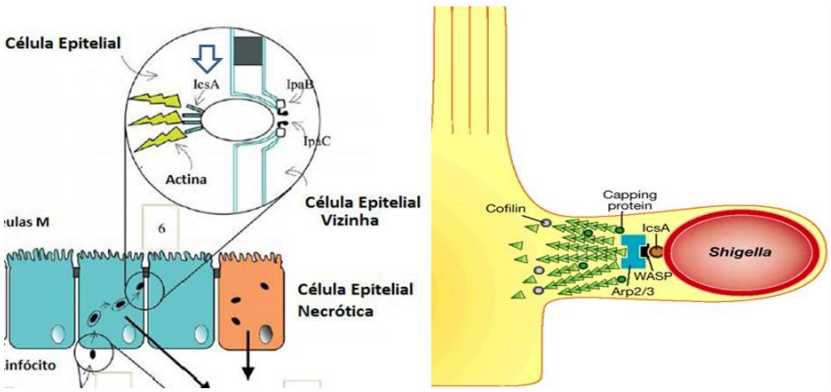


Figura 8: Atividade do Icsa.Legenda: Disseminação intercelularda *Shigella* spp. O complexo formado actina e Icsa serve como um nucleador actina e catalisa o alongamento dirigido de uma cauda de actina, que impulsiona *S. flexneri* através do citoplasma e de célula a célula. Fonte Adaptado de Jenisson e Verma (2004).

Os genes cromossomais da bactéria sintetizam a toxina shiga e a enterotoxina shET-1 participante da produção de grande quantidade de fluidos e eletrólitos no intestino responsáveis pela fase aquosa da doença (SANSONETTI, 1998; TRABULSI et al, 2008).

A exotoxina chamada toxina Shiga (STX) não é excretada pela bactéria, mas liberada após a destruição das células. Esta toxina é codificada pelo *operon* do gene *Stx* localizado em um fago. Acreditava–se que a expressão dessa toxina era exclusiva da *Shigella dysenteriae*, porém foi isolada recentemente em *Shigella sonnei* e *Shigella flexneri*. Existem vários subtipos como Stx1a, Stx1c, Stx1d, e Stx2a-f (TÓTH et al., 2016).

As outras enterotoxinas descritas na *S. flexneri* são: shET-1,de 55 k Da, codificada por genes cromossômicos denominados *set1A* e *set1B;* e shET-2 codificada pelo gene *sen A* e *sem*

B localizado no plasmideo de 140M-Da que está associada com a invasão (FAHERTY et al., 2016). Além da sua atividade enterotóxica comprovada, os shET2 apresentam uma contribuição para o efeito pró-inflamatório de *S. flexneri* induzida após a invasão da célula epitelial. ShET-2 é segregado e injetado para células por SST3, esta proteína pode participar na indução de secreção de IL-8 (FARFÀN et al., 2011; FARTHING et al., 2013; FAHERTY et al., 2016).

No entanto, o mecanismo exato do aparecimento da fase aquosa durante a shigelose ainda não é totalmente compreendido. As enterotoxinas (shET1e shET2) induzem o acúmulo de fluidos em várias espécies de *Shigella* representando, assim, a fase aquosa da diarreia.

1.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

A expressão gênica em procariotos pode ser controlada em vários níveis diferentes: transcrição, tradução e secreção de proteínas. Entretanto, os mecanismos reguladores com os maiores efeitos no fenótipo ocorrem na primeira fase da expressão que é a transcrição (BORGES-OSORIO; ROBINSON, 2013). É consideravelmente amplo o número de fatores que regulam a transcrição de genes participantes na patogenia da shigelose (FERNANDEZ et al., 2003; SENGUPTA et al., 2014).

A internalização da *Shigella* nas células epiteliais e nos macrófagos é dependente de um conjunto de efetores desencadeados em cascata que se relacionam com todas as etapas da infecção. A fagocitose ocorre tanto em macrófagos, como nas células epiteliais. No entanto, o resultado é divergente dependendo do objetivo: seja responder ao ataque bacteriano; seja disseminar o patógeno. Nestes momentos, temos a expressão dos genes regulada por alterações ambientais percebida pelo patógeno (ANDERSON et al, 2016). Segundo Rudel e Kozjak (2010) em seus ensaios ficou confirmado que o agente da shigelose induz o controle da expressão de genes de virulência para garantir o sucesso da infecção.

A expressão dos genes de invasão do plasmidio de virulência é regulada em resposta aos fatores microambientais característicos do hospedeiro. O controle transcricional também pode ser realizado pelo sistema de dois componentes de transdução: genes cromossomicos e grupos de proteínas reguladoras como Arac-like, H-NS, IHF e FIS (TOBE et al., 1993; GALLEGOS et al., 1997; BASTA et al., 2013).

Os dois genes reguladores positivos *Vir F* e *Vir B* (**Figura 9**) são essenciais para a expressão do processo de invasão da *Shigella* . O *Vir F* ativa positivamente a transcrição de dois genes de virulência o *Vir B* e o *IcsA* (YANG et al, 2011).

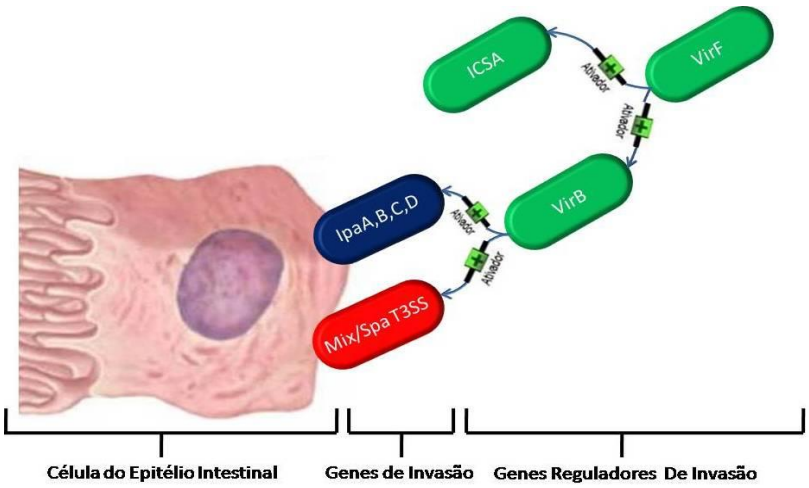


Figura 9:A regulação dos fatores de virulência da *Shigella* **.Legenda**: É realizada pela ativação da transcrição do VirF no topo da cascata reguladora. O VirB e ICSA são dependentes do VirF. A temperatura atua na regulação do VirF . Fonte: Ana Paula Miranda Barros, adaptado de YANG et al, 2011.

A família de proteínas AraC, composta de mais de 800 proteinas, são reguladores primários de transcrição de genes envolvidos no metabolismo do carbono, na resposta ao estresse e na patogênese. São determinantes, inclusive, da virulência em bactérias gram negativas. Esta proteína é dividida em três classes, a terceira classe inclui a proteína Vir F, responsável pelo controle da transcrição em resposta a um sinal físico, como a temperatura, que influencia na expressão dos genes de invasão (GALLEGOS, 1997; SHEN et al., 2012).

A transcrição dos genes de invasão é regulada negativamente na presença de temperatura a 30°C através da proteína H-NS (SANSONETTI, 2006). A proteína H-NS funciona como um silenciador de transcrição. O gene *Vir B* neutraliza a ação da HN-S promovendo vários efetores de virulência a partir de um fator principal a temperatura de 37°C (TOBE et al., 1993). São codificadas no cromossomo as proteínas de interação ao DNA, FIS E IHF, que estão envolvidas na regulação do *Vir F* e *Vir B*. O promotor de *Vir F* é estimulado positivamente através de *IHF* e *FIS* (DI MARTINO et al., 2016).

Os genes expressos a 37°C garantem que as proteínas de virulência sejam expressas apenas quando estiverem no interior de organismos hospedeiros, e não no ambiente, sendo o

principal fator desencadeador da expressão destes genes (DORMAN et al., 2001). A célula microbiana funciona como um sensor que reage ao microambiente característico do lumem intestinal acionando a transcrição dos genes de invasão em resposta a temperatura, osmolaridade, pH, concentração de ferro e cálcio(**Figura 10**) (BARTA et al, 2012).

Figura 10: Panorama da regulação da expressão gênica em *Shigella* spp.**Legenda**: Os elementos reguladores que controlam a expressão do SSTT e os seus substratos no plasmídeo de virulência de *S. flexneri*. VirF é induzido por estímulos ambientais e desencadeia a expressão do ativador da transcrição central o VirB onde ativa o principal plasmídeo de virulência (VP). VirB promove a expressão de genes da região de entrada e alguns outros genes efetores adicionais espalhados no plasmídeo de virulência. Fonte. Adaptado de Schroeder (2008).

O *IcsA* é um gene controlado por *Vir F* é independente de *Vir B*. Este gene codifica uma proteína responsável pela motilidade de *Shigella* e está localizado no plasmídeo de virulência fora da localidade das proteinas Ipas e Mxi-spa (BERNARDINI et al., 2001). Sua regulação é reprimida pela ligação de H-NS que é aumentada na presença de temperatura de 30°C (TRAN et al., 2003).

A diminuição de temperatura pode levar a um super enovelamento de DNA e o complexo H-NS é ativado. Estes resultados sugerem que a regulação dos genes de virulência é iniciada através da mediação das proteínas FIS presente no cromossomo e *VirF* no plasmidio. As contribuições de H-NS e a topologia do DNA são suscetíveis para a sub-regulação de *Vir F* e *Vir B* (DI MARTINO et al., 2016).

O sistema CpxA/R é um outro ativador da transcrição de *Vir F*, dependente de pH. As mutações obervadas em qualquer *cpxA* ou *cpxR* interrompe esta regulação por pH, que são inativados em Ph ácido. O CpxR é capaz de se ligar ao *VirF* pela região promotora quando é fosforilada por CpxA (BASTA et al., 2013).

Os genes *Vir B* e *Vir F*, são ativadores transcricionais do *Mxi e* que regula a expressão de um conjunto de proteínas efetoras do TTS3 (MARTEYN et al., 2012). *Mxie* é regulada através de um mecanismo complexo que envolve o acompanhante IpgC, atuando como co-activador *Mxi e*, e o efetor secretado *OspD1* na qualidade de inibidor *Mxie* (CAMPBELL-VALOIS et al., 2015).

O sistema regulatório FNR tem efeito sobre a expressão dos fatores de virulência da *Shigella* promovendo a adapatação da bactéria em ambientes de anaerobiose (SANSONETTI, 2006; MARTEYN et al., 2012).

As enterotoxinas cromossômica shET1 e shET2 são efetores do SST3, localizados na ilha de patogenicidade, e possuem sua regulação realizada de acordo com o controle transcricional a partir da proteina FIS e o sistema *MxiE*, para os genes cromossomais e ativação do sistema de secreção, respectivamente, associada com a intercomunicação positiva entre estes (MARTEYN et al., 2012; TOBE et al.,1993).

1.6 MODELO ANIMAL

O experimento em cultura de células microbianas não revela, na sua totalidade, a dinâmica do hospedeiro durante o processo de infecção. Para melhor caracterizar a interação patôgeno hospedeiro,o modelo animal apresenta vantagens na contextualização do sistema ativo, tanto para virulênciacomo para a imunidade (PULENDRAN et al., 2001).

Encontramos no mecanismo da patogênese e*in vivo* desafios durante as várias fases da infecção que se inicia desde o local de entrada do patógeno até o final onde ocorre o dano tecidual.

O modelo animal mais adequado para disenteria bacilar é o macaco *rhesus*, poispermite uma inoculação intragástrica por via oral, resultando no desenvolvimento de uma colite aguda semelhante ao observado em seres humanos. Este modelo não é o mais utilizado

em virtude do seu custo e questões éticas envolvidas (YANG et al., 2014; YANG et al., 2015).

A infeccão intestinal no ileo dos coelhos ocasiona uma ruptura, invasão e destruição inflamatória do revestimento do epitelio, originando alterações morfológicas e migração celular (SANSONETTI, 2006). No entanto o estudo para infecção no colon é ineficaz pois o microambiente desta região difere pela tensão do oxigenio, ph e espessura (WEST et al., 2005).

No modelo pulmonar murino (mucosa estéril de microrgansimos, Ph constante e a barreira física ciliar) podemos destacar características químicas, biológicas e físicas do local de infecção que se contrapõem ao epitélio intestinal humano (**Figura 11**) (VALIANTE et al., 2003; SALGADO et al., 2013).

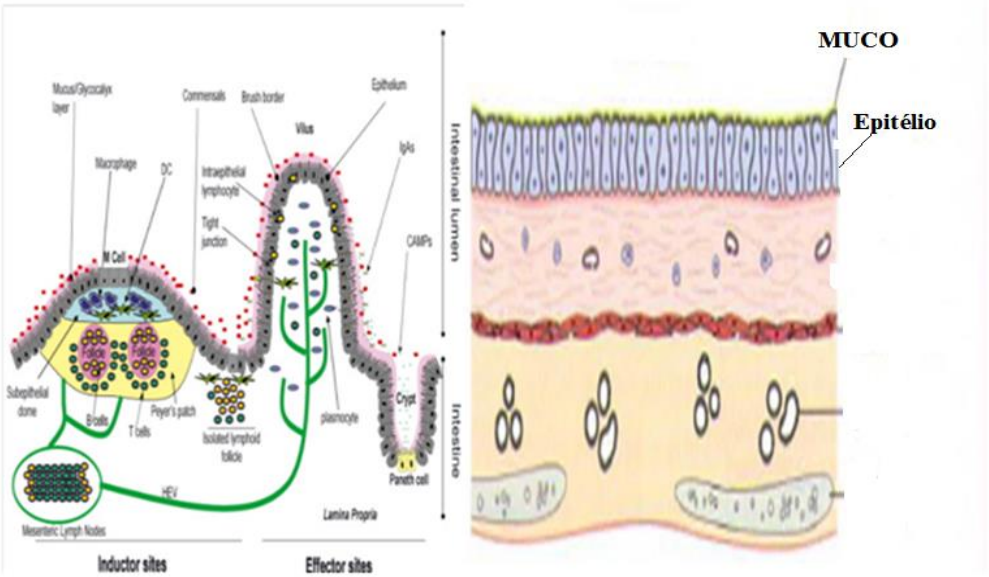


Figura 11: Características da mucosa epitelial no pulmão e no intestino.**Legenda**: Características - pH uniforme. Ambiente estéril de microrganismo que não mimetizam as condições do ambiente da mucosa gastrointestinal onde há uma rica flora concorrente, e influenciam no curso da infecção. A mucosa gastrointestinal apresenta variação de pH de ácido para básico e menor tensão de oxigênio.Fonte: Adaptado KLATT, 2014.

Os roedores adultos infectados por via oral com *Shigella* não desenvolvem a shigelose, uma vez que esta não possui a capacidade de colonizar o trato intestinal ou provocar a doença em roedores semelhante à causada em humanos devido a sua resistencia natural a infecção por *Shigella* spp. (VAN DE VERG et al., 1995; FERNADEZ, 2008).

A utilização do modelo de infecção pulmonar em murino apresenta uma boa adequação do comportamento da *Shigella* durante a colonização, abordando ainda aspectos da imunidade inata e adaptativa (VOINO; VOINO, 1961, VAN DE VERG et al., 1995). Fernadez et al. (2008) demonstrou que somente camundongos com quatro dias de vida são altamente susceptíveis à infecção oral por *Shigella* e desenvolveram lesões inflamatórias da mucosa do jejuno, muito semelhantes às observadas no cólon de pacientes disentéricos (BONGRAND et al., 2012).

O fenótipo da virulência *in vitro* é regulado frente às respostas de temperatura (37°C), osmolaridade, pH(Neutro) e tensão de oxigênio (SCHNUPF et al., 2012). Os estudos *in vivo* relacionam estes parâmetros aproximando-os ao microambiente do hospedeiro humano. Com base nos dados disponíveis é necessário utilizar um modelo animal que apresente características da infecção em humanos. O modelo animal por infecção intranasal em camundongos causando broncopneumonia é provadamente útil na investigação do fenótipo de virulência (BERNARDINI, 2001).

Um dos primeiros estudos em modelo animal realizado por Vono-Yasenetsky (1961) a análise histopatológica de pulmões infectados de camundongos revelou um influxo de neutrófilos, bactérias extracelulares e bactérias fagocitadas comprovando a infecção pulmonar dos murinos.

A indução de inflamação, conforme estudo realizado por Shim et al.(2007), após 24 horas do desafio apresentou que todas as cobaias infectadas com cepas invasivas de *Shigella* spp. desenvolveram disenteria bacilar caracterizada pela perda de peso, tenesmo, fezes líquidas misturadas com muco e sangue, enquanto que os grupos de controle infectados com PBS ou *Shigella* spp.cepa não-invasiva não apresentaram sintomas.

1.7 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA NA EXPRESSÃO GÊNICA

O método da PCR em tempo real utiliza corantes de fluorescência, sendo preciso e sensível para investigação da expressão de RNA através do seu correspondente cDNA na célula. É bastante utilizado para quantificação tanto absoluta como relativa. O corante SYBR Green I aumenta sua fluorescência cerca de 100 vezes a partir da sua ligação ao sulco menor do DNA de cadeia dupla. Esta amplificação de DNA, associada aos níveis de fluorescência, é

medida a cada ciclo, o que permite realizar uma quantificação armazenada no termociclador com um sistema ótico e software para análise (GELMINI et al., 2001).

A quantificação relativa descreve um PCR em tempo real na qual a expressão de um gene de interesse em uma amostra tratada é comparada com a expressão do mesmo gene em outra amostra sem tratamento. A expressão tem seus resultados representados como uma alteração de dobragem relacionando o experimento não tratado ao tratado. Um gene normalizador é utilizado para controle da variabilidade na quantificação relativa (NIKITINA et al., 2003).

A verificação de expressão gênica necessita da presença destes genes constitutivos que possam servir como normalizadores da expressão. Estes normalizadores devem ser expressos de forma independente das condições experimentais (grupo tratamento e grupo não tratado). A normalização de um gene é caracterizada pela expressão de genes uniformes em várias fases de desenvolvimento assim como em diferentes condições ambientais (YIN et al., 2001).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando os casos de shigellose no Brasil, vale destacar um estudo epidemiológico realizado por Cruz et al. (2014), os autores observaram que dentre as 1500 amostras fecais pediátricas com quadro diarreico severo, atendidas em Hospitais Públicos de Manaus – AM, 36 isolados foram diagnosticados como *Shigella* , sendo a espécie mais comum encontrada a *Shigella flexneri*. A analise molecular revelou que o gene de virulência mais frequente foi o *ipaBCD* seguido do *ipaH*. Observou-se que os fatores de virulência apresentavam uma correlação da subunidade da proteína *shET-1B* com complicações relacionadas à desidratação e do gene ipaH com febre e presença de sangue nas fezes. Estas amostras foram submetidas ao modelo pulmonar murino para avaliar a resposta do hospedeiro frente à variação de virulência. Frente às respostas dos camundongos, foi possível caracterizar cepas mais virulentas levando a um questionamento sobre os genes que estariam realmente expressos durante este processo invasivo (SERRA, 2013).

É fundamentando que a expressão dos genes de virulência por bactérias patogênicas é pouco explorada em estudos *in vivo*. Espera-se contribuir para o entendimento da virulência em amostras clínicas de *Shigella* selvagens do estado do Amazonas determinando a caracterização do perfil dos principais genes de virulência expressos de *Shigella* spp. No modelo experimental murino. Esta observância nas diferenças entre as cepas padrões e as selvagens, se presente, devem ser investigadas em relação as suas formas de atuação, demonstração da relação específica patógeno-hospedeiro na nossa região e estimulo as pesquisas nos mecanismos de profilaxia.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar e caracterizar a expressão dos principais genes de virulência associados à *Shigella* em modelo experimental murino.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes de virulência de sete amostras clínicas de *Shigella* expressos no processo invasivo;
- Quantificar a expressão dos genes de virulência de sete amostras clínicas de *Shigella* em relação à cepa padrão M90T.

4. METODOLOGIA

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA. O parecer consubstanciado sob o protocolo de pesquisas no uso de animais com recomendação final foi aprovado no dia 20/11/2015 com data final para 10/10/2016. Número do protocolo 018/2015 (**Anexo 1**).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Amostras clínicas e padrão de*Shigella* sp. foram selecionadas a partir das bacterioteca do grupo DCDIA (Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia) do Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz (ILMD-FIOCRUZ-Amazônia) para serem analisadas quanto aos fatores de virulência relacionados a invasão celular durante patogênese de infecções. Esta análise foi realizada após inoculação dessas cepas bacterianas em modelo animal (camundongo BALB/c), que após a indução da infecção foram monitorados durante um período de 48 horas, até manifestarem sinais de infecções. Após decorrido o período, os camundongos foram submetidos a eutanásia e remoção dos pulmões, para extração e expressão de genes de virulência (**Figura 12**).

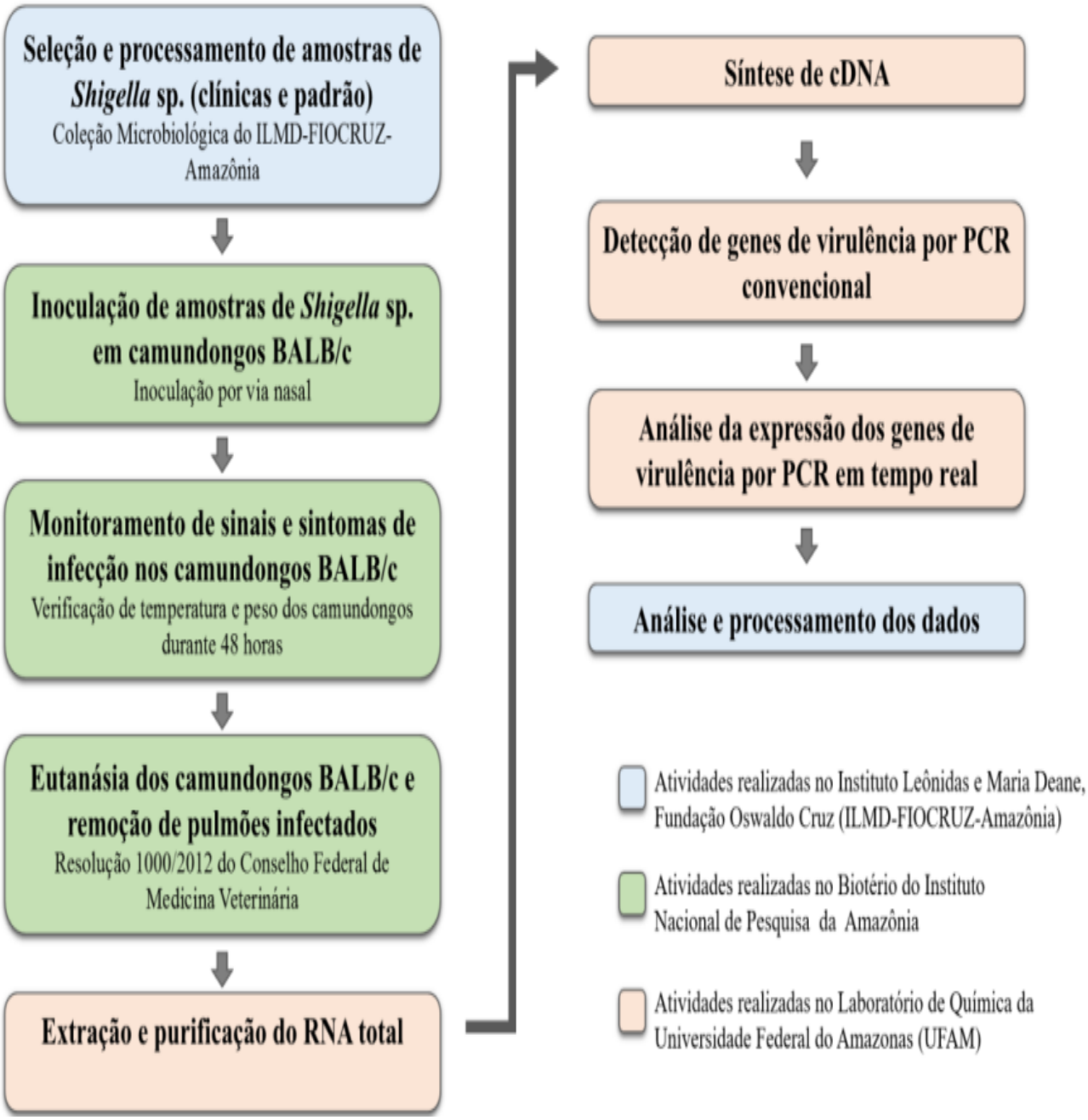


Figura 12: Fluxograma das atividades realizadas.**Legenda:** em azul, etapas realizadas no Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz (ILMD-FIOCRUZ-Amazônia); em verde, realizadas no Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e em vermelho, atividades realizadas no Laboratório de Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.3 AMOSTRAGEM

O estudo incluiu 135 camundongos, sete amostras clínicas, uma cepa padrão (M90T) e um controle negativo (solução salina). Cada amostra (clínicas e a M90T) assim como o controle negativo foram inoculados em cinco camundongos, totalizado 45 ensaios, caracterizando a replicata técnica. Esses ensaios foram repetidos em três períodos distintos, abril, maio e junho de 2016, o que totalizou 135 ensaios, caracterizando a replicata biológica (**Figura13**).

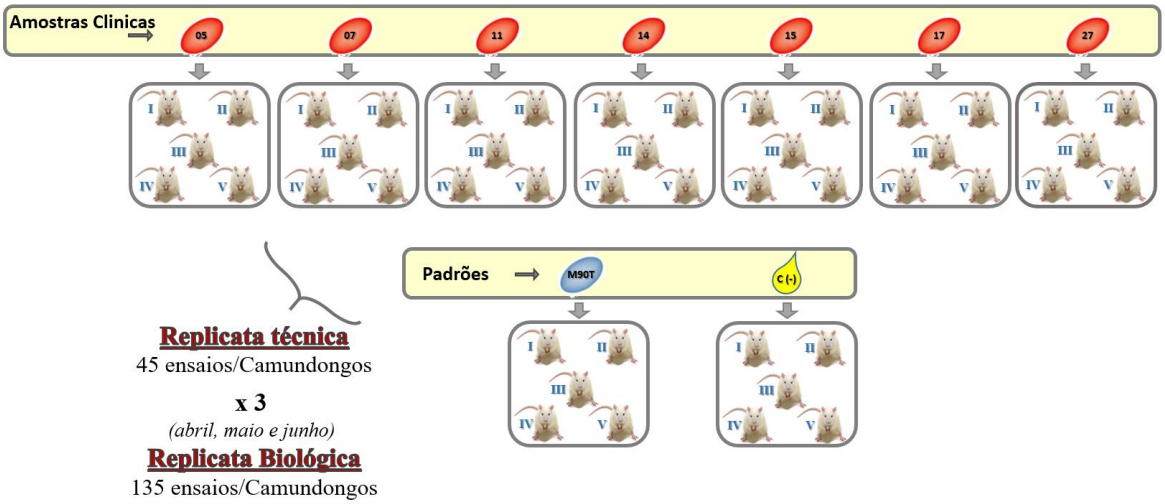


Figura 13: Figura esquemática demonstrando a amostragem das amostras clínicas e padrões inoculadas em camundongos. **Legenda**: Cada amostra de *Shigella* sp. (sete amostras clínicas: 05, 07, 11, 14, 15, 17 e 27 e uma cepa padrão:M90T) e um controle negativo foram inoculadas em cinco camundongos, totalizando 45 ensaios (Replicatas técnicas). Os 45 ensaios foram repetidos em três períodos distintos (abril, maio e junho), totalizando 135 ensaios/camundongos.

4.4 SELEÇÃO DE AMOSTRAS DE *Shigella* spp.

Foram selecionadas sete amostras de *Shigella* sp. a partir das bacterioteca do grupo DCDIA do instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz (ILMD-FIOCRUZ-Amazônia), as quais foram isoladas de amostras de fezes diarreicas, durante um estudo realizado com 1.500 crianças nos anos de 2007 a 2009, em Hospitais Públicos de Manaus/Amazonas dispostos na **Tabela 1** (DA CRUZ et al., 2014).

Tabela 1: Amostras de *Shigella* sp.selecionadas para estudo.

Registro das Amostras clínicas (Bacterioteca DCDIA)[a]
Cepa 5
Cepa 7
Cepa 11
Cepa 14
Cepa 15
Cepa 17
Cepa 27

Legenda: Amostras de *Shigella* ssp. cedidas pela Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi (Bacterioteca DCDIA, ILMD-FIOCRUZ-Amazônia)

A reativação das amostras foi realizada de acordo com as orientações ATCC para amostras microbiológicas congeladas a longo prazo indicado para utilização em biologia molecular, que consistiu em transferir alíquotas dos meios de cultura contendo amostras de *Shigella* sp. para caldo Luria Bertani (LB), que foi incubado a 37ºC sob agitação "*overnight*" (NCCLS, 2006).

A reconstituição e caracterização das amostras de *Shigella* sp. foram realizadas por metodologia clássica de isolamento de microrganismos, identificação bioquímica e perfil de resistência antimicrobiana. As técnicas moleculares de extração do DNA genômico e a amplificação de genes alvos por PCR foram necessárias para confirmação do gênero e espécie das amostras bacterianas estudadas.

4.5 SELEÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA DE *Shigella* sp.

Foram selecionados 17 genes de virulência da *Shigella* relacionados aos processos de invasão celular, os quais foram quantificados por PCR em tempo real e então comparados à *Shigella* M90T (cepa padrão). Os genes foram desenvolvidos conforme a ação dos fatores de virulência da bactéria em relação ao hospedeiro humano.

Os pares de iniciadores e normalizadores, assim como os genes alvos, estão listados nas **Tabelas 2** e **3**.

Tabela 2: Pares de iniciadores (*forward*e *reverse*) utilizados para quantificação da expressão dos diferentes genes de virulência associados à invasão celular.

GENES	INICIADORES	FUNÇÃO	PRODUTO	TM	REFERÊNCIA
Set1a	5`-ACATCCATATTCCCGGTCAG-3` 5`-GGGAGTTTGTTGGCATGAAC-3`	ShET 1	118	60	
Set1b	5`-CTCCTGTCATTCACGGTGTC-3` 5`-TCGGATAACAGCCATATCACA-3`	ShET 1	122	59	
Sena,	5`-GGACAGGCTGATGCAATCTT-3` 5`-CATCCATTATGCAAGGCTACAA-3`	Secreção de Ion	137	61,2	
Senb	5`-GCGTCCCTGCGTATCAGTAT-3` 5`-TCGGAATCCTGGCTGTAAAC-3`	ShET2	140	62,3	
Ipaa	5`-CGTGTTTCCTGAGCTGTTGA-3` 5`-AGGTGTAGGGAGGCCATCTT-3`	Despolimerização de Actina	91	61,2	
Ipab	5`-GCAGCGGGTGATGAAGTAAT-3` 5`-CCGCTTGTGTGGCAGAGTTA-3`	Indução de Apoptose	97	61,2	
Ipac	5`-TTTACTGCTGGCCTGACTGA-3` 5`-TTTACTGCTGGCCTGACTGA-3`	Polimerização de Actina	111	58,9	
Ipad	5`-TGGAACAATCGGCAAGGTAT-3` 5`-GTCGGCGTCAGAAGAGAAGT-3`	Complexo com IpaB	111	60,5	**Serra 2013**
Ipgd	5`-AGAGCTGTTGCTGCTCGTAAT-3` 5`-GTCGGCGTCAGAAGAGAAGT-3`	Desorganização da Membrana	137	62,8	
Vira	5`-CACTGCAATCTCTGCCTCTG-3` 5`-CCTTCACTGCTTGGAAGTGTT-3`	Desestabilização de Microtúbulos	144	61,3	
Mxi-sparegion	5`-TGTCTGAGGCAAAGAACTCAA-3` 5`-TTCTATCGTCCGTCCGAGAA-3`	Invasão e internalização	125	60,6	
Icsa	5`-TTCCGGTGGTAATGGAGGTA-3` 5`-CGAACGTGCCCTTATTGATT-3`	Nucleação de filamentos de actina	104	61,1	
Ipah	5`-TCGTCGGGAGGTTTCTACAC-3` 5`-GCAGAGACGGTATCGGAAAG-3`	Invasão	99	61,8	
Ipah7.8	5`-TACCGTCTCTGCACGCAATA-3` 5`-ACACGGTCCTCACAGCTCTC-3`	Escape de Macrófago	138	62	
Ipah4. 5	5`-TCGAC TCACGTTCTGCAATC-3` 5`-GGGCGATGGAGTGTATTCTG-3`	Desconhecido	110	62	
Virf	5`-AAGAGATGGCGTCTTTCTGAT-3` 5`-CAAGAAGGATTTGTTGAAATGTT-3`	Ativação da transcrição de virB e icsA	106	60,2	
Virb	5`-CGAATGTACGCGATCAAGAA-3` 5`-TCTACGAGTGCCATCCAGAA-3`	Ativação de ipas e mxioperons	137	59	

Tabela 3: Pares de iniciadores (*forward*e *reverse*) normalizadores para o PCR em tempo real.

GENES	INICIADORES	FUNÇÃO	PRODUTO	REFERÊNCIA
Rrsa	GAGCAAGCGGACCTCATA GGCATTCTGATCCACGATTAC	Estrutura celular - ribossomos	98 pb	
Ihfb	GGCGAGCGTATTGAAATC GCAGTTCTTTACCAGGTTTAA	Subunidade fator B host integration	142pb	
Cysg	TGTCTGATTGTCGGCGG ATGCGGTGAACTGTGGAA	Metabolismo – biossíntese de blocos de construção – cofatores- transportadores de moléculas pequenas	112pb	
Hcta	GCTGCTCGGCTTTCTCA CCAACCACGCTGACCAA	Estrutura celular - membrana	86pb	**Serra 2013**
Idnt	GCAGGGTTACCGACAAAT CTGTTTAGCGAAGAGGAGATG	Estrutura celular - membrana	152pb	
Gyrb	CCATCGCTTCGTCGTCT CCTTCTTCTATCGTCAGATGCC	Gyrase	123pb	

4.6 INICIADORES

Os iniciadores utilizados foram baseados de acordo com Serra (2013) no uso do Protocolo Operacional Padrão (POP) da Plataforma de Nanotecnologia da FIOCRUZ – RJ. Dos 17 genes estudados, 13 eram plasmidiais e quatro cromossomais. Os fatores de virulência disponíveis neste banco de dados possuem sequências referentes à região gênica das quatro espécies bacterianas de *Shigella*. Desta forma, quando selecionada, as sequências daquela região passaram por um processo de alinhamento usando o programa ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) para verificar se a sequência escolhida abrangia todas as espécies de *Shigella* .

Após a seleção, os iniciadores foram desenvolvidos ajustando a sequência alvo no programa *Primer* 3 (http://frodo.wi.mit.edu/), com alterações dos parâmetros *default*: A faixa de tamanho do produto (*ProductSize Range*), que ficou entre 90 a 150 pares de bases; o parâmetro *Max 3‘ Stability* que determina o número de bases C ou G permitido entre as últimas cinco bases do iniciador iniciou com o valor sete que permite que apenas um C ou G seja colocado nesta região. A modificação dos parâmetros *Max Self Complementarity* (MSC), *Max 3’ Self Complementarity*(M3SC) e *Max Poly-X* que influenciam na capacidade dos *iniciadores* formarem dímeros e grampos, os valores foram de MSC = 5, M3SC = 2 e M3SC = 3. Após submeter estas informações, o programa sugere conjuntos de possíveis iniciadores para a região desejada. Para comprovar sua eficácia, no entanto, os iniciadores foram verificados no programa *Primer* BLAST do NCBI.

No *Primer* BLAST do “Genbank” (NCBI - “National Center for Biotechnology Information”) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) foi realizada a simulação do desempenho do *iniciador*, como um PCR virtual. Os iniciadores indicados pelo *Primer* 3 foram inseridos no *Primer* BLAST, na seção “*Primer Parameters*” que possibilitou selecionar o organismo para o qual os iniciadores seriam utilizados. O “database” foi modificado para “nr”. Após a busca, foi obtido a demonstração do gene de interesse para o pareamento perfeito e assim a sintetização do iniciador.

4.7 MODELO ANIMAL

4.7.1 Modelo animal escolhido

Os camundongos Balb/C, fêmeas, com sete a 12 semanas de idade, isentos de agentes patogênicos, com peso variando de 18 a 25 g, foram adquiridos junto ao Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Durante os experimentos, os animais foram mantidos nas instalações do Instituto, sob condições livres de patógenos específicos e alimento/água *ad libitum*.

4.7.2 Tratamento experimental

Para viabilização desse estudo foram utilizados camundongos Balb/c que foram divididos em dois grupos, classificados como grupo "não tratado", os quais foram infectados com a cepa *S. flexneri* M90T Sm, que é comumente usado no laboratório para entender a base molecular da shigelose, e o grupo "tratado" infectados com as amostras clínicas de *Shigella* sp. (**Figura 14**).

Figura 14: Fluxo de procedimentos do desenho Experimental do Estudo.

A inoculação das cepas nos camundongos foi realizada por via nasal, que possibilitou identificar quais eram os principais genes de virulência expressos durante a infecção *in vivo* no intervalo curto de 48 horas.

A inoculação da cepa M90T nos camundongos do grupo "não tratado" foi realizado como referência para quantificação relativa, na qual a expressão demonstrada por essa cepa foi comparada àquela apresentada pelas amostras clínicas.

O ponto chave deste estudo foi a utilização de amostras clínicas que, comprovadamente, desencadearam a doença em crianças. Para viabilizar essa análise foi realizada a técnica de PCR em tempo real, que permitiu verificar a variabilidade dos genes analisados, quantificando sua expressão relativa.

Os experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Adolfo Jose da Mota e o seu grupo de pesquisa do Laboratório de Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

4.7.3 Preparo das cepas para inoculação

A reativação das cepas bacterianas foi realizada com o crescimento em 5 ml de caldo de soja Luria Bertani (LB - Himedia) sendo incubadas a 37ºC por 24 horas sob agitação. Após incubação foi quantificado em espectrofotômetro a concentração dos inóculos, e ajustada para a obtenção de suspensões contendo 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de cada amostra bacteriana.

4.7.4 Inoculação intranasal em camundongos Balb/C

A inoculação intranasal ocorreu no Biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Foram inoculadas por via intranasal 20µl de suspensões em Solução Salina a 0,9% (NaCl) contendo 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de cada amostra bacteriana em estudo nos camundongos Balb/C fêmeas com 7-12 semanas de idade. Antes da inoculação, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal de 60 a 80mg de ketamina (Dopalen, Vetbrands) em associação com 8 a 15mg de xilazina (Anasedan, Vetbrands) ambas por kg e realizada a assepsia local com etanol 70% conforme recomendado por Paiva et al., (2005).

4.7.5 Eutanásia e metodologia de retirada do pulmão

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

Os animais foram anestesiados com uma solução anestésica de ketamina (80mg. kg-1, i.p.) e xilazina (7,5 mg. kg-1, i.p.) por via intrabdominal. Após a realização de tricotomia na região torácica, eles foram colocados na mesa cirúrgica para pequenos animais. Realizou-se assepsia da região torácica com etanol a 70%. A seguir foi feita uma incisão longitudinal de dois cm na região torácica, e realizada a retirada dos dois lóbulos pulmonares. O órgão foi macerado, aliquotado em microtubos plásticos com solução de *Trizol®* (*Invitrogen, Life Technologies, USA*) e congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a sua retirada.

4.8 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PARA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS.

A cepa padrão M90T obteve crescimento *overnight* em caldo de cultura LB. Foi concentrada a amostra do caldo de cultura por centrifugação e ressuspendida em solução de lise. Adicionamos V/V de Acetato de Potássio. Após a incubação sob refrigeração, foi acrescentado álcool isopropilíco e realizada lavagem em etanol 100%. O *pellet* foi ressuspendido em TE-RNase (MOTA et al., 2009).

4.9 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

As amostras de tecido pulmonar dos camundongos foram inicialmente misturadas em microtubos com capacidade de 1,5mL, contendo solução de *Trizol®* e *bids* de vidro. Em seguida foram maceradas com auxílio de um homogeneizador de tecidos Precellys-Tissue Homogenizer (Bertin Corp).

Figura 15: Tecido fragmentado em equipamento PRECELLYS - TISSUE HOMOGENIZER e extracão pulmonar.

Depois de triturado, os fragmentos do pulmão foram extraídos com o reagente *Trizol®* (*Invitrogen, Life Technologies, USA*) seguindo as instruções do fabricante. Realizada a extração, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Biodrop®. Em seguida, uma alíquota de RNA foi submetida à eletroforese em gel desnaturante para verificação da integridade do RNA.

Confirmada a extração e integridade, as amostras passaram por um tratamento com *DNAseFreeRnase* (*Life Technologies, USA*) seguindo as instruções do fabricante e uma nova quantificação em espectrofotômetro foi realizada para a avaliação do rendimento da reação. Ao final da extração as amostras foram ressuspendidas em 30µl de água para biologia molecular (*Rnasefree*).

Para a determinação da concentração e da pureza do RNA foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), para quantificar a absorbância da amostra utilizando o comprimento de onda de 260 nm, pelo método da razão 280/260 nm. A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TEB 1X *Rnasefree* corado com brometo de etídio,o que possibilitou visualizar e foto documentar as amplificações sob luz ultravioleta.

4.10 PCR CONVENCIONAL

As amplificações dos genes alvo foram realizadas com o conjunto de reagentes Platynum Taq DNA Polymerase (Invitrogenby Thermo), em volumes de reação de 25µL, ajustada para as concentrações finais: 1x de tampão para PCR, 2,5µM de dNTPs, 0,2 µM de

cada par de iniciadores, 1U de taq polimerase, 10ng de DNA, 3,0mM de $MgCl_2$ para os genes *IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpagD, IpaH, IpaH4.5, IpaH7.8, Sen A, Sen B, Set1A, Set1B, Vir B, VirF, Vir A, Mxisparegion* e *Icsa*. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador ProFlex™ PCR System (AppliedBiosystemsbyThermo).

A reação de PCR foi realizada nos seguintes passos: desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, 30 ciclos composto das etapas de desnaturação inicial a 95°C por 15 segundos, 20 segundos para pareamento dos iniciadores, 1 minuto e 15 segundos de extensão a 72ºC, e extensão final de 7 minutos a 72°C. A temperatura de pareamento foi ajustada para 62 ºC para todos os pares de iniciadores.

Objetivando otimizar as reações da PCR em tempo real foram realizados previamente ensaios com DNA genômico em PCR convencional que continham 2,5 ng por tubo de amostras clínicas de *Shigella* , testadas sob gradiente de temperaturas (59°C, 60°C, 61°C, 62°C e 63°C) e gradiente de Mg2Cla fim de uniformizar a temperatura para todos os iniciadores na reação de PCR em tempo real em placas de 46 poços.

4.11 SÍNTESE DO cDNA

A cadeia de cDNA foi sintetizada utilizando“High-CapacitycDNA Reverse Transcription Kits” (Thermo Fisher Scientific, EUA) numa reação com volume final de 20 µL de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram preparados em placas de 96 poços com a diluição de RNA 1:10,para obter uma concentração final de 2µg de RNA.

Para a amplificação dos genes de virulência das bactérias, as amostras foram amplificadas com RT Random Primer. A mistura foi constituída de 10µl de RNA total, 0,8µl de dNTPs (100 ml) mix, 2,0µl de Rt *buffer* 10x, 2,0µl RTrandon primer 10x, 1,0ul *multiscribetranscriptase reverse*, 4,2 de H_2O *Rnasefree*, que foi incubada a 25°C durante 10 minutos para quebrar a estrutura secundária de RNA. Posteriormente, a ciclagem foi ajustada para 120 minutos a 37°C e finalmente 85°C por 5 minutos. A mistura foi arrefecida em gelo durante, pelo menos, 2 minutos. O produto da reação sofreu uma diluição 1:10 (10µl da amostra + 90µl de água para biologia molecular *Rnasefree*) após quantificação por absorbância, foi organizada em uma Placa de 96 poços somente de cDNA.

Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2%. O RNA total foi também utilizado diretamente, como um molde para PCR, para assegurar que não havia DNA contaminante. Testou-se o cDNA utilizando os iniciadores GAPD mouse em uma PCR

convencional, e, ao mesmo tempo, foi realizado dois testes controles com DNA genômico e água esterilizada. As condições de ciclo consistiram de um ciclo (95°C durante 3 minutos), seguido de 35 ciclos (95°C durante 15s; 62°C durante 20s; 72°C durante 15s) e por 72°C durante 7 min.

4.12 GENES DE REFERÊNCIA - NORMALIZADORES

Foram avaliados seis genes endógenos para determinar as referências internas mais estáveis da normalização na reação de PCR em tempo real. Estes genes puderam, ou não, serem expressos em todas as células ou em todas as diferentes condições de experimento, sendo então necessário validá-lo na amostra de DNA genômico antes de usá-lo no cDNA.

Os genes de manutenção utilizados foram *rrsA*, *ihfB*, *cysG*, *hctA*, *idnT* e *GyrB*. Estes genes de manutenção para normalização são expressos em níveis constantes nas amostras e sua expressão não deve variar em resposta à manipulação experimental. A seleção dos genes constitutivos que expressam produtos que desempenham função metabólica na célula foi obtida através da literatura bibliográfica correspondente.

4.13 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL

Entre os fatores que influenciam os resultados das análises em PCR tempo real podemos citar as concentrações de iniciadores e o perfil dos ciclos. Esta técnica requer otimização devido o excesso de iniciadores induzir a formação de dímeros e o aparecimento de produtos inespecíficos que interferem diretamente na amplificação dos produtos. Foram determinadas as melhores concentrações de desempenho de iniciadores para o ensaio. A concentração ótima dos iniciadores foi identificada a partir de nove diluições (**Tabela 4**).

Tabela 4: Utilização das nove diluições para padronização das reações de PCR em tempo real.

Iniciador *Reverse* (nM)	**Iniciador *Forward* (nM)**		
	100	**200**	**400**
100	100/100	200/100	400/100
200	100/200	200/200	400/200
400	100/400	200/400	400/400

Cada par de iniciadores foi testado, inicialmente em triplicatas, em concentração de 5pmol/µL nas amostras de DNA bacteriano e na cepa padrão da M90T. Em seguida os iniciadores foram testados nas concentrações de 100 nM, 200 nM e 400 nM. A escolha da concentração a ser utilizada nos ensaios foi baseada nos valores de cT(ciclo limiar), onde o menor valor foi selecionado, refletindo uma maior eficiência da reação. A análise da curva de dissociação também foi determinante na escolha da concentração de iniciador para as reações.

4.14 PCR EM TEMPO REAL

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Step One Plus™(Applied Biosystems, CA, EUA) com microplacas de 48 poços. As reações de 10µl continham 5µl de SYBR Green 1X, com o fluoróforo SYBR Green I, Taq polimerase, dNTPS, $MgCl_2$, tampão da enzima e os 5µl restantes foram adaptados entre amostra, iniciadores e H_2O (**Tabela 5**).

Tabela 5: Composição da reação de PCR em tempo real (Mix PCR)

Reagente	Concentração Final
dNTP (10 mM)	0,2mM
Iniciadoresquerdo (5pmol/µL)	Padronização
Iniciadordireito (5pmol/µL)	Padronização
MgCl2(50mM)	3mM
SYBR Green Mix	5u/L
Água Milli Q	3,4uL

Para a amplificação dos genes alvo foi realizada uma desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, e a curva *Melt* com 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto e finalmente 95°C durante 15 segundos. Todas as reações foram realizadas em triplicata e a média foi utilizada para cálculos posteriores. A análise da curva *Melt* foi realizada após cada ensaio em PCR em tempo real para confirmar a ausência de dímeros de iniciadores.

O processo foi realizado pela quantificação em tempo real e baseado na transcrição reversa seguida da PCR com a incorporação de moléculas fluorescentes covalentemente ligadas aos nucleotídeos, as quais podem ser quantificadas durante a cinética da reação. Os produtos formados foram monitorados a cada ciclo, o que permite uma detecção rápida e precisa dos produtos amplificados. Foi preparada uma área de trabalho exclusiva para manipulação destas amostras. No fluxo laminar ligando a UV, tratamento com etanol a 70% e solução Rnase free para todos os equipamentos e materiais utilizados.

Foram adicionados 9µLde Mix PCR e 1µL (25ng/µL) de cDNA de cada amostra em respectivas cavidades da placa e posteriormente homogeneizadas e centrifugadas. As amostras foram transferidas para o aparelhoStepOnePlus™e ajustado a um programa de amplificação para o gene específico de interesse. As etapas consistiram de pré-incubação, amplificação, curva de *melting* e resfriamento.

4.15 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados foram analisados no t-Teste ou análise de variância (ANOVA) de Student para avaliar a significância com $p < 0,05$ considerada significativa.

5. RESULTADOS

5.1 Definição das amostras bacterianas

As amostras clínicas selecionadas para o estudo foram caracterizadas com critério de invasão *in vitro*, no qual todas as amostras deveriam apresentar fenótipo invasivo em célula HEp-2. Adicionalmente, foi avaliado o perfil de virulência das cepas clínicas por PCR convencional realizado em estudos anteriores por nosso grupo de pesquisa (CRUZ et al., 2014) (**Tabela 6**).

Tabela 6: Descrição das amostras clínicas de coleções microbiológicas da FIOCRUZ-Amazônia selecionadas para o estudo (CRUZ et al., 2014).

Identificação/ Amostra Clínica	Espécie	Gene de Virulência
5	*S. flexneri* (90%)	*ipaBCD, shET1A, shET1B, ial, evt e uidA*
7	*S. flexneri* (99%)	*ipaBCD*
11	*S. boydii* (91%)	*ipaBCD, shET1B, ial, virF, evt, invE e uidA*
14	*S. sonnei* (89%)	*ipaBCD, ipaH, shET1A, ial e uidA*
15	*S. flexneri* (99%)	*ipaBCD*
17	*S. boydii* (91%)	*ipaBCD*
27	*S. flexneri* (92%)	*ipaBCD, ipaH, shET1A, shET1B, shET2, ial, virF e uidA*

5.2 Infecção pulmonar dos camundongos Balb/c.

Os camundongos inoculados com as amostras clínicas de *Shigella* sp. apresentaram infecção após 24 horas, que foi evidenciada por alteração fisiológicas na temperatura corporal e peso dos camundongos (**Tabela 7**). Os grupos infectados com as cepas 11 e 14 assemelharam-se no aumento da temperatura corporal durante o quadro infeccioso. Após 48h de infecção foi realizada a eutanásia do grupo testado. Os animais infectados com todas as cepas testadas tiveram uma perda significativa na massa corporal em relação ao peso inicial (**Gráfico 1**e **Figura16**).

Tabela 7: Verificação da infecção dos camundongos BALB/c através dos parâmetros de temperatura e pesagem corporal, 24 horas de infecção pulmonar.

	Replicatas Técnicas	1ª Replicata Biológica		2ª Replicata Biológica		3º Replicata Biológica	
		Peso (gr)	Temp.^{0}C	Peso(gr)	Temp.^{0}C	Peso(gr)	Temp.^{0}C
GRUPO NEGATIVO	I	19,94	36	18,37	36,2	18,30	35,5
	II	18,09	36	18,03	36,6	19,85	36,6
	III	18,19	36,3	18,54	36,8	18,45	35,6
	IV	22	36	18,9	36,5	19	36
	V	21	36	18	36,3	21	36,4
M90T	I	16,39	36,7	16,30	37,7	16,21	37,4
	II	16,04	37	17,46	37,6	15,4	37,6
	III	15	37,6	17,78	37,6	16,8	37
	IV	14	37,1	16,78	37,1	15,8	37,5
	V	15	37,5	15,7	37,6	16	37,3
GRUPO/ Cepa 05	I	18	37,1	18,29	37,1	19,24	37
	II	16	37,1	16,82	37,1	16,71	37,4
	III	18,76	37.3	18.47	36.3	17.45	37
	IV	17	37,4	16	37,3	16	36,9
	V	16	37	16.5	37.4	16.2	37
GRUPO/ Cepa 07	I	16,28	37,5	17,45	37,5	15,52	36,9
	II	15,7	37,5	17,59	37,5	15,75	37,6
	III	15.22	35,9	16,37	36,9	14,69	37,5
	IV	15	37	16	36.9	16	37
	V	16	37,1	16,4	37	15,6	37,1
GRUPO/ Cepa 11	I	15.66	37	17,66	37,3	17,17	36,6
	II	15.07	37,5	18,07	37,4	17,24	36,6
	III	14.98	37,4	16,98	37,22	17	37,2
	IV	15	37	16	37	16,5	37
	V	16	37,5	16,54	37	16,8	37
GRUPO/ Cepa 14	I	17,50	33,2	17.80	33,2	17,50	37,5
	II	16,84	35,6	18,88	35,6	18,95	37,4
	III	17,44	37,7	18,65	37,7	18,22	37,5
	IV	17	37	17	37,7	17	37,6
	V	16,5	37,6	18	37,5	17,5	37,3
GRUPO/ Cepa 15	I	16,0	37,6	21,42	37,6	17,38	37,3
	II	17,0	36,6	24,47	37,6	15,66	37,1
	III	16,5	36,9	18,22	37,1	18,96	37,5
	IV	16,6	37,0	16,0	37	16,7	37,6
	V	17,0	37,5	17,4	36	16,7	37
GRUPO/ Cepa 17	I	16	32,2	16,98	37,2	14,59	36,9
	II	16,39	36,2	15,04	37,2	15,6	37,5
	III	16,34	36,6	18,86	37,6	17	37,6
	IV	16,6	36,7	16,78	37	16,78	37,5
	V	16	36,5	17	37,5	16	37,4
GRUPO/ Cepa 27	I	17,45	37,4	17,76	37,4	15,81	37,3
	II	18	37,1	17,32	37,1	16,21	37,2
	III	17,22	37,9	18,57	37,9	16,74	37,2
	IV	17,5	37	17,16	37,2	17	37,6
	V	16	37,3		37,6	16,46	36,9

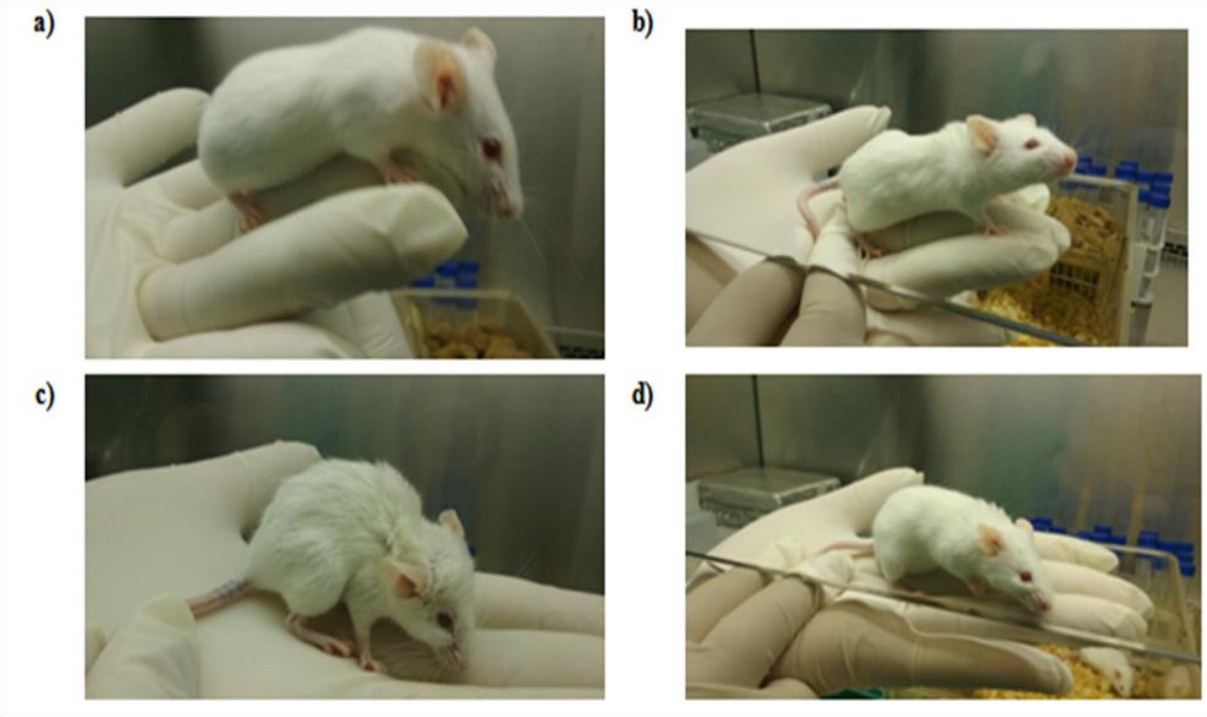


Figura 16: Imagens representativas dos camundongos Balb/c após 24 horas de infecção pulmonar com as cepas 7, 11, 15 apresentando alteração de pelagem . a) Controle Negativo; b) Amostra clínica 7; c) Amostra clínica 11; d) Amostra clínica 15.

Os pesos corporais dos nove grupos de estudo não apresentaram diferença discrepante ficando a média de 19,17 gramas (**Gráfico 1**). No entanto, a pequena redução no peso corporal após a infecção evidencia o sucesso da inoculação intranasal.

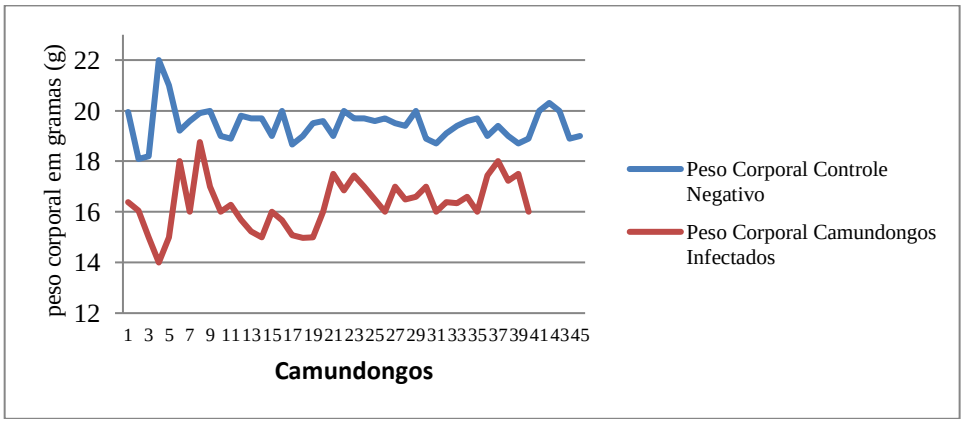


Gráfico 1: Média de variação de peso em gramas, dos grupos de amostras clínicas infectadas nos camundongos da segunda replicata biológica.

A temperatura corporal dos camundongos Balb/c variaram em torno de 35,2°C a 36,5° C antes da inoculação intranasal. Os valores verificados para temperatura registram um aumento dentro de 24 horas após inoculação (**Gráfico 2**). Na segunda replicata biológica

apenas dois camundongos não apresentaram aumento de temperatura corporal no grupo das amostras clínica 14 e 17.

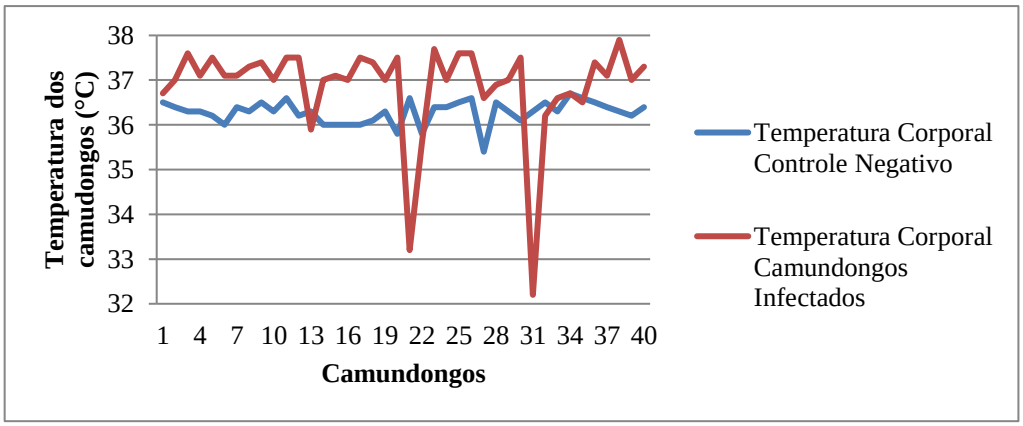


Gráfico 2: Representação da variação de temperatura, em graus celsius , dos grupos de cepas clínicas infectadas nos camundongos da segunda replicata biológica.

Um perfil de comportamento foi observado nos grupos após a infecção, os camundongos não exploravam o ambiente, não buscavam alimentos e nem água. Além de apresentarem sintomas como calafrios e pelos eriçados.

Houve presença de secreção ocular nas cobaias dos grupos de cepas clínicas número 5, 14 e 27. A secreção ocular faz parte de um método de verificação de virulência conhecido como Teste de Sèreny, onde são realizadas inoculações oculares em modelo animal para a indução de ceratoconjuntivite, quanto maior o grau, maior o perfil invasivo da bactéria. Este fato foi observado em todas as três replicatas biológicas. Nosso grupo de pesquisa em trabalho anterior observou os mesmos sintomas oculares pressupondo que o hábito que os camundongos possuem de esfregar os olhos tenha favorecido a contaminação ocular com a secreção nasal, porém devido à falta de padronização este sintoma não pode ser associado à virulência.

5.3 Avaliação da eficiência dos iniciadores

Os resultados foram analisados para o formato da PCR em tempo real e as condições das reações previamente estabelecidas. Os géis de eletroforese em agarose 2% foram produzidos e avaliados. Cada banda de *amplicon* foi observada de acordo com o padrão da temperatura a 62°C e concentração de 3mM de MgCl (na PCR convencional) acordando com a composição do reagente fluoróforo SYBR Green I. O desenho da placa para 48 ensaios com

9 pares de iniciadores diferentes, sendo um destes um iniciador constitutivo, foi determinado a fim de encontrarmos as mesmas condições de reação na PCR em tempo real. A ausência de formação de *hetero dimer* ou *self dimers* foi a metodologia utilizada para a caracterização da eficiência dos pares de iniciadores. Foi verificado no gel de agarose 2% a presença de *dimers* para os iniciadores IpaH 7,8; IpaH 9,8; eIcsa; set1A e SenA no gradiente de temperatura e no gradiente de $MgCl_2$ nas condições de: 1,5 $MgCl_2$/58°C;1,5 $MgCl_2$/59°C; 2,0$MgCl_2$/58°C; 2,0 $MgCl_2$/59°C; 2,5 $MgCl_2$/59°C; 2,5 $MgCl_2$/60°C.

Os iniciadores senA, ipaA, ipaB, ipaC, ipaD, virA, mxi-sparegion, icsA, ipaH7.8, ipaH4.5, virF, virB, IpagD, set1A, set1B, senB e o ipaH foram otimizados em 3,0 $MgCl_2$/62°C.

5.3.1 Padronização das reações da PCR em Tempo Real

As condições impostas para a padronização dos pares de iniciadores da pesquisa para a PCR em tempo real foram alcançadas para os genes *ipaA, ipaB, ipaC, ipaD, virA, mxi-sparegion, icsA, ipaH7,8; ipaH4,5; ipaH, virF, virB, IpagD, set1A, set1B, senB* e *o senA*. Obtivemos resultados associados de análise *in silico* na ferramenta oligoanalyzer IDT e na avaliação da curva de dissociação nos ensaios de PCR em tempo real. A análise *in silico* demonstrou índices de ΔG *heterodimer*/ *self dimer* iguais e/ou maiores à -7,05/-9,36 respectivamente, sendo estes considerados valores diretrizes para a presença de estruturas secundárias nos iniciadores IpaH 7,8; Icsa; Set1A, SenA e IpaD em PCR em tempo real (**Tabela 8**).

Tabela 8: Resultados da análise *in silico* dos genes *IpaH 7,8; IpaH 9,8; Icsa; Set1A; SenA* e *IpaD* valor do ΔG *heterodimer*/ *self dimer*no ProgramIDT DNA.

Gene	Sense	Anti-sense	*Hairping ΔG*	*Heterodimer*	*Selfdimer*
IpaH 7,8	TACCGTCTCTGCACGCAATA	TACCGTCTCTGCACGCAATA	.0,9	-7,05	-9,36
IpaH 9,8	TACCGTCTCTGCACGCAATA	TACCGTCTCTGCACGCAATA	.0,9	-7,05	-9,36
Icsa	TTCCGGTGGTAATGGAGGTA	CGAACGTGCCCTTATTGATT	0,45	-9,75	-4,67
Set 1A	ACATCCATATTCCCGGTCAG	GGGAGTTTGTTGGCATGAAC		-9,75	-7,71
SenA	GGACAGGCTGATGCAATCTT	CATCCATTATGCAAGGCTACAA	-1,57	-7,05	-7,05
IpaD	TGGAACAATCGGCAAGGTAT	TCGCCATTTCCACCTAGATT	0,68	-3,61	-8,54

Após esta análise *in silico* os dados nos evidenciaram uma interação potencial entre os componentes da PCR, incluindo auto-dímero em todas as amostras da pesquisa tanto para cDNA quanto DNA genômico e optamos por considerar uma possível exclusão destes iniciadores do estudo com intuito de não comprometer os ensaios de quantificação relativa. Os resultados obtidos para os demais genes da pesquisa reproduziram com eficiência a capacidade de iniciar uma reação em PCR convencional e em tempo real na temperatura de pareamento igual a 62°C e na concentração de 3mM de $MgCl_2$.

5.3.1.1 Relação dos iniciadores após análise *in silico*.

As sequências de todos os iniciadores após ensaios em PCR convencional foram listadas de acordo com a eficiência na condição estabelecida. A maioria dos pares de iniciadores obteve bons resultados com tamanho esperado de *amplicon* e ausência de bandas inespecíficas. Exceto cinco pares de iniciadores indicados na **Tabela 9** e **10**.

Tabela 9: Lista dos genes plasmidiais selecionados e otimizados para PCR em tempo real com DNA genômico da padrão M90T *Shigella* .

Gene Plasmidias	Sense	Anti-sense	Otimização
SenA	GGACAGGCTGATGCAATCTT	CATCCATTATGCAAGGCTACAA	Observação*
IpaA	CGTGTTTCCTGAGCTGTTGA	AGGTGTAGGGAGGCCATCTT	Otimizado
IpaB	GCAGCGGGTGATGAAGT:AAT	CCGCTTGTGTGGCAGAGTTA	Otimizado
IpaC	CGTGCAACAATGGAAACATC	TTTACTGCTGGCCTGACTGA	Otimizado
IpaD	TGGAACAATCGGCAAGGTAT	TCGCCATTTCCACCTAGATT	Observação*
IpgD	AGAGCTGTTGCTGCTCGTAAT	GTCGGCGTCAGAAGAGAAGT	Otimizado
VirA	CACTGCAATCTCTGCCTCTG	CCTTCACTGCTTGGAAGTGTT	Otimizado
Mxi-sparegion	TGTCTGAGGCAAAGAACTCAA	TTCTATCGTCCGTCCGAGAA	Otimizado
IcsA	TTCCGGTGGTAATGGAGGTA	CGAACGTGCCCTTATTGATT	Observação*
IpaH4.5	TCGAC TCACGTTCTGCAATC	GGGCGATGGAGTGTATTCTG	Otimizado
VirF	AAGAGATGGCGTCTTTCTGAT	CAAGAAGGATTTGTTGAAATGTT	Otimizado
VirB	CGAATGTACGCGATCAAGAA	TCTACGAGTGCCATCCAGAA	Otimizado
IpaH7,8	TACCGTCTCTGCACGCAAT	ACACGGTCCTCACAGCTCTC	Observação*

Observação* - Presença de bandas inespecíficas

Tabela 10:Lista dos genes cromossomais selecionados e otimizados para PCR em tempo real.

Gene Cromossomais	*Sense*	*Anti-sense*	Otimização
Set1A	ACATCCATATTCCCGGTCAG	GGGAGTTTGTTGGCATGAAC	Observação*
Set1B	CTCCTGTCATTCACGGTGTC	TCGGATAACAGCCATATCACA	Otimizado
SenB	GCGTCCCTGCGTATCAGTAT	TCGGAATCCTGGCTGTAAAC	Otimizado
IpaH	TCGTCGGGAGGTTTCTACAC	GCAGAGACGGTATCGGAAAG	Otimizado

Observação* - Presença de bandas inespecíficas

5.3.1.2. Análise *in silico* dos iniciadores de interesse em DNA Genômico de *Mus musculus*

Foi realizada análise de bioinformática no banco de dados NCBI com os 18 pares de iniciadores dos fatores de virulência de *Shigella* spp. para verificar correspondência na sequência do DNA genômico de *Mus musculus* (camundongo). Apenas três genes obtiveram possíveis interações *in sílico* com *Mus musculus* (**Tabela 11**).

Tabela 11: Resultados da análise *in silico* dos iniciadores de *Shigella* utilizados no PCR real time pareados no DNA de *Mus musculus* (camundongo)

set1A		
Mus musculus DNA segment, Chr 7, ERATO Doi 443,		
SENSE	**Score**	**Identities**
Mus musculus chromosome 5, clone RP24-161C20, complete sequence		
ANTISENSE	**Score**	**Identities**
GGGAGTTTGTTGGCATGAAC	36.2 bits(18)	18/18(100%)
set1B		
Mus musculus BAC clone RP23-174N20 from		
SENSE	**Score**	**Identities**
CTCCTGTCATTCACGGTGTC	34.2 bits(17)	17/17(100%)
Mus musculus chromosome 3, clone RP24-125L17, complete sequence		
ANTISENSE	**Score**	**Identities**
TCGGATAACAGCCATATCACA	34.2 bits(17)	17/17(100%)
senA		
Mouse DNA sequence from clone RP23-23B17 on chromosome X, complete sequence		
SENSE	**Score**	**Identities**
GGACAGGCTGATGCAATCTT	34.2 bits(17)	17/17(100%)

Mus musculus 10 BAC RP23-324E2 (Roswell Park Cancer Institute (C57BL/6J Female) Mouse BAC Library) complete sequence		
ANTISENSE	**Score**	**Identities**
CATCCATTATGCAAGGCTACAA	32.2 bits(16)	16/16(100%)

A análise do programa Blast revela a especificidade dos pares de iniciadores dos fatores de virulência da *Shigella* durante a execução da PCR em tempo real. Os *amplicons* resultantes no NCBI após pareamento do iniciador bacteriano no DNA genômico do murino são constituídos de uma única banda ou pareados em cromossomos diferentes.

Devido a reação da PCR em tempo real exigir a presença de dupla fita para o atrelamento do syber Green e posterior emissão de fluorescência capturado pelo equipamento foi possível visualizar através do gráfico da curva de dissociação que não obtivemos liberação de fluorescência inespecífica, para os iniciadores IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, virF, virB, senA, ipagD, virA, ipaH7,8, ipaH4,5.

A presença de amplicons longos e bandas únicas de DNA verificada após a análise *in silico* nos fez proceder na análise da curva de dissociação nos iniciadores Set1A, Set1B, Sen A e Sen B (Melt curve – **Figura 17**). Para estes iniciados não obtivemos amplificações em nenhuma das amostras clínicas de cDNA.

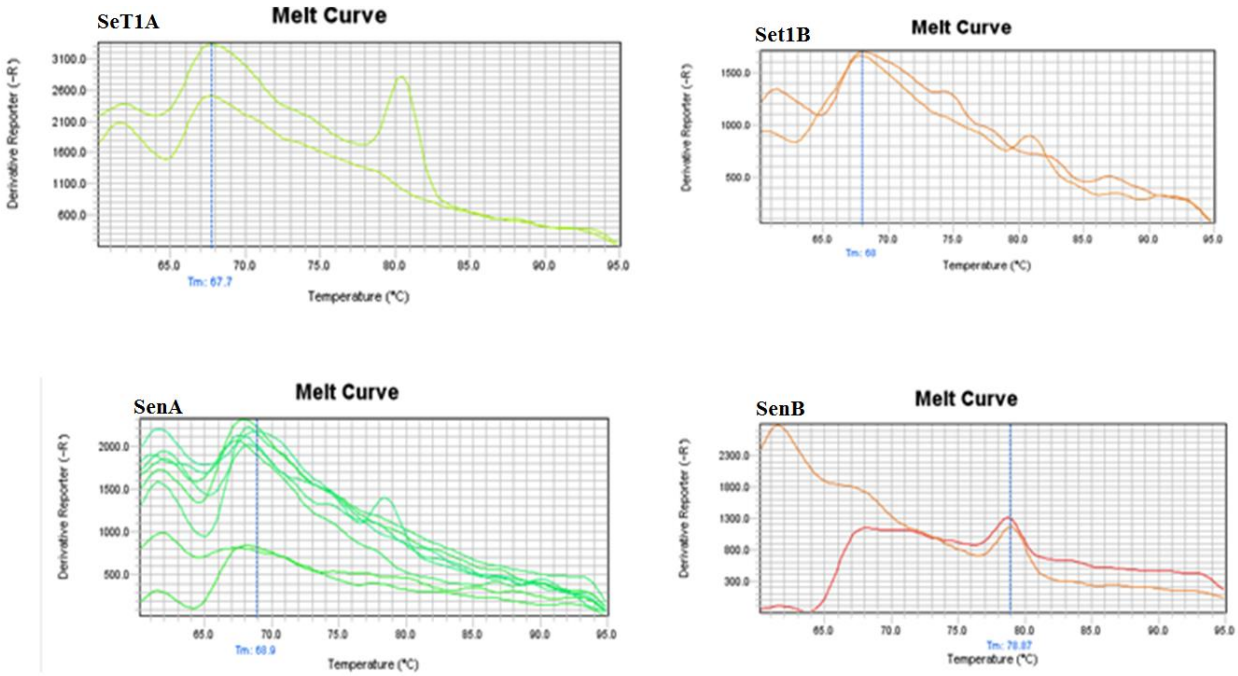


Figura 17: Curvas de dissociação fora do padrão dos Iniciadores. PCR em tempo real com amostras de cDNA a partir da infecção por cepa padrão da *Shigella* M90T

A formação destes *amplicons* torna possível a origem de *self-dimer*, *heterodimer* e outras estruturas, caracterizando ruídos anteriores ao ciclo limiar (o numero de ciclo em que a fluorescência gerada dentro de uma reação ultrapassa o limiar da fluorescência) e a redução de eficiência na reação, porém devemos considerar igualmente os fatores relativos ao processo biológico durante a infecção do hospedeiro pelo patógeno para elucidar a supressão de transcritos para estes genes.

5.3.1.3. Padronização das concentrações dos iniciadores da PCR em Tempo Real.

Foram determinadas as condições da padronização da PCR em tempo real através de ensaios em 20 placas de 48 poços. As variações das concentrações de iniciadores *sense* e *antisense* escolhidas foram as que apresentaram melhor eficiência com o DNA genômico da cepa padrão M90T (**Tabela 12**).

Tabela 12: Concentrações de *primes sense* e *anti-sense* de todos os iniciadores do estudo. **N**= ausência de amplificação.

Gene	**Iniciadores (*sense*)**	**Conc.**	**Iniciadores (anti-*sense*)**	**Conc.**
Sena	GGACAGGCTGATGCAATCTT	200	CATCCATTATGCAAGGCTACAA	200
Ipaa	CGTGTTTCCTGAGCTGTTGA	100	AGGTGTAGGGAGGCCATCTT	100
Ipab	GCAGCGGGTGATGAAGT:AAT	100	CCGCTTGTGTGGCAGAGTTA	100
Ipac	CGTGCAACAATGGAAACATC	100	TTTACTGCTGGCCTGACTGA	200
Ipad	TGGAACAATCGGCAAGGTAT	200	TCGCCATTTCCACCTAGATT	200
Ipgd	AGAGCTGTTGCTGCTCGTAAT	200	GTCGGCGTCAGAAGAGAAGT	200
Vira	CACTGCAATCTCTGCCTCTG	100	CCTTCACTGCTTGGAAGTGTT	100
Mxi-sparegion	TGTCTGAGGCAAAGAACTCAA	N	TTCTATCGTCCGTCCGAGAA	N
Icsa	TTCCGGTGGTAATGGAGGTA	200	CGAACGTGCCCTTATTGATT	200
IpaH4.5	TCGAC TCACGTTCTGCAATC	200	GGGCGATGGAGTGTATTCTG	200
Virf	AAGAGATGGCGTCTTTCTGAT	100	CAAGAAGGATTTGTTGAAATGTT	200
Virb	CGAATGTACGCGATCAAGAA	100	TCTACGAGTGCCATCCAGAA	200
Set1a	ACATCCATATTCCCGGTCAG	200	GGGAGTTTGTTGGCATGAAC	100
Set1b	CTCCTGTCATTCACGGTGTC	100	TCGGATAACAGCCATATCACA	100
Senb	GCGTCCCTGCGTATCAGTAT	200	TCGGAATCCTGGCTGTAAAC	200

IpaH	5`-TCGTCGGGAGGTTTCTACAC-3`	100	5`-GCAGAGACGGTATCGGAAAG-3`	100

A diferença calculada de cT, a amplificação não específica e a formação de dímeros de iniciadores são, muitas vezes, dependentes da concentração de iniciador. As concentrações determinadas pelo ensaio de PCR em tempo real foram avaliadas através de gel de agarose 2%, a presença de bandas inespecíficas foi um fator decisivo para desconsiderar a concentração do iniciador em questão. Variando as concentrações dos iniciadores observamos um efeito maior ou menor sobre o desempenho no ensaio de PCR em tempo real. Na **Figura 18** observamos as amplificações e as curvas de dissociação dos iniciadores IpaABCD já validados.

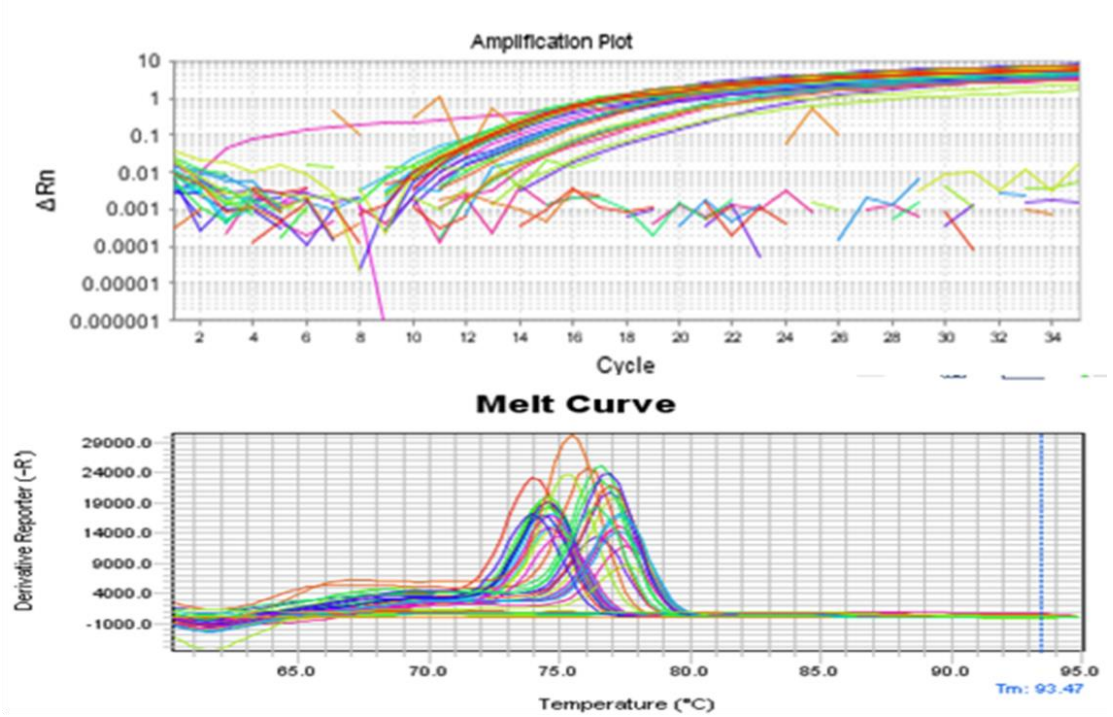


Figura 18: Imagem representativa da amplificação em triplicata dos iniciadores (AmplificationPlot). Melhores diluições da padronização do IpaABCD e curva de dissociação (curve de Melt) com DNA gênomico da M90T.

5.3.1.4. RNA e cDNA obtido para verificação de Expressão Gênica.

As amostras dos tecidos pulmonares dos camundongos, obtidas das três replicatas biológicas, foram armazenadas e transportadas em nitrogênio líquido até o processo de trituração. O tecido pulmonar passou pelo método de extração com *Trizol*® seguindo as instruções do fabricante. Durante a realização do experimento algumas amostras de replicatas

técnicas foram perdidas. As amostras foram submetidas à quantificação em espectrofotômetro e fluorômetro os dados estão apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13: Resultado representativo da quantificação das amostras de RNA e cDNA.

Amostra cDNA	**Quantificação cDNA** Espectrofotômetro	**Qualidade cDNA 260/280**	**Quantif. RNA Fluorômetro**	**Amostra RNA**	**Quantificação RNA** Espectrofotômetro	**Qualidade RNA 260/280**	**Quantif. RNA Fluorômetro**
Amostra cepa **7**	2271,6 ng/uL	1,84	766 ng/mL	**Amostra cepa7**	37,2 ng/uL -1	1,95	620ng/mL
Amostra cepa **11**	1454,1 ng/uL	1,85	557 ng/mL	**Amostra cepa11**	30 ng/uL -1	2	1580 ng/mL
Amostra cepa **14**	1642,7 ng/uL	1,82	611 ng/mL	**Amostra cepa 14**	29 ng/uL	1,64	784 ng/mL
Amostra cepa **15**	3640,7 ng/uL	1,79	971 ng/mL	**Amostra cepa 15**	40 ng/uL -1	1,99	540 ng/mL
Amostra cepa **17**	2066,1 ng/uL	1,83	854 ng/mL	**Amostra cepa 17**	53 ng/uL -1	1,82	642 ng/mL
Amostra cepa **27**	1745,5 ng/uL	1,8	805 pg/mL	**amostra cepa 27**	16 ng/uL -1	1,6	560 ng/mL

No gel de agarose 2% corado em brometo de etidio foi confirmada a presença de uma análise de RNA íntegro, com pouca contaminação de DNA (ausência de brilho nos poços) (**Figura 19**). A concentração de RNA nas alíquotas depositadas apresentou bons resultados para a qualidade (260/280) do RNA e cDNA (**Tabela 13**). Demonstrando que o armazenamento em *Trizol*® e a extração foram eficazes, permitindo a padronização do experimento.

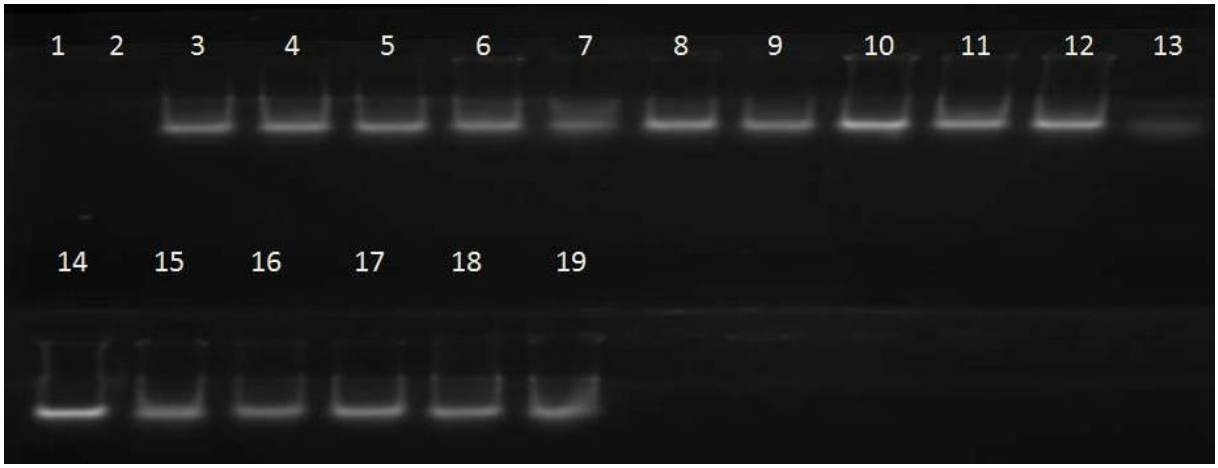


Figura 19: Gel de agarose com produto da extração de RNA.Legenda: Método de *Trizol*®, em destaque as subunidades de RNA procarioto 28S e 18S, concentração de 150ng (diluído 1:10).

Foi realizado o procedimento com *DNAse* e na sequencia realizado uma PCR com iniciador GAPD mouse em busca de inibidores (**Figura 20-A**). Foram evidenciados resultados consistentes que comprovam uma síntese de cDNA eficiente.

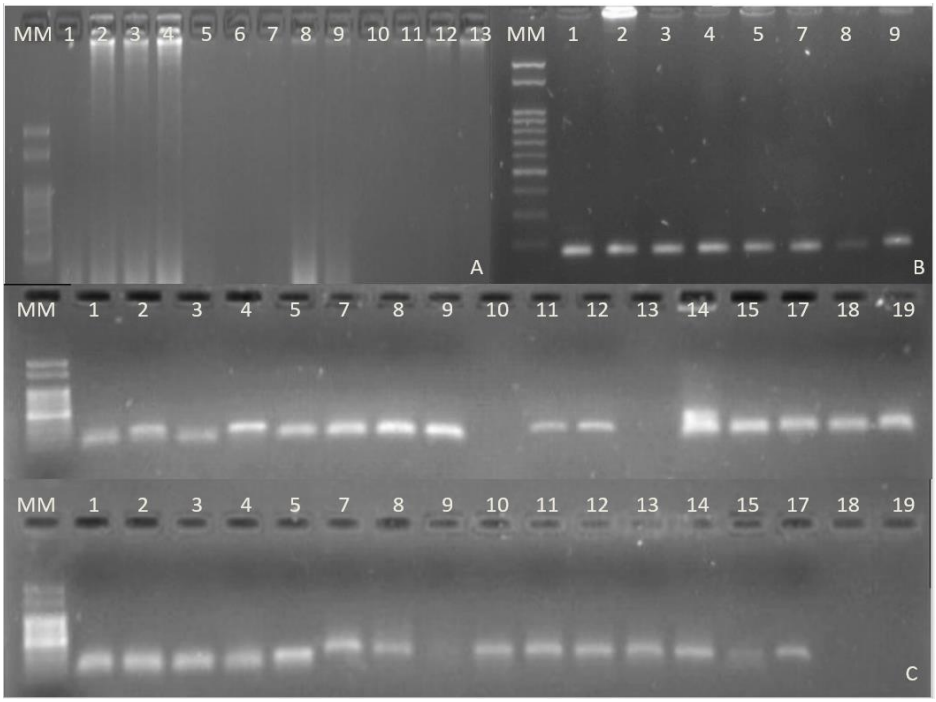


Figura 20: Gel de agarose 2%. **Legenda**-A-Produto da amplificação de RNA com iniciador GAPD mouse. B - Pesquisa de inibidores -Gel de agarose 2% com resultado da amplificação do gene GAPDH mouse, a partir do cDNA obtido da transcrição reversa de amostras de RNA total. C- Gel de agarose mostrando a amplificação do gene normalizador rrsa da bactéria, a partir do cDNA obtido da transcrição reversa de amostras de RNA total.

5.4. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS GENES DE INTERESSE

5.4.1 Método para Análise de Dados da Expressão Gênica em PCR em Tempo Real.

O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado como uma estratégia de quantificação relativa para análise quantitativa dos dados em tempo real na reação em cadeia da polimerase. Este método é uma maneira conveniente para calcular os níveis de expressão gênica relativos a tratamentos diferentes entre os grupos de estudo. Baseamos no pressuposto de 100% de eficiência da reação. É utilizado diretamente o ciclo limiar (*cT*) gerados pelo sistema e realizada a quantificação relativa. O valor normalizado deverá ser o $\Delta\Delta\ CT$ que é a diferença de ciclo limiar entre os genes-alvo e os genes de referência nas amostras bacterianas recuperadas do tecido pulmonar entre o grupo tratado e o grupo sem tratamento (**Figura 21**).

	AMOSTRA DE REFERÊNCIA Grupo não tratado	AMOSTRA CLÍNICA Grupo tratado
GENE NORMALIZADOR	cT M90T	cT amostras clinicas
GENE ALVO	cT M90T	cT amostras clinicas
ΔΔ *cT* = ΔcT Tratado (alvo)- ΔcT não tratado (referência)	ΔcT= (cT M90T gene Norm. – cT M90T gene alvo)	ΔcT= (cTamostra clinica gene Norm.- cT amostra clínica gene alvo)
ΔΔ *cT*	**ΔcT não tratado (referenc.)**	**ΔcT Tratamento (alvo)**
Expressão gênica : $2^{-\Delta\Delta CT}$		

Figura 21: Desenho experimental para cálculo da expressão gênica

5.4.2. Ciclo limiar dos genes normalizadores como controle endógeno (M90T) na quantificação em PCR em Tempo Real.

A expressão do gene alvo foi avaliada em relação ao gene de manutenção (normalizador). A expressão dos genes de referência, utilizados para confirmar dados de quantificação gênica relativa, permaneceu com seus níveis relativamente estáveis de cT em resposta ao grupo tratado (amostras clínicas) e grupo controle (M90T). Os genes *rrsA, ihfB, cysG, hctA, idnT e GyrB* são os mais comumente utilizados para a normalização dos dados PCR em tempo real em *E.coli*. A quantificação deste conjunto de genes diferencialmente transcritos foi encontrada constante em todas as amostras. Os pares de iniciadores constitutivos foram otimizados para as análises de expressão gênica na nossa pesquisa apresentaram o menor ciclo limiar nas reações e o menor desvio padrão evidenciando maior eficácia dentre os ensaios e suas respectivas diluições (**Gráfico 3**).

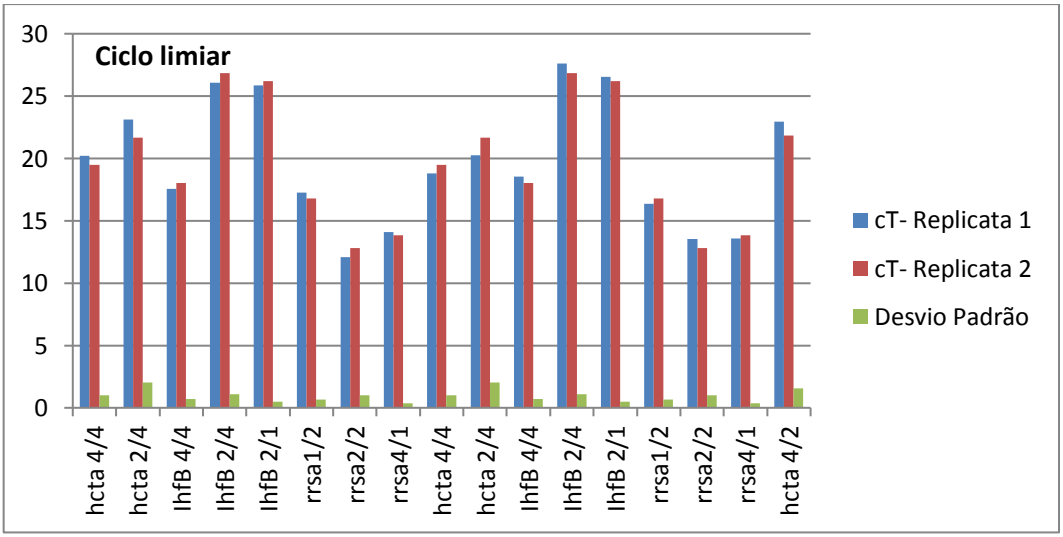


Gráfico 3: Desvio padrão dos cTs na amplificação dos genes normalizadores em PCR em tempo real. Dados representativos.

5.4.3. Curva de eficiência do iniciador contituinte no cDNA da cepa M90T

A quantificação foi realizada apartir de uma amostra de cDNA de interesse cuja concentração era conhecida. Foram feitas diluições das amostras em diferentes concentrações na base dois (1/2, 1/4, 1/8, 1/16) e foi realizada a PCR em tempo real delas para conhecer o ct de cada.

O ciclo limiar (cT), valor utilizado no cálculo da quantidade de molde durante a amplificação, está representado na curva com uma titulação (curvas tracejadas), que consiste em concentrações decrescentes a partir da quantidade inicial da amostra. Obtivemos um gráfico Ct por log da concentração após a diluição.

Os dados para a construção da curva foram gerados apartir de amostras de DNA genômico e cDNA obtido da cepa padrão M90T. Os resultados ficaram com cTs limiar próximo do valor 14 para amplificações com DNA genômico e para as os ensaios com cDNA perto de 26.

Através desta padronização da concentração inicial dos cDNA da M90T foi possível partirmos para elaboração da curva de eficiência do iniciador *rrsa* no experimento. Para obtenção da melhor eficiência com o valor mais próximo possível de 100%. A amplificação é exponencial e a diferença é de um cT para cada diluição realizada.

A **Figura 22** demonstra uma curva de eficiência encontrada nos ensaios com valores obtidos de cT com diferentes concentrações de cDNA.

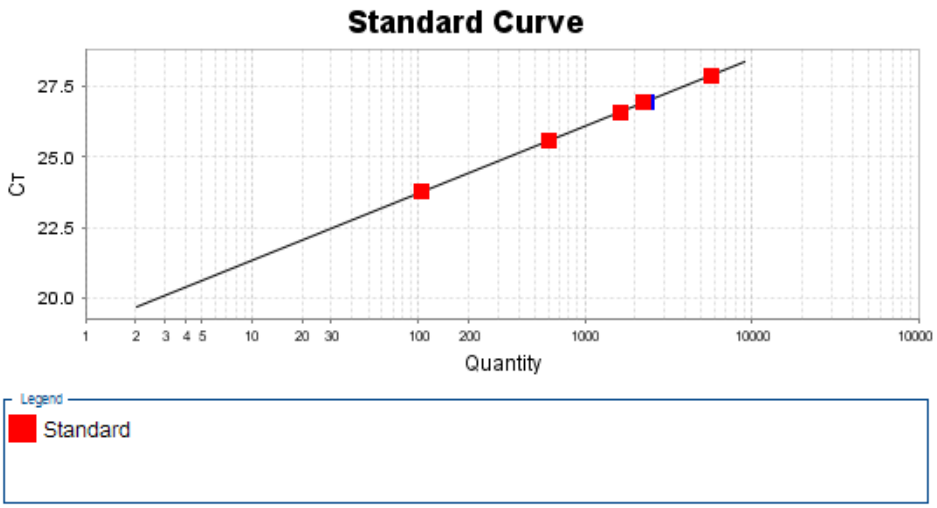


Figura 22: Imagem representativa do gráfico da curva de eficiência.**Legenda**: Genes normalizadores com amostra M90T de cDNA da *Shigella* spp recuperado de tecido pulmonar de *mus musculus* após 48h.

5.4.4. Expressão dos Iniciadores Cromossomais e Plasmidiais Envolvidos na Infecção Pulmonar em Modelo Murino.

5.4.4.1 Qualitativo

A transcrição dos 10 genes de virulência foi monitorada pela quantificação usando o sistema Syber Green com a cepa controle M90T. Uma vez padronizada, foi realizada a mesma condição para todos os genes transcritos durante a infecção 48 horas em modelo animal murino para as amostras clínicas estudadas. Os dez genes estão relacionados com antígenos plasmidiais de virulência, moduladores da resposta imunológica, reguladores de expressão gênica e codificadores de enterotoxina. Os controles endógenos testados (*ihfB, cysG, hctA, idnT, GyrB*) para nornalização, teve como gene selecionado o *rrsa*.

As amostras testadas com o cDNA apresentaram amplificação tanto para os iniciadores constitutivos como para os iniciadores de interesse em cada placa organizada para PCR em tempo real. Foi observado a curva de dissociação nos ensaios com cDNA e selecionados os experimentos com o maior padrão de eficiência possivel (próximo de 100%) na análise. Os pares de iniciadores utilizados para quantificação foram: ipaA, ipaB, ipaC, ipaD, virA, ipaH7, 8; ipaH4, 5, virF, virB e ipaH. A **Figura 23** evidencia a curva de dissociação otimizada e validada para estes genes.

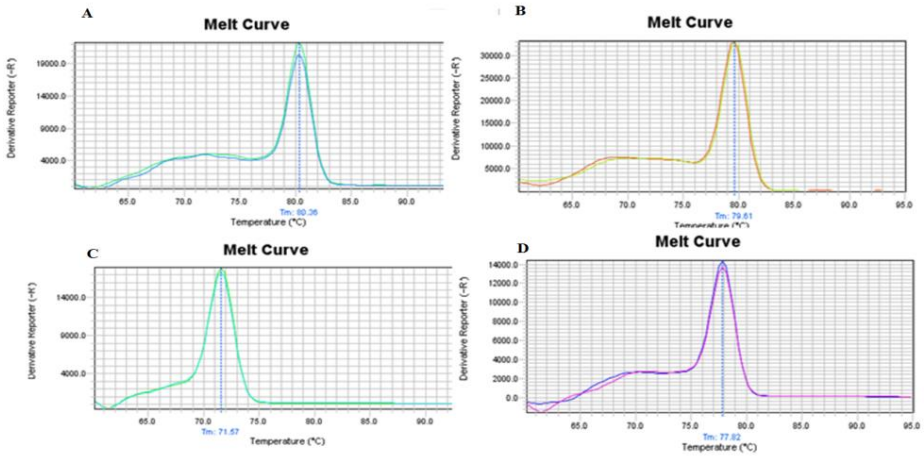


Figura 23: Imagem representativa dos perfis das curvas de dissociação dos genes de interesse exemplificando padrão de eficiência.(A) *IpaB*.(B) *Vir F*. (C) *IpaH 4,5*. (D) *IpaC*.

A descrição da presença e ausência de genes transcritos entre as cepas clínicas estão demonstradass na **Tabela 14**.

Tabela 14: Resultados da análise da curva de dissociação, amplificação e cT para cepa padrão M90T e amostras: 5, 7, 11,15,17 e 27

Iniciadores/ Função	Cepa 5	Cepa 7	Cepa 11	Cepa 14	Cepa 15	Cepa 17	Cepa 27	M90T
Plasmídeo antígeno de Invasão								
IpaA	■	■	■	■	■	■	■	■
IpaB	■	■	■	■	■	■	■	■
IpaC	■	■	■	■	■	■	■	■
IpaD	■	■	■	■	■	■	▒	■
mxi-sparegion	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
Regulação								
Vir F	▒	▒	■	■	▒	▒	■	■
VirB	▒	■	■	■	▒	▒	■	■
Disseminação								
Icsa	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
VirA	■	■	■	■	■	▒	■	■
Enterotoxinas								
SenA	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
SenB	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
Set1A	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
Set1B	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒	▒
Resposta Imunológica								
IpaH	■	■	■	■	■	■	■	▒
IpaH 4,5	▒	▒	■	■	▒	▒	▒	■
IpaH 7,8	■	■	■	■	■	■	■	▒
Ipgd	▒	■	▒	▒	▒	▒	▒	▒

Legenda: ▒: Ensaio não apresentou amplificação/ Curva de dissociação: Resultado não otimizado**.**
■**:**Ensaio apresentou amplificação/ Curva de dissociação: Resultado otimizado

O perfil transcricional dos genes *IpaA, IpaB, IpaC e IpaD*, os efetores constituintes do sistema três de secreção, apresentaram um ciclo limiar constante entre as amostras clínicas 5, 7, 11, 14, 15, 17 e M90T (**Gráfico 4**). Dentre os dez genes selecionados, quatro apresentaram o mesmo padrão de expressão: o sistema de secreção tipo III, o *IpaA, IpaB, IpaC e IpaD* em todas as cepas clínicas. Exceto a cepa 27 que apresentou ausência de amplificação para o *IpaD*.

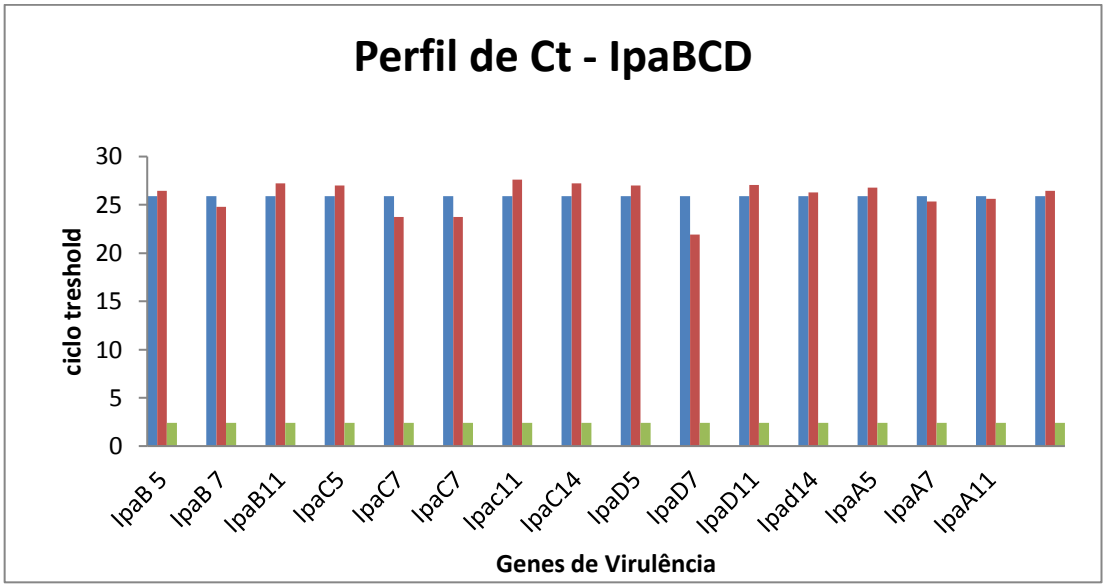


Gráfico 4: Perfil do valor de cT com diferentes genes de virulência (*IpaA, IpaB, IpaC e IpaD*) da *Shigella* spp em tecido pulmonar de *Mus musculus* após 48 horas da inoculação intranasal no cDNA recuperado das amostras clínicas 5, 7, 11 e 14. Medidos por PCR em tempo real. As barras verticais representam ct replicata 1, ct replicata 2 e a média ± DP.

Os genes previstos nas estratégias bacterianas para modular a resposta imunológica do hospedeiro: *IpaH, IpaH 4,5, IpaH 7,8 e IpgD* apresentaram distintos resultados entre as cepas. As amostras 5, 11, 14, 15, 17 e 27 apresentaram amplificação para o *IpaH e IpaH7,8*. A cepa padrão M90T foi exclusiva na transcrição de um único gene *IpaH 4,5* e a amostra clínica sete só não obteve transcritos para o gene *IpaH4,5* resultados demonstrados na **Gráfico 5**.

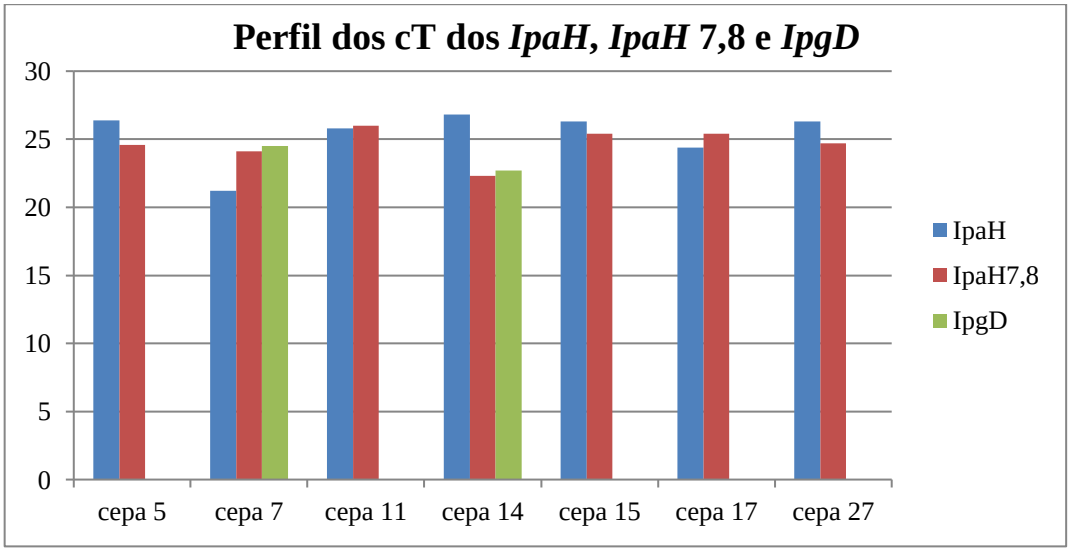


Gráfico 5: Perfil do valor de cT com diferente genes responsáveis pela modulação da resposta imunológica (IpaH, IpaH 7,8 e IpgD) da *Shigella* spp em tecido pulmonar.**Legenda:.**Tecido pulmonar de *Mus musculus* após 48 horas da inoculação intranasal - cDNA recuperado das cepas clínicas 5, 7, 11,14, 15, 17 e 27. Medidos por PCR em tempo real. As barras verticais representam ctreplicata 1, ct replicata 2 e a média ± DP.

Foi identificado *in vivo* a ausência de amplificação dos genes codificantes das enterotoxinas *shETt1* e *shET2* (*Set 1 A, Set 1B, SenA, SenB*) nas amostras clínicas 5, 7, 11, 14, 15, 17, 27 e M90T nas condições pré estabelecidas do projeto, apesar destes pares de iniciadores estarem validados com DNA genômico durante a padronização.

Nosso estudo observou que houve ausência de amplificação em todas as amostras clínicas para o gene específico no processo de disseminação intracelular: o *Icsa*. Este iniciador não comprovou sua eficiência nos ensaios de padronização da PCR em tempo real com DNA genômico e nem com cDNA. E a análise *in silico* incluiu uma possível formação de *dimer*.

Foram identificados no grupo dos genes reguladores como o *Vir F* e o *Vir B* a transcrição para as amostras 11, 14, 27 e a M90T. As amostras clínicas 5, 15 e 17 não apresentaram nenhum transcrito para o *VirB* e o *VirF*. A amostra sete apresentou somente o regulador *Vir B*. Estes genes foram validados durante a otimização da PCR em tempo real (**Gráfico 6**).

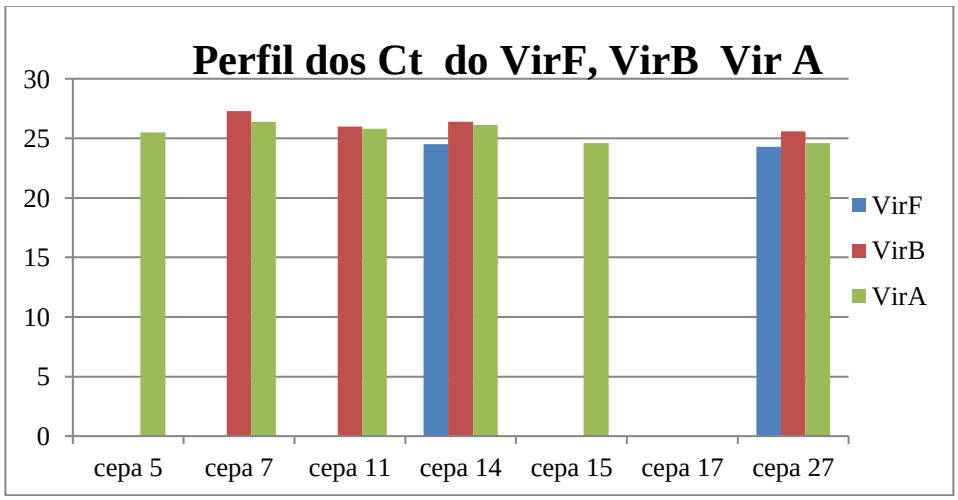


Gráfico 6: Perfil do cT com diferente genes responsáveis pela regulação da expressão do Vir B e da *Shigella* spp em tecido pulmonar de *mus musculus* após 48 horas da inoculação intranasal no cDNA recuperado das cepas clínicas 5, 7, 11,14, 15, 17 e 27. Medidos por PCR em tempo real. As barras verticais representam ct replicata 1, ct replicata 2 e a média ± DP. As barras verticais representam ct replicata 1, ct replicata 2 e a média ± DP. Genes *VirF, VirB e Vir A.*

O gene *VirA* previamente validado durante os ensaios da PCR em tempo real amplificou para as amostras 5, 7, 11, 14, 15, 27 e M90T. As reações da PCR em tempo real revelaram que este foi o gene que apresentou padrão transcricional em quase todas as amostras clínicas com exceção da amostra 17. A transcrição do *VirA* teve padrão de

transcrição similar ao perfil dos IpaABCD nas amostras 5, 7, 11, 14, 15 e M90T. A supressão de transcritos diferenciou somente entre a cepa 17 e 27.

5.4.4.2 Quantitativo

A condição do experimento restringiu a expressão dos genes Mxi-*spa region*, *IcsA*, *SenA*, *SenB*, *Set1A e Set1B*. O gene *Icsa*, responsável pela disseminação intracelular importante no alastramento da infecção, não foi expresso no ensaio em nenhuma amostra clínica e nem para a cepa padrão M90T dentro da condição de 48 horas na infecção pulmonar em murinos. Quando testamos este par de iniciador nos ensaios determinados com DNA genômico não foi possível padronizar (curva de dissociação inespecífica). Estes genes e os coficadores de enterotoxinas vão precisar de maior atenção na análise dos resultados.

Utilizando a PCR em tempo real foi calculado o perfil de expressão gênica em relação aos IPAs e este é apresentado no **Gráfico 7**. A amostra 15 expressou os maiores valores em média de quantificação em todos os genes *IpaA, IpaB, IpaC e IpaD.* A amostra 17 evidenciou a menor expressão gênica para os IPAs. A amostra 11 apresentou a maior expressão para o gene *IpaD*. E a expressão para o gene *IpaA* foi maior na amostra 27.

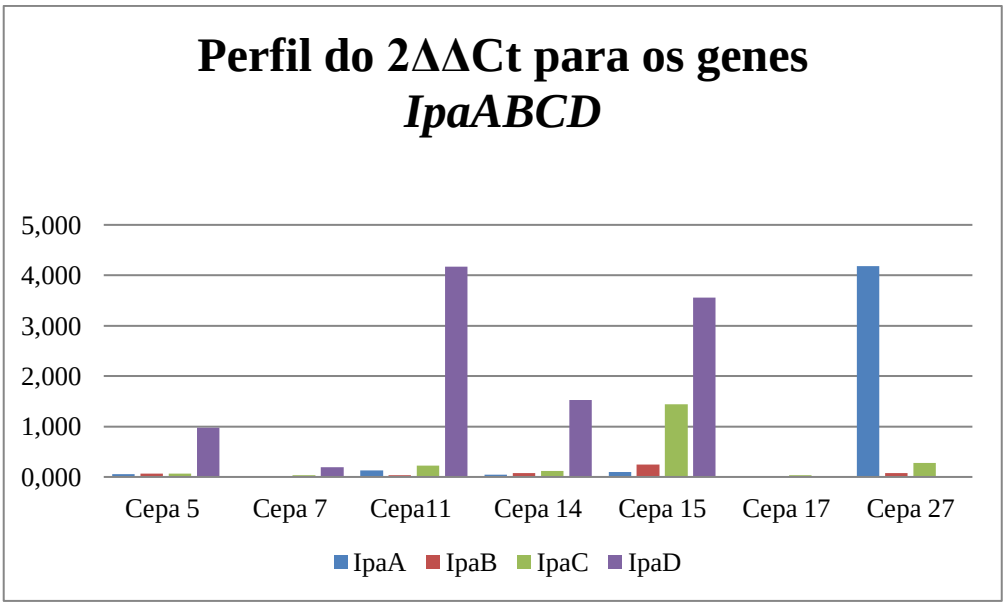


Gráfico 7: Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes de virulência IpaABCD *Shigella* spp medidos por PCR em tempo real usando o Método ΔΔCT. As barras verticais representam a média ± DP (N = 5). Os valores de expressão foram calculados em relação a expressão da cepa M90T em tecido pulmonar *Mus musculus*.

Os últimos seis genes pertencem aos reguladores e são importantes no controle da expressão dos demais genes de virulência onde a amostra 27 obteve a maior expressão para o *Vir F*. Os genes *IpaH, IpaH4,5* e o *IpaH7,8* responsáveis pela modulação da resposta imune apresentou a maior expressão gênica na amostra 14 com o gene *IpaH4,5*. O *VirA* apresentou expressão em todas as amostras clínicas exceto a 17 (**Gráfico 8**).

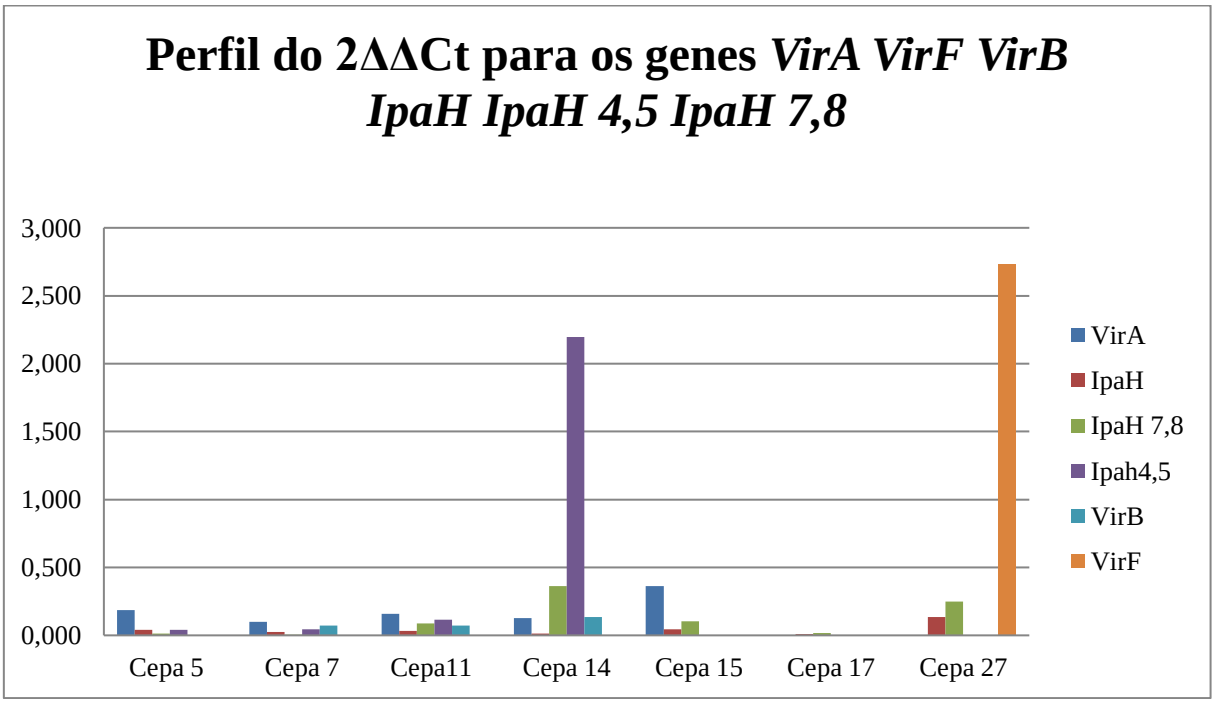


Gráfico 8: Gráfico da quantificação relativa da expressão dos genes de virulência VirA, VirB, VirF de *Shigella* spp medidos por PCR em tempo real usando o Método ΔΔCT. As barras verticais representam a média ± DP (N = 5). Os valores de expressão foram calculados em relação a expressão da cepa M90T em tecido pulmonar *Mus musculus*.

5.5. RESULTADOS OBTIDOS APÓS ANÁLISE EM T-TESTE

O nível de expressão basal dos dez genes de interesse na estratégia de virulência da shigelose em comparação com o padrão de virulência da cepa M90T pode ser observado no **Gráfico 9** e **10**. A comparação do nível de transcrição entre os genes expressos foi representada utilizando ologaritmo da probabilidade do gene ser diferencialmente expresso (SMYTH, 2004).

No **Gráfico 9** temos a expressão diferencial do *IpaA, B, C* e *D*. Em azul temos os genes com menor expressão comparada a cepa M90T; Em cinza temos os genes com

expressão equivalente; Em vermelho, genes com expressão superior ao M90T. A linha azul presenta o valor de P<0,5. A expressão do gene *IpaABCD* nas amostras clínicas foram, em geral, superiores ao encontrado no M90T, a excessão dos genes *IpaA, C* e *D* da amostra 17 que foram expressos de modo equivalente. Para esta amosta, somente o gene *IpaB* teve expressão superior a M90T, porém sem valores P significativos.

Dentre as amostras clínicas, apesar dos genes referentes as amostras 5, 11, 14 e 27 serem transcritos com expressão superior a M90T, somente os genes *IpaB* e *IpaC* nas amostras7 e 15 (quadrante superior direito) foram expressas com valor de P<0,5.

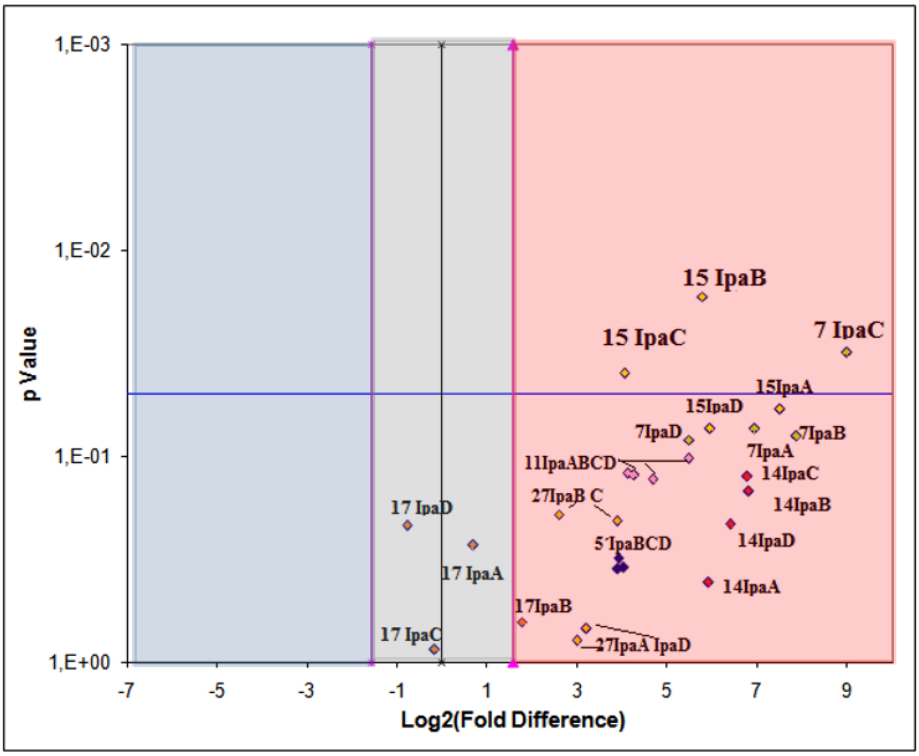


Gráfico 9: Gráfico da análise do t-Teste caracterizando as amostras clínicas 5, 7, 11, 14, 15, 17 e 27 com maior expressão gênica para o IpaA, IpaB e IpaC. Valor p do teste-t, conforme definição p < 0,5.Em azul temos os genes com menor expressão comparada a cepa M90T; Em cinza temos os genes com expressão equivalente; Em vermelho, genes com expressão superior ao M90T. A linha azul representa o valor de P<0,5.

Um padrão diferente pode ser observado para os genes *Vir F*, *Vir B* e *Vir A* (**Gráfico 10**). O gene *VirA* apresentou expressão superior nos experimentos infecção do tecido pulmonar murino comparado a M90T para asamostras 5, 7 e 15, porém apenas a amostra *VirA* da amostra 5 teve P<0,5 (quadrante superior direito).

A expressão em *Vir F*obteve expressão negativa quando comparada a M90T para todas as amostras clínicas. Para o gene *VirB*, as amostras 5, 15 e 17 tiveram expressão regulada negativamente.

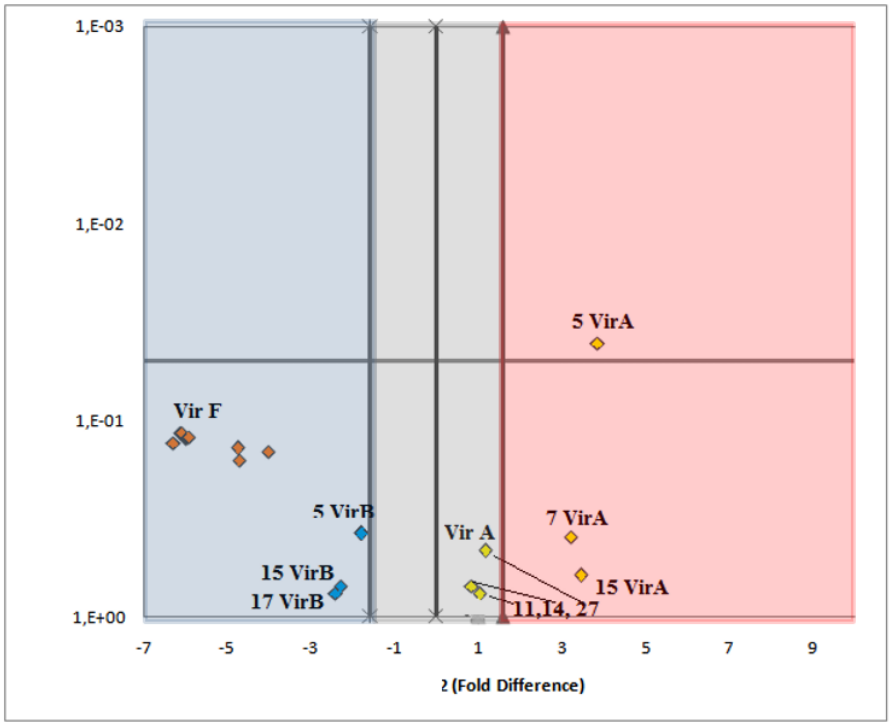


Gráfico 10: Gráfico da análise do t-Teste caracterizando as amostras clínicas 5, 7, 11, 14, 15, 17 e 27 com maior expressão gênica para o *VirF*, *VirB*e *VirA*. Valor p do teste-t, conforme definição p < 0,5.Em azul temos os genes com menor expressão comparada a cepa M90T; Em cinza temos os genes com expressão equivalente; Em vermelho, genes com expressão superior ao M90T. A linha azul representa o valor de P<0,5.

6. DISCUSSÃO

Embora sejam conhecidas todas as etapas da patogênese da *Shigella* spp., o presente estudo é um dos pioneiros com associação da expressão gênica entre a cepa padrão M90T e as amostras clínicas caracterizadas por métodos tradicionais bioquímicos, de invasão e moleculares. Os transcritos foram identificados em resposta à infecção intranasal do camundongo Balb/c, modelo animal escolhido neste estudo tem sido largamente utilizado na pesquisa da shigelose.

Em busca de um modelo animal ideal para shigelose os estudos na interação patogeno-hospedeiro teve o processo de adesão, invasão e vida intracelular já caracterizada ao nível molecular (TRAN VAN NHIEU etal, 2009; PHALIPON E SANSONETTI, 2007). Entretanto pesquisas atuais desta interação visam entender o que precede a adesão e a invasão das células epiteliais ou imunes, pois a *Shigella* deve primeiro interagir e competir com o microbioma intestinal (MARTEYN, 2016).

Acreditamos que os resultados provenientes desta proposta possam ajudar a compreender melhor a infecção clínica, uma vez que estudos com esta finalidade geralmente utilizam cepas padrões. Nossa principal hipótese parte do princípio que cepas clínicas estão constantemente em competição, que pode levar a expressão diferencial de genes relacionados a virulência, devido às mutações naturais por diversas influências externas as quais as cepas clínicas (selvagens) podem estar sujeitas (PRELICH, 2012).

O projeto inicial foi baseado na diferença da sintomatologia clínica apresentada pelos pacientes portadores de shigelose. A avaliação da virulência foi realizada in vitro com a invasão de células HeLa e através de técnicas moleculares (PCR) envolvendo alguns genes de virulência chaves presentes nas espécies de *Shigella* (*ipaBCD, ipaH, ial, invE, virF, EVT, shET1A, shET1B* e *shET2*) e o *uidA*, comum aos gêneros *Shigella* e *Escherichia coli*, permitindo uma visão geral do potencial de virulência das amostras em estudo (DA CRUZ et al., 2014).

As sete amostras selecionadas (5, 7, 11, 14, 15, 17 e 27) pertenceram a diferentes espécies de *Shigella* (*flexneri, sonnei* e *boydii*) e com presença de diferentes combinações de genes em PCR convencional. Propomos, então, explicar a ocorrência dos fatores de virulência das nossas amostras clínicas reacionais ao microambiente no modelo de infecção pulmonar em camundongos Balb/C mimetizando o hospedeiro.

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa otimizou o protocolo de infecção *in vivo* e foi observado que, da concentração inicial de inóculo bacteriano de 10^{-9}, apenas um pouco mais de 10^{-7} alcançaram o pulmão do camundongo infectado, caracterizando a quantidade de bactérias presentes no tempo zero (SERRA, 2013).

A infecção pulmonar em murinos indica a ocorrência de destruição inflamatória devido à grande presença de infiltrado polimorfonuclear.Vários trabalhos indicam (ISLAM et al., 2001) que a análise histológica de amostras de pacientes com shigelose apresentam dano na barreira epitelial, infiltração celular (neutrófilos), lesão tecidual do epitélio com depleção de células caliciformes e presença de fezes mucosanguinolenta.

Em nosso estudo, os camundongos tiveram sua temperatura e peso corporal verificados 24 horas após a inoculação para avaliar o sucesso da infecção intranasal. Da mesma forma, um estudo realizado por Khan e colaboradores (2007) na índia, associou a perda de peso, o tenesmo, as fezes liquidas e o quadro histológico invasivo das suas cobaias semelhante ao observado em humanos.

De modo geral, os mecanismos de virulência atribuídos para as espécies de *Shigella* utilizam como padrão a *S. flexneri*. Porém, com o aumento na incidência mundial dos outros sorogrupos. Recentes estudos epidemiológicos relatam uma elevação na proporção de isolados de *S. sonnei* em relação ao de *S. flexneri* (MAO et al., 2013;. QIU et al.,2015). Desta forma, percebe-se a necessidade de entendimento da diversidade do mecanismo de virulência da *Shigella* , pois a principal preocupação atual está em torno da sua capacidade de adquirir rapidamente resistência aos antibióticos.

Neste sentido, o presente estudo baseou-se em pesquisas atuais buscando gerar dados consistentes durante os experimentos de shigelose pulmonar em cobaias Balb/c, utilizando amostras clínicas regionais em comparação com o padrão de invasão *Shigella flexneri* 5a M90T,controle de invasão em muitos estudos por possuir seu potencial gênico bem caracterizado (SELLGE et al., 2010; SCHNUPF e SANSONETTI, 2012; KONRADT et al., 2011; KOTLOFF et al., 2000; SPERANDIO et al., 2008; CERSINI et al., 2003; MANTIS et al., 1996).

O monitoramento das alterações dos padrões de expressão gênica bacterianos é frequentemente realizado por PCR em tempo real, desde que esta ferramenta seja padronizada. A pureza e a qualidade do RNA apresentam relevância no ensaio de quantificação por PCR em tempo real. Um aspecto importante é a curta vida média do RNA,

por isso, evitar a degradação do material é crucial nos experimentos (GIMPEL et al., 2010). Em nosso estudo, o uso de refrigeração com nitrogênio líquido tornou constante a temperatura até o procedimento de extração, minimizando a degradação do RNA.

A fim de sanar os problemas enfrentados em estudos anteriores (SERRA, 2013) em relação a quantidade de RNA bacteriano recuperado durante a infecção intranasal, foi utilizado o pulmão integro para a extração. Para isso, foi necessária a adequação do peso dos lóbulos pulmonares e volume final de reagente Trizol. Essa condição garante a imediata interrupção de degradação do RNA. A estabilização do ambiente bacteriano é essencial durante a extração de RNA para fornecer o conhecimento biológico do ensaio (NEGREA et al., 2009). Isto permitiu a detecção de mRNA bacteriano em todas as amostras estudadas.

A verificação de expressão gênica necessita da presença de genes constitutivos que possam servir como normalizadores de expressão. Estes normalizadores devem ser expressos da mesma forma independente das condições experimentais (SCHNITTGEN; ZAKRAJSEK, 2000). Para a *Shigella* , não existem na literatura sugestões de genes normalizadores bem definidos. Os genes *rrsA*, *ihfB*, *cysG*, *hctA*, *idnT* e *GyrB* são os genes mais comumente utilizados para a normalização dos dados PCR em tempo real em *E.coli*. Devido a possível relação evolutiva da *Shigella* com a *E. coli*(LAN et al., 2004; THE et al, 2016), neste estudo propomos o estudo destes candidatos como normalizadores de *Shigella* .

O gene que demonstrou melhor eficiência e eleito para a continuação deste estudo foi o *rrsa* (encoding 16S ribosomal RNA). Da mesma forma, estudos avaliando genes normalizadores de *E. coli* elegeram o *rrsa* como melhor candidato devido a menor variação entre as espécies e alta correlação entre todas as condições estudadas (PENG et al., 2014).

O perfil de expressão gênica é uma ferramenta poderosa para relatar o tipo de ambiente que está sendo experimentado pelo microrganismo durante a infecção (MOTA, 2005). Em nosso estudo, as análises foram restringidas aos genes que foram expressos em níveis detectáveis (em pelo menos um dos dois poços da duplicata). Todos os 18 genes relacionados à virulência foram padronizados em PCR em tempo real com DNA genômico da M90T. A otimização da reação apresenta um baixo custo e é confiável para quantificação de um elevado número de genes (JONANTHAN et al., 2002). Em nosso estudo, os vinte e cinco genes (normalizadores e gene de interesse) foram previamente padronizados e apresentaram níveis de cTcom eficiência próximo de 100%.

O presente estudo visou avaliar a expressão gênica de sete amostras de *Shigella* clínicas durante o processo reconhecidamente definido como fase inflamatória em

camundongos BALB/c, no tempo de 48 horas. Em relação à amplificação qualitativa, os genes propostos *mxi-spa region, ipgD* e as enterotoxinas *senA, senB, set1A* e *set1B* não obtiveram amplificações.

Devido ao alto poder de sensibilidade demonstrado por esta tecnologia, acreditamos que a falha da amplificação dos genes se deva as limitações do desenho experimental quanto ao momento da expressão bacteriana no hospedeiro. As células podem alterar o padrão de genes expressos em resposta às mudanças no seu ambiente (STRACHAN, 2002). Desta forma, a análise de expressão gênica reflete os genes expressos naquele determinado estado fisiológico escolhido. Acreditamos que os genes *mxi-spa region, ipgD, IcsA* e as enterotoxinas *senA, senB, set1A* e *set1B* estejam indisponíveis na infecção pulmonar durante o período de 48 horas.

Para os genes *Mxi-spa* e *Icsa* não descartamos a possibilidade de ter ocorrido uma interferência metodológica nos níveis baixos de expressão assim como uma interferência biológica imposta pelo desenho experimental. NEGREA et al. (2009) relatou que algumas medidas na confecção de iniciadores, extração de RNA e controles endógenos devem ser tomadas em ensaios de expressão gênica para que a interação patogeno- hospedeiro não tenha seus resultados alterados. Nossos dados sugerem que não há nenhuma razão conclusiva para explicar que não ocorresse disseminação intercelular neste experimento.

Estudos com a shET1 em intestino de coelho demonstraram que a produção de enterotoxinas provoca secreção no intestino delgado e ausência de invasão celular da enterobactéria, além disso, a dilatação no íleo causado pela shET1 ocorre em 4h de contato, mas não em 18-24h (FASANO et al., 1995). Apesar de vários modelos de shigelose terem sido desenvolvidos, incluindo o modelo de primata não humano, o modelo cerato-conjuntivite em cobaia e o modelo de shigelose pulmonar, estes não medem adequadamente a fase aquosa da doença diarreica que envolvem a secreção das enterotoxinas shET1 e shET2 (PORE et al., 2011).Yang et al. (2015) analisou o período de 24 horas após a infecção intranasal e todos os genes de virulência propostos foram regulados positivamente. Acreditamos que, para acessar a expressão gênica destas enterotoxinas, padronizações futuras com gradientes de tempo e modelos animais são necessários.

Para os fatores de virulência responsáveis pela codificação dos efetores *IpaA, IpaB, IpaC* e *IpaD* todas as amostras testadas obtiveram 100% de amplificação qualitativa. Estes resultados concordam com aqueles obtidos por nosso grupo de pesquisa (SERRA, 2013).

Os genes *IpaBCD* estão localizados no plasmídeo de invasão (Ipa) e são essenciais a invasão das espécies de *Shigella* na célula hospedeira (VENKATESAN et al., 1988). A expressão deste conjunto de genes por todas as amostras estudadas, independentemente da significância, reflete o potencial de formação de poros por estas amostras clínicas. Uma vez que cepas mutantes com ausência das proteínas *IpaA, IpaB, IpaC,* e *IpaD*são incapazes de desencadear um quadro infeccioso disseminado (DORMAN et al., 2001; ADLER et al. 1989), acreditamos que sua expressão por todas as amostras estudadas confirma a evolução do quadro infeccioso neste estudo.

Com relação aos genes reguladores *VirA*, *VirB* e *VirF* as amostras clínicas demonstraram um padrão diversificado. O gene *VirF* teve uma regulação negativa para todas as amostras estudadas. Da mesma forma, o gene *VirB* teve expressão negativa nas amostras clínicas 5, 15 e 17 e equivalente a M90T nas amostras 7, 11, 14 e 27.

Estudos relacionados por Chowdhury et al. (2014) demostramo efeito de uma variedade de parâmetros físico químicos sobre a expressão de genes de virulência *in vitro* e *in vivo*, e a regulação da expressão do gene é realizada conforme a função deste se estabelece na estratégia montada pelo microrganismo. De modo semelhante, a expressão de genes de virulência a uma temperatura menor que 37 °C, regulou negativamente a codificação do gene HNS responsável pelo controle de *VirF* (PORTER, 1994).

Os genes cromossomais *VirF* e *VirB* participam da regulação da expressão dos genes de invasão (FAHERTY et al., 2016). Para desencadear a patogênese, a *Shigella* deve codificar genes responsáveis pela virulência, porém esta indução é realizada por sinais do microambiente que regulam a expressão dos fatores de virulência (YANG et al., 2015).

No estudo de Ni e colaboradores (2015) verificou-se que a maioria dos genes transmitidos por plasmídeo *IPA-mxi-spa* foram regulados negativamente, sugerindo que a expressão destes genes de virulência foi rigorosamente controlada durante a fase de adesão no ensaio de invasão epitelial. Em outro estudo, Morris (2013) salientou que muitos genes previamente identificados e associados com a virulência da *Shigella* foram reprimidos durante o crescimento intracelular, incluindo genes da região de entrada do plasmídeo de virulência (*Ipa*, *MXI* - spa), bem como vários *OSP* genes, *VirA* e *ICSA* (*virG*).

Diferentemente, o gene *VirA* foi expresso positivamente em todas as amostras clínicas estudadas, independentemente do valor de P. Este gene age como uma protease de cisteina degradando a rede de microtúbulos para promover a motilidade da *Shigella* , por conseguinte,

as ações dos efetores de SST3 ficam disponíveis para promover a invasão e sua posterior disseminação (AGAISSE , 2016).

Acreditamos que a ausência de transcriça de *VirF* e *VirB*, bem como a expressão positiva do gene *VirA*, confirma a hipótese de que o período de 48 horas estudados reflete a segunda fase da infecção por *Shigella* ,e não a sua invasão inicial, mantida pela propagação célula-a-célula (AGAISSE, 2016; LINDSAY et al., 2013). Assim como observado para as enterotoxinas, padronizações futuras do tempo de infecção e novos modelos animais são necessários para mostrar a expressão gênica destes genes.

Há várias possíveis razões pelas quais não foram observadas correlações positivas para a expressão de alguns genes alvos para todos os sete grupos de amostras clínicas de *Shigella* estudadas. Recentemente, Marteyn e colaboradores (2016) discriminou as principais barreiras para o percurso final da invasão celular pela *Shigella* sp., dentre as quais estão a microbiota normal do hospedeiro e a camada de muco epitelial. Desta forma, a super expressão ou a inibição da expressão de um transcrito dos genes investigados neste estudo pode variar de acordo com o sitio de infecção no modelo animal e o tempo de desenvolvimento da shigelose podendo interferir, portanto, nas conclusões obtidas.

Foi observado que a contribuição da concentração de O_2 na expressão coordenada por determinantes microambientais é percebida por Tang et al. (2014) quando a anaerobiose presente no sitio da infecção resultou na produção de TTSS enquanto reduziu a secreções dos efetores do *Ipa*. De modo semelhante, em nosso estudo, o tecido pulmonar, rico em O_2 expressou positivamente as proteínas do SST3 (*IpaABCD*) porém negativamente seus reguladores (*VirF* e *VirB*).

Não houve diferenças significativas entre a expressão gênica das amostras clínicas estudadas. Porém, as amostras 7 e 15 foram aquelas que obtiveram resultados mais expressivos para os genes estudados. A amostra 7 teve expressão positiva significativa para os genes *IpaC* e *VirA* ($P<0,5$). A amostra 15 teve expressão positiva significativa para os genes *IpaB* e *IpaC* ($P<0,5$). Aqui sugerimos a utilização destas amostras clínicas como candidatas para estudos futuros visando melhor caracterizar a virulência da *Shigella*.

Poucos estudos relatam o papel das condições do microambiente tecidual na regulação da expressão dos fatores de virulência *in vivo*. Nossos resultados sugerem que os mecanismos moleculares da virulência da *Shigella* sp. na infecção pulmonar de modelos murino, apesar de

mimetizar características da infecção, são distintos daqueles encontrados no processo de infecção intestinal descrito na literatura. Além disso, o panorama gênico de 48 horas não engloba os genes de virulência expressos durante as fases iniciais da infecção por *Shigella*. Estudos futuros são necessários para formar uma curva temporal de infecção, por conseguinte expressão gênica, para determinar, de fato, como a *Shigella* atua na regulação da expressão dos fatores de virulência no microambiente tecidual pulmonar *in vivo*.

7. CONCLUSÃO

1. A estratégia de infecção intranasal e extração de RNA realizada neste estudo teve sucesso em recuperar mRNA de qualidade para ser empregados em estudos de expressão gênica;
2. O gene *rrsA*, previamente validado para *E. coli*, neste estudo foi empregado com sucesso como normalizador para *Shigella* sendo caracterizado como um bom canditado de gene constitutivo para estudos futuros visando expressão gênica;
3. A ausência de amplificação para os genes relacionados a enterotoxinas foi observada devido a inabilidade do modelo de shigelose pulmonar em mimetizar adequadamente a fase aquosa da doença diarreica, crítica para a secreção das enterotoxinas shET1 e shET2;
4. No período de 48h de infecção houve expressão positiva nas amostras clínicas dos genes do SST3 *IpaA, IpaB, IpaC* e *IpaD* e regulador *VirA*, e negativa de seus reguladores *VirF* e *VirB*, sugerindo que este panorama reflete os genes de virulência expressos durante a segunda fase da infecção por *Shigella* , mantida pela propagação célula-a-célula, o que não ocorre nas dazes iniciais.
5. Não houve diferença significativa entre a expressão gênica das amostras clínicas estudadas. Porém, as amostras sete e 15 foram aquelas que obtiveram resultados mais expressivos para os genes estudados. Futuramente, estas amostras podem ser boas candidatas para estudos de avaliação de virulência;
6. O epitélio pulmonar do camundongo demonstrou um bom modelo experimental para avaliação da evolução do quadro patogênico das amostras clínicas de *Shigella* spp, porém estudos futuros são necessários para formar uma curva temporal de infecção e expressão gênica, para determinar como a *Shigella* atua na regulação da expressão dos fatores de virulência no microambiente tecidual pulmonar *in vivo*.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

1. Destacamos futuramente a viabilidade de ampliar nossa pesquisa através de novos sítios de infecção em modelo animal com a utilização de PCR em tempo real para caracterização da virulência de isolados de *shigella*.
2. A infecção pulmonar em camundongos deve ser estudada para formar uma curva temporal de infecção para reavaliar a aplicação da expressão gênica dos fatores de virulência nestas condições distintas com o objetivo de sinalizar a dinâmica de disseminação intercelular.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLER, B. et al. A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of Shigella flexneri. **Molecular microbiology**, v. 3, n. 5, p. 627-635, 1989.

AGAISSE, Hervé. Mecanismos moleculares e celulares da Shigella flexneri divulgação. **Frontiers em microbiologia celular e infecção** , v. 6, 2016.

ANDERSON Mark., SANSONETTI PJ, MARTEYN BS *Shigella* diversidade e mudança de paisagem: insights para o século XXI . Frente. Célula. Infectar. Microbiol. 6 : 45 . 10,3389 / fcimb.2016.00045, 2016.

ANDRADE, J. A.; OLIVEIRA, J. O.; FAGUNDES NETO, U. Letalidade em crianças hospitalizadas com diarréia aguda-fatores de risco associados ao óbito. **Rev Assoc Med Bras**, v. 45, n. 2, p. 121-7, 1999.

ASHIDA, Hiroshi; SASAKAWA, Chihiro.Shigella IpaH Family Effectors as a Versatile Model for Studying Pathogenic Bacteria. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 5, 2015.

BARDHAN, Pradip; FARUQUE, A.S.G.; NAHEED, Aliya; *et al*. Decreasing Shigellosis-related Deaths without Shigella spp.–specific Interventions, Asia.**Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1718–1723, 2010.

BARTA, Michael L.; GURAGAIN, Manita; ADAM, Philip; *et al*. Identification of the bile salt binding site on IpaD from Shigella flexneri and the influence of ligand binding on IpaD structure. **Proteins**, v. 80, n. 3, p. 935–945, 2012.

BASTA, David W. et al. Characterization of the ospZ Promoter in Shigella flexneri and its Regulation by VirB & H-NS. **Journal of bacteriology**, p. JB.00212-13, 2013.

BERNARDINI, Maria Lina; ARONDEL, Josette; MARTINI, Irene; *et al*. Parameters Underlying Successful Protection with Live Attenuated Mutants in Experimental Shigellosis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 2, p. 1072–1083, 2001.

BLOCKER, A.; GOUNON, P.; LARQUET, E.; et al. The tripartite type III secreton of Shigella flexneri inserts IpaB and IpaC into host membranes. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 3, p. 683–693, 1999.

BLOCKER, Ariel J.; DEANE, Janet E.; VEENENDAAL, Andreas K. J.; *et al*. What's the point of the type III secretion system needle? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 18, p. 6507–6513, 2008.

BONGRAND, Clotilde; SANSONETTI, Philippe J.; PARSOT, Claude. Caracterização do promotor, a caixa MXIE e UTR 5 'de genes controlados pela actividade do aparelho de secreção de tipo III em Shigella flexneri. **PLoS ONE** , v. 7, n. 3, p. e32862, 2012.

BORGES-OSÓRIO, Maria R.; ROBINSON, Wanyce M. **Genética Humana 3ed**. Artmed, 2013.

BOSCHI-PINTO, Cynthia; VELEBIT, Lana; SHIBUYA, Kenji.Estimating child mortality due to diarrhoea in developing countries.**Bulletinofthe World Health Organization**, v. 86, n. 9, p. 710–717, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano Nacional de Saúde – PNS : 2012-2015 / Ministério da Saúde. – Brasília : Ministério da Saúde, 114p., 2011.

CAMPBELL-VALOIS, François-Xavier et al. Escape of actively secreting Shigella flexneri from ATG8/LC3-positive vacuoles formed during cell-to-cell spread is facilitated by IcsB and VirA. **MBio**, v. 6, n. 3, p. e02567-14, 2015.

CERSINI, A., MARTINO, M. C., MARTINI, I., ROSSI, G., BERNARDINI, M. L. Analysis of Virulence and Inflammatory Potential of Shigella fl exneri Purine Biosynthesis Mutants**.Infection and Immunity**, v, 71, n. 12, p. 7002-7013, 2003.

CHOWDHURY R, WARNAKULA S, Et al. Association of dietary, circulating, and supplement fatty acids with coronary risk: a systematic review and meta-analysis. **Ann Intern Med.** 18;160(6):398-406, 2014.

DA CRUZ, Carolinie Batista Nobre; DE SOUZA, Maria Carolina Scheffer; SERRA, Paula Taquita; *et al*. VirulenceFactors Associated withPediatricShigellosis in Brazilian Amazon. DI

MARTINO, Maria Letizia et al. The Multifaceted Activity of the VirF Regulatory Protein in the Shigella Lifestyle. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 3, 2016.

DICKENSON, Nicholas E. et al. N-terminus of IpaB provides a potential anchor to the Shigella type III secretion system tip complex protein IpaD. **Biochemistry**, v. 52, n. 49, p. 8790-8799, 2013.

DORMAN, Charles J.; MCKENNA, Sorcha; BELOIN, Christophe.Regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri, a facultative intracellular pathogen. **International journal of medical microbiology**, v. 291, n. 2, p. 89-96, 2001.

FAHERTY, Christina S. et al. The Synthesis of OspD3 (ShET2) in Shigella flexneri is Independent of OspC1. **Gut Microbes**, n. just-accepted, p. 00-00, 2016.

FARFÁN, Mauricio J. et al. Shigella enterotoxin-2 is a type III effector that participates in Shigella -induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 332-339, 2011.

FARTHING, Michael; SALAM, Mohammed A.; LINDBERG, Greger; *et al*. Acute diarrhea in adults and children: a global perspective. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 1, p. 12–20, 2013.

FASANO, A., NORIEGA, F. R., MANEVAL JR, D. R., CHANASONGCRAM, S. O. M. C. H. O. K. E., RUSSELL, R., GUANDALINI, S., & LEVINE, M. M. Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of Shigella flexneri 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro**. *Journal of Clinical Investigation***, *95*(6), 2853, 1995.

FERNANDEZ, M. Isabel; SANSONETTI, Philippe J. Shigella interaction with intestinal epithelial cells determines the innate immune response in shigellosis. **Internationaljournalof medical microbiology: IJMM**, v. 293, n. 1, p. 55–67, 2003.

FERNANDEZ, Maria-Isabel; REGNAULT, Béatrice; MULET, Céline; *et al*. Maturation of paneth cells induces the refractory state of newborn mice to Shigella infection. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 7, p. 4924–4930, 2008.

FONTAINE, A; ARONDEL, J; SANSONETTI, P J. Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery, studied by using a Tox- mutant of Shigella dysenteriae 1.**InfectionandImmunity**, v. 56, n. 12, p. 3099–3109, 1988.

FOSTER, R. A. et al. Structuralelucidationofthe O-antigenoftheShigella flexneri provisional serotype 88-893: structuralandserologicalsimilaritieswith S. flexneri provisional serotype Y394 (1c). **Carbohydrateresearch**, v. 346, n. 6, p. 872-876, 2011.

GALÁN, Jorge E.; WOLF-WATZ, Hans. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 567-573, 2006.

GALLEGOS, Maria-Trinidad et al. Arac/XylS family of transcriptional regulators. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, p. 393-410, 1997.

GELMINI, Stefania et al. Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) for the Measurement of Prostate-Specific Antigen mRNA in the Peripheral Blood of Patients with Prostate Carcinoma Using the TaqManTM Detection System. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 39, n. 5, p. 385-391, 2001.

GHOSH, Santanu. Genetic characteristics and changing antimicrobial resistance among Shigella spp. Isolated from hospitalized diarrhoeal patients in Kolkata, India. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 10, p. 1460-1466, 2011.

GIMPEL, Matthias et al. A sRNA dupla função de B. subtilis: SR1 atua como um mRNA codificador do peptídeo no operon GAPA. **Microbiologia molecular** , v 76, n.. 4, p. 990-1009 de 2010.

HALE, Thomas L.; KEUSCH, Gerald T. Shigella .*In*: BARON, Samuel (Org.). **Medical Microbiology**. 4th. ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

INGERSOLL, Molly A.; ZYCHLINSKY, Arturo. ShiA abrogates the innate T-cell response to Shigella flexneri infection. **Infection and immunity**, v. 74, n. 4, p. 2317-2327, 2006.

ISLAM, Dilara et al. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. **Nature medicine**, v. 7, n. 2, p. 180-185, 2001.

JENNISON, Amy V.; VERMA, Naresh K. Shigella flexneri infection: pathogenesis and vaccine development. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 43-58, 2004.

JOH, Richard I.; HOEKSTRA, Robert M.; BARZILAY, Ezra J.; *et al*. Dynamics of shigellosis epidemics: estimating individual-level transmission and reporting rates from national epidemiologic data sets. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 8, p. 1319–1326, 2013.

JONATHAN A. et al. Global analysis of mRNA decay and abundance in Escherichia coli at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 15, p. 9697-9702, 2002.

LINDSAY, Brianna et al. Quantitative PCR for detection of Shigella improves ascertainment of Shigella burden in children with moderate-to-severe diarrhea in low-income countries. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1740-1746, 2013.

KHAN, Naghma et al. Oral consumption of pomegranate fruit extract inhibits growth and progression of primary lung tumors in mice. **Cancer research**, v. 67, n. 7, p. 3475-3482, 2007.

KHAN, Wasif A.; GRIFFITHS, Jeffrey K.; BENNISH, Michael L. Gastrointestinal and extra-intestinal manifestations of childhood shigellosis in a region where all four species of Shigella are endemic.**PloSone**, v. 8, n. 5, p. e64097, 2013.

KILLACKEY, Samuel A.; SORBARA, Matthew T.; GIRARDIN, Stephen E. Cellular aspects of Shigella pathogenesis: focus on the manipulation of host cell processes. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, 2016.

KLATT, Edward C. **Robbins and Cotran atlas of pathology**.Elsevier Health Sciences, 2014.

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

KOPPOLU, Veerendra; OSAKA, Ichie; SKREDENSKE, Jeff M.; *et al*. Small-Molecule Inhibitor of the Shigella flexneri Master Virulence Regulator VirF.**Infection and Immunity**, v. 81, n. 11, p. 4220–4231, 2013.

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

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

KOTLOFF, Karen L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, n. 9888, p. 209-222, 2013.

LAN, Ruiting; ALLES, M. Chehani; DONOHOE, Kathy; *et al*. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive Escherichia coli and Shigella spp. **InfectionandImmunity**, v. 72, n. 9, p. 5080–5088, 2004.

LIMA, Ila FN; HAVT, Alexandre; LIMA, Aldo AM. Update on molecular epidemiologyofShigella infection. **Currentopinion in gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 30-37, 2015.

LIVIO, S., STROCKBINE, N. A., PANCHALINGAM, S., TENNANT, S. M., BARRY, E. M., MAROHN, M. E., … Levine, M. M. (2014). *Shigella* Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America,** *59*(7), 933–941.

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

MAO, Yuanli et al. Changing trends and serotype distribution of Shigella species in Beijing from 1994 to 2010. **Gut pathogens**, v. 5, n. 1, p. 1, 2013.

MARLOVITS, Thomas C.; STEBBINS, C. Erec. Type III secretion systems shape up as they ship out. **CurrentOpinion in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 47–52, 2010.

MARTEYN BS. Shigella Vaccine Development: The Model Matters. **JSM Trop Med Res** 1(1): 1011, 2016.

MARTEYN, Benoit; GAZI, Anastasia; SANSONETTI, Philippe. Shigella : a model of virulence regulation in vivo. **GutMicrobes**, v. 3, n. 2, p. 104–120, 2012.

MARTEYN, Benoit; PRÉVOST, Marie-Christine; TANG, Christoph.Modulation of Shigella virulence in response to available oxygen in vivo.**Nature**, v. 465, n. 7296, p. 355–358, 2010.

MORRIS, Carolyn R. et al. Characterization of intracellular growth regulator icgR by utilizing transcriptomics to identify mediators of pathogenesis in Shigella flexneri. **Infection and immunity**, v. 81, n. 9, p. 3068-3076, 2013.

MOTA, A. J., G. N. BACK-BRITO, F. G. NOBREGA. "**A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction**." MYCOSES.Vol. 52. Commerce Place, 350 Main ST, Malden 02148, MA USA: Wiley-Blackwell Publishing, INC, 2009

MOTA, Luís Jaime; SORG, Isabel; CORNELIS, Guy R. Type III secretion: The bacteria-eukaryotic cell express. **FEMS microbiologyletters**, v. 252, n. 1, p. 1-10, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

NA-UBOL, Mathukorn et al. Características moleculares de Shigella spp. Isolada de pacientes com diarréia em uma nova área industrializada da Tailândia. **Epidemiologia & Infecção** , v. 134, n. 5, p. 997-1003, 2006.

NCCLS - NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (UNITED STATES). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standards**. National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2006.

NEGREA, Aurel et al. Tiorredoxina 1 participana atividade do enterica serovar Typhimurium patogenicidade ilha Salmonella 2 Tipo III sistema de secreção. **Jornal da bacteriologia** , v. 191, n. 22, p. 6918-6927, 2009.

NI, Zhiwei *et al.* Adaptação transcricional de Shigella flexneri durante a aderência ás células epiteliais. **Jornal da microbiologa básica,** v. 55, n. 2,p.186-194, 2015.

NIKITINA, TV et al. Nível pequeno RNA estável depende do estado fisiológico da célula. **Tsitologiia** , v. 46, n. 5, p. 437-441, 2003.

NIYOGI, Swapan Kumar. Shigellosis.**Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43, n. 2, p. 133–143, 2005.

NJUGUNA, Henry N.; COSMAS, Leonard; WILLIAMSON, John; *et al*. Use of population-based surveillance to define the high incidence of shigellosis in an urban slum in Nairobi, Kenya. **PloS One**, v. 8, n. 3, p. e58437, 2013.

OGAWA, Michinaga et al.The versatility of Shigella effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 11-16, 2008.(4)

ORLANDI, P. P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G. F.; *et al*. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Memórias Do InstitutoOswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 621–625, 2001.

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

PARSOT, C.; SANSONETTI, P. J. Invasion and the Pathogenesis of Shigella Infections.*In*: MILLER, Professor Virginia L. (Org.). **Bacterial Invasiveness**. [s.l.]: Springer Berlin Heidelberg, p. 25–42. 1996.

PEIRANO, Gisele; SOUZA, Flávia dos Santos; RODRIGUES, Dalia dos Prazeres. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in Shigella spp. from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 245-250, 2006.

PENG, Silvio et al. Evaluation of three reference genes of Escherichia coli for mRNA expression level normalization in view of salt and organic acid stress exposure in food. **FEMS microbiology letters**, v. 355, n. 1, p. 78-82, 2014.

PHALIPON, Armelle; SANSONETTI, Philippe J. Shigella ’s ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival? **ImmunologyandCellBiology**, v. 85, n. 2, p. 119–129, 2007.

PHILPOTT, D J; EDGEWORTH, J D; SANSONETTI, P J. The pathogenesis of Shigella flexneri infection: lessons from in vitro and in vivo studies. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 355, n. 1397, p. 575–586, 2000.

PORE D, MAHATA N, PAL A, CHAKRABARTI MK (2011) proteína da membrana externa A (OmpA) de *Shigella flexneri* 2a, induz resposta imunitária protectora num modelo de ratinho . **PLoS One 6** :. E22663.

PORTER, Megan E.; DORMAN, Charles J.A role for H-NS in the thermo-osmotic regulation of virulence gene expression in Shigella flexneri. **Journal of bacteriology**, v. 176, n. 13, p. 4187-4191, 1994.

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

PULENDRAN, Bali; PALUCKA, Karolina; BANCHEREAU, Jacques. Sensing pathogens and tuning immune responses. **Science**, v. 293, n. 5528, p. 253-256, 2001.

QIU, Shaofu et al. Shift in serotype distribution of Shigella species in China, 2003–2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 3, p. 252. e5-252. e8, 2015.

RAQIB, Rubhana et al. Cytokine secretion in acute shigellosis is correlated to disease activity and directed more to stool than to plasma. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 2, p. 376-384, 1995.

ROEHRICH, A Dorothea; GUILLOSSOU, Enora; BLOCKER, Ariel J; *et al*. Shigella IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. **Molecular Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 690–706, 2013.

RUDEL T, Kepp O, KOZJAK, Pavlovic V. Interactions between bacterial pathogens and mitochondrial cell death pathways. Nat RevMicrobiol 2010; 8: 693–705

SALGADO-PABÓN, Wilmara; CELLI, Susanna; ARENA, Ellen T.;*et al*. Shigella impairs T lymphocyte dynamics in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 12, p. 4458–4463, 2013.

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

SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D. J.; FORMAL, S. B. Involvement of a plasmid in the invasive ability of Shigella flexneri.**InfectionandImmunity**, v. 35, n. 3, p. 852–860, 1982.

SANSONETTI, Philippe J. The bacterial weaponry: lessons from Shigella . **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1072, p. 307–312, 2006.

SANSONETTI, Philippe J.; EGILE, Coumaran. Molecular bases of epithelial cell invasion by Shigella flexneri. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 74, n. 4, p. 191-197, 1998.

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

SCHNUPF, Pamela; SANSONETTI, Philippe J. Quantitative RT-PCR profiling of the rabbit immune response: assessment of acute Shigella flexneri infection. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e36446, 2012.

SCHROEDER, G. N. Molecular pathogenesis of Shigella spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clin.Microbiol.Rev.** 21, 134–156, 2008.

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

SENGUPTA, Chirantana; RAY, Sreejana; CHOWDHURY, Rukhsana. Fine tuning of virulence regulatory pathways in enteric bacteria in response to varying bile and oxygen concentrations in the gastrointestinal tract. **Gut pathogens**, v. 6, n. 1, p. 1, 2014.

SERRA, T. P. Análise investigativa dos Fatores de Virulência de Cepas Selvagens de *Shigella sp. in vivo* e seu Potential inflamatório. **98 p. Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada). Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2013.**

SHAKOOR, Sadia; ZAIDI, Anita K. M.; HASAN, Rumina.Tropical bacterial gastrointestinal infections.**Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 437–453, 2012.

SHEN, Da-Kang; MORIYA, Nao; MARTINEZ-ARGUDO, Isabel; *et al*. Needle length control and the secretion substrate specificity switch are only loosely coupled in the type III secretion apparatus of Shigella . **Microbiology**, v. 158, n. Pt 7, p. 1884–1896, 2012.

SHIM, Doo-Hee; SUZUKI, Toshihiko; CHANG, Sun-Young; *et al*. New animal model of shigellosis in the Guinea pig: its usefulness for protective efficacy studies. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 178, n. 4, p. 2476–2482, 2007.

SINGER, Alexander U; ROHDE, John R; LAM, Robert;*et al*. Structure of the Shigella T3SS effector IpaH defines a new class of E3 ubiquitin ligases. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 12, p. 1293–1301, 2008.

SOBEL, J.; GOMES, T. a. T.; RAMOS, R. T. S.; *et al*. Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal illness in children aged 12-59 months in São Paulo, Brazil. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 11, p. 1545–1551, 2004.

SOUSA, Mireille Ângela Bernardes; MENDES, Edilberto Nogueira; COLLARES, Guilherme Birchal; *et al*. Shigella in Brazilianchildrenwithacutediarrhoea: prevalence, antimicrobialresistanceandvirulence genes. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 1, p. 30–35, 2013.

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

STRACHAN, T.; READ, A. P. **Genética Molecular Humana**.2 ed. Porto Alegre: ARTMED Editora, 2002.

SUZUKI, T.; SASAKAWA, C. Molecular basis of the intracellular spreading of Shigella .**InfectionandImmunity**, v. 69, n. 10, p. 5959–5966, 2001.

TANG, Fenyang et al. Spatio-Temporal Trends and Risk Factors for Shigella from 2001 to 2011 in Jiangsu Province, People's Republic of China.**PloS one**, v. 9, n. 1, p. e83487, 2014.

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

TOBE, T. et al. Transcriptional control of the invasion regulatory gene virB of Shigella flexneri: activation by virF and repression by H-NS. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 19, p. 6142-6149, 1993.

TORTORA, G.R. **Microbiologia**. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TÓTH, István et al. Análise comparativa da toxina Shiga bacteriófago converter detectado pela primeira vez em Shigella sonnei. **Infection, Genetics and Evolution** , v. 37, p. 150-157, 2016.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flavio. **Microbiologia**.Atheneu, 2008.

TRAN VAN NHIEU, Guy; ARBIBE, Laurence. Geneticreprogrammingof host cellsbybacterialpathogens. **F1000 BiologyReports**, v. 1, 2009.

TRAN VAN NHIEU, Guy; CLAIR, Caroline; BRUZZONE, Roberto; *et al*. Connexin-dependent inter-cellular communication increases invasion and dissemination of Shigella in epithelial cells.**Nature Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 720–726, 2003.

VALIANTE, Nicholas M.; O'HAGAN, Derek T.; ULMER, Jeffrey B. Innate immunity and biodefence vaccines. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 11, p. 755-760, 2003.

VAN DE VERG, LILLIAN L. et al. Antibody and cytokine responses in a mouse pulmonary model of Shigella flexneri serotype 2a infection. **Infection and immunity**, v. 63, n. 5, p. 1947-1954, 1995.

VARELA, Gustavo; BATTHYÁNY, Lara; BIANCO, María Noel; *et al*. Enteropathogens associated with acute diarrhea in children from households with high socioeconomic level in uruguay. **International Journal of Microbiology**, v. 2015, p. 592953, 2015.

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

VOINO-YASENETSKY, M. V.; VOINO-YASENETSKAYA, M. K. Experimental pneumonia caused by bacteria of the Shigella group. **Acta morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 11, p. 439-454, 1961.

WARDLAW, Tessa; SALAMA, Peter; BROCKLEHURST, Clarissa; *et al*. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **Lancet**, v. 375, n. 9718, p. 870–872, 2010.

WEST, Nicholas P. et al. Optimization of virulence functions through glucosylation of Shigella LPS. **Science**, v. 307, n. 5713, p. 1313-1317, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Surveillance standards for antimicrobial resistance. 2002.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Diarrhoeal Diseases (Updated February 2009). Initiative for Vaccine Research (IVR) 2009. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Ending preventable child deaths from pneumonia and diarrhoea by 2025: The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD). 2013.

YANG, Guang et al. hfq regulates acid tolerance and virulence by responding to acid stress in Shigella flexneri. **Research in microbiology**, v. 166, n. 6, p. 476-485, 2015.

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

YANG, Ji; TAUSCHEK, Marija; ROBINS-Browne, Roy M. Controle da virulência bacteriana pelos reguladores AraC-like que respondem a sinais químicos. **Tendências em microbiologia** , v. 19, n. 3, p. 128-135, 2011.

YANG, Jin-Young; LEE, Se-Na; CHANG, Sun-Young; *et al*.A mouse model of shigellosis by intraperitoneal infection.**The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 203–215, 2014.

YIN, Jian Lin et al. Real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. **Immunology and cell biology**, v. 79, n. 3, p. 213-221, 2001.

ZHANG, Chuan-Ling; LIU, Qing-Zhong; WANG, Juan; *et al*. Epidemic and virulence characteristic of Shigella spp. with extended-spectrum cephalosporin resistance in Xiaoshan District, Hangzhou, China.**BMC infectious diseases**, v. 14, p. 260, 2014.

11. ANEXOS

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

Número do Protocolo: 018/2015	**Data de Entrada:** 24/06/2015

Pesquisador Responsável: ANA PAULA MIRANDA BARROS

Título do Projeto: "EXPRESSÃO GÊNICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DA SHIGELLA DE AMOSTRAS CLÍNICAS EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO."

Início: 11/04/2016
Fim: 10/10/2016

Instituição Responsável: INPA

INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

Organismo/ Grupo Animal	Linhagem/ espécie	Idade	Peso	nº animais/ grupo	nº grupos	nº total de animais	Sexo		
							M	F	M+F
Camundongo	Balb/c	7	20	15	18	270		X	
							TOTAL:		270

RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 08.04.2016

Atenciosamente,

George H. Rebêlo

George Henrique Rebelo
Coordenador CEUA-INPA
PO n. 079/2015