

ALAN BERLESE

Receptor de Aerobactina Férrica de *Escherichia coli*
Comensal Induz Proliferação de Células B-1

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ademilson Panunto Castelo

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Berlese, Alan

Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* comensal induz proliferação de células B-1. Ribeirão Preto, 2009.

110 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Panunto-Castelo, Ademilson.

1. Receptor de aerobactina férrica. 2. *Escherichia coli*.
3. Células B-1. 4. Cromatografia de afinidade. 5. Fator de virulência.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Alan Berlese

Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* comensal induz proliferação de células B-1.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Carmen (*in memoriam*) e José, por todo o suporte nesta longa jornada de estudos, por sempre acreditarem em mim e por suas histórias de sucesso na educação dos filhos. Vocês são os verdadeiros mestres que tive.

“ Os ventos que as vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar. Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre...”

Bob Marley

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. **Ademilson Panunto Castelo**, um misto de professor e psicanalista, a quem devo a mais sincera admiração. Pela confiança depositada desde o início, pela disposição em me oferecer estímulos durante todo o percurso e incentivo a percorrer novos caminhos, ouvir com interesse e ânimo todas as questões, dúvidas e problemas que surgiam durante todo o processo. Agradeço, principalmente, pela paciência, compreensão e por todas as palavras proferidas nos momentos de maior dificuldade. Por sua amizade e pela alegria em trabalharmos juntos. Muito obrigado!

“A relação de ajuda aqui se apresenta como um encontro entre subjetividades cujo objetivo primeiro é favorecer o receptor no desenvolvimento da sua mais completa liberdade pelo crescimento e desenvolvimento das suas próprias faculdades internas, isto é, de seus próprios recursos interiores, sejam eles físicos, psíquicos ou emocionais.

Desde a concepção no organismo materno, estabelece-se a herança genética do novo ser que pode ser um fator que liberta ou limita. Se por um lado temos a influência desses fatores somáticos, por outro, não menos importante, temos as influências psicológicas exercidas sobre o indivíduo desde o nascimento. Partimos do princípio que é na esfera do inter-humano que se desenvolve a liberdade do homem, e nesses encontros algumas relações são positivas e libertadoras, e outras são negativas e limitativas. Desta maneira, conceituamos aqui a liberdade como a aptidão de um ser humano de viver e de atualizar plenamente todos os seus recursos interiores, através de influências positivas e negativas.

Pode-se, portanto, conceituar a relação de ajuda como uma relação positiva e libertadora, uma maneira de ser e proceder no encontro interpessoal que procura libertar na pessoa ajudada seu próprio potencial em sua totalidade. Investe-se na auto-realização, despertando a capacidade daquele que é ajudado a viver mais plenamente do que o fazia antes desse encontro.

Em conformidade com a terminologia de relação de ajuda proposta por Carkhuff (1969, 1971), podemos convencionar como orientador*, "aquele que ajuda" e como orientando*, "aquele que é ajudado", de modo a estendê-los com abrangência as relações de médico e paciente, terapeuta e consultante, coach e cliente, conselheiro e aconselhado, entre outros.

Entenda-se aqui, como profissional de ajuda ou orientador todos aqueles que exercem em nossa sociedade funções cujo encontro seja positivo e benéfico àqueles com os quais entram em comunicação: coaches, terapeutas, médicos, enfermeiras, professores, monitores, assistentes sociais, pais, sacerdotes, membros de comunidades religiosas e conselheiros (sociais, legais, religiosos e morais), entre muitos outros, sendo infinda a lista dos que se dedicam à ajuda genuína para outros seres humanos.

Quanto à maneira de proceder do orientador, considero como ideal as atitudes profundamente adquiridas e integradas, que são expressas congruentemente em seu comportamento e influenciam positivamente o orientando. É imprescindível diferenciar aqui atitudes e técnicas, que segundo Kerlinger (1964, p.483): "Pode-se definir uma atitude como uma predisposição a pensar, sentir, perceber e agir de certa maneira em relação a um ser qualquer". Para o termo técnica conceituo como o conhecimento prático de um conjunto de métodos e pormenores de procedimentos exigidos para a execução de uma abordagem de ajuda.

...

Assim, cabe ao orientador que busca uma relação de ajuda realmente eficaz assumir a responsabilidade de desenvolver as atitudes que vão favorecer a si mesmo e especialmente ao orientando através de uma postura mais positiva frente ao mundo que o cerca, possibilitando um crescimento de suas faculdades internas expressas em saúde física, psíquica, emocional e social e desenvolvimento de sua mais completa liberdade.”

(Trecho extraído do texto acadêmico “A Influência da Atitude do Profissional de Ajuda: Uma Abordagem Multidisciplinar” de Flávio Souza)

À Prof^a. Dr^a. **Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo**, por me receber prontamente em seu laboratório e grupo, pela enorme contribuição com as discussões e dicas nos experimentos, e pelos bons momentos de risadas.

Aos professores **membros da banca examinadora**, pela disponibilidade e contribuição com uma discussão mais minuciosa dos resultados.

Ao Prof. Dr. **Leandro Licursi de Oliveira**, por toda a ajuda desde o início com o treinamento, ensinamentos e sugestões, e por solucionar vários dos meus problemas e dúvidas, e me socorrer em algumas situações como nos experimentos no Åkta e no citômetro de fluxo.

Às doutoras **Ana Paula Favaro Trombone** e **Kely Cristine Coltri**, referenciais importantes a mim no começo deste trabalho.

Às amigas **Wendy Martin Rios**, **Sandra Regina Costa Maruyama** e **Cláudia Danella Polli** pela amizade sincera, confiança, conselhos, valiosas dicas e auxílio em diferentes experimentos, e também pela ajuda no lado pessoal.

Aos amigos de laboratório **Taise Natali Landgraf**, **Mariani Lima Milanezi**, **Ana Carolina Teles**, **Thiago Malardo**, **Luciana Previato de Almeida**, **William Roberto Schluchting**, **Ricardo Luís Louzada da Silva**, **Isabela Cardoso Fontoura**, **Carolina Damas Rocha**, **José Eduardo Cury Fiuza**, **Everton Padilha**, **Renata Ariza Marques Rossetti**, **Julio Cesar Cetrulo Lorenzi**, pelos ensinamentos, pela imensa e importante ajuda, pela agradável convivência e amizade, e pelos excelentes momentos de gargalhadas.

Às técnicas **Izaíra Brandão**, **Ana Paula Masson**, **Ana Flávia Gembre** e **Sheila Batista Severino**, por todo o auxílio prestado nos experimentos e pelos momentos de descontração.

À todos dos Laboratórios do Dr. **Célio Lopes Silva** e da Prof^a. Dr^a. **Vânia Luiza Deperon Bonato Martins**, **Carlos Rodrigo Zárate**, **Liliana Massis**, **Patrícia Marques de Souza**, **Rogério Rosada**, **Rodrigo Ferracine**, **Marina Elisa Singarete**, **Luís Henrique Franco**, **Pryscilla Wowk**, **Denise Moraes**, **Paola Fedatto**, **Cássia Alves Sérgio**, pela colaboração, auxílio e convivência.

À todos do Laboratório da Prof^a. Dr^a. **Maria Cristina Roque Barreira**, em especial ao Dr. **Sandro Gomes Soares**, **Luciana Pereira Ruas**, **Silvia Almeida Cardoso**, **Vânia Sammartino**, e às técnicas **Sandra Maria de Oliveira Thomaz** e **Patrícia Edivânia Vendruscolo** pelo auxílio técnico e valiosas sugestões.

À todos dos Laboratórios do Prof. Dr. **João Santana da Silva**, Prof^a. Dr^a. **Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos**, Prof^a. Dr^a. **Beatriz Rossetti Ferreira**, Prof. Dr. **Vanderlei Rodrigues**, em especial ao **Djalma de Souza Lima Junior**, **Fernanda Agostinho Rocha**, **Wanessa Araújo de Carvalho**, **Gustavo Rocha Garcia**, **Daniela Dantas Moré**, **Alessandra Mara Franzin**, **Carlo José Freire de Oliveira**, **Lizandra Guidi Magalhães** e às técnicas **Olinda Mara Brigatto Tevilato** e **Elenice Macedo Pacello** pelo auxílio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos especialistas da citometria de fluxo, **Walter Miguel Turato** (FMRP) e **Fabiana Rossetto de Moraes** (FCFRP) pela colaboração na aquisição das células e pela interpretação e discussão dos resultados obtidos.

A todos os **funcionários dos biotérios**, em especial ao **Júlio Siqueira** pela amizade e por compreender e inúmeras vezes atender meus pedidos de animais às pressas.

A todos os **companheiros da Pós-Graduação** pelos inúmeros bons momentos compartilhados nas disciplinas, na festa de final de ano, nas festas juninas, nos congressos e nos demais eventos.

À Dr^a. **Marina Oliveira e Paula** pela imensa contribuição com as análises da citometria de fluxo e por transmitir uma importante parte de seu conhecimento nas disciplinas das quais participou.

À Prof^a. Dr^a. **Cristina Ribeiro de Barros Cardoso** pelo auxílio, ensino e dicas nos experimentos com os linfonodos mesentéricos.

Ao doutorando **Felipe Roberti Teixeira** pela ajuda e sugestões no processo de diálise da proteína recombinante e em outros métodos.

A todos os **docentes do Programa de Pós-Graduação** em Imunologia Básica e Aplicada por todos os ensinamentos e pela excelência do Programa.

À secretária do programa de pós-graduação em Imunologia **Ana Cristine S. Ferreira** por toda a atenção, competência e ajuda dos momentos iniciais aos finais.

À secretária do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular **Rosângela Catarina Peral** pela atenção, competência e auxílio.

Ao **Kleber Juvenal Silva Farias**, pelo auxílio no delineamento do experimento com a cloroquina.

Aos pós-doutorandos Dr. **André Pitondo da Silva** e Dr. **Ebert Seixas Hanna**, pelas linhagens de bactérias doadas, mesmo as que não estão presentes neste trabalho.

Aos **funcionários da Documentação Científica** do Hospital das Clínicas da FMRP, pelos serviços prestados, sempre com muita competência.

Aos meus **familiares e amigos**, que de maneiras diferentes compreenderam minha ausência durante todo este processo.

A todos os **funcionários da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** que contribuíram de diversas formas com a realização deste trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** e à **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA)** do Hospital das Clínicas da FMRP/USP, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

A lição do rio

O rio corre sozinho, vai seguindo seu caminho, não necessita ser empurrado. Pára um pouquinho no remanso. Apressa-se nas cachoeiras, desliza de mansinho nas baixadas. Mas, no meio de tudo, vai seguindo o seu caminho. Sabe que há um ponto de chegada. Sabe que o seu destino é para frente. E vitorioso, abraçando outros rios, vai chegando ao mar. O mar é a sua realização e, chegar ao ponto final, é ter feito a caminhada.

A vida deve ser levada do jeito do rio. Deixar que corra como deve correr, sem apressar ou represar, sem medo da calmaria e sem evitar as cachoeiras. Correr do jeito do rio, na liberdade do leito da vida, sabendo que há um ponto de chegada.

A natureza não tem pressa. Vai seguindo o seu caminho. Assim é a árvore, assim são os animais. A fruta forçada a amadurecer antes do tempo perde o gosto.

Desejo ser um rio, livre do empurrão dos outros e dos meus próprios. Livre das poluições alheias e das minhas. Rio original, limpo e livre. Rio que escolheu o seu próprio caminho. Não interessa ter nascido a um ou mil quilômetros do mar. O importante é dizer "cheguei"!

E porque cheguei, estou realizado. A gente deveria dizer: não apresse o rio, ele anda sozinho. Assim deve-se dizer a si mesmo e aos outros: não apresse a vida, ela anda sozinha. Deixe-a seguir seu caminho normal. Interessa saber que há um ponto de chegada e saber que se vai chegar lá.

É bom viver do jeito do rio!

Henfil (Henrique de Souza Filho)

RESUMO

BERLESE, A. **Receptor de aerobactina férrica de *Escherichia coli* comensal induz proliferação de células B-1.** 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Os antígenos das bactérias comensais intestinais induzem uma estimulação imunológica cujo papel é fundamental no controle da microbiota bacteriana e no combate a potenciais patógenos. Neste trabalho objetivamos identificar proteínas ligantes de carboidrato de *E. coli* K-12 e suas propriedades imunoestimuladoras *in vitro*. A cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose foi utilizada para purificar as proteínas de *E. coli*. A análise eletroforética do material ligado à Sepharose, eluído com NaCl 1M, revelou uma banda de 75-kDa, que foi identificada por espectrometria de massa como um fator de virulência responsável pela aquisição de ferro denominado receptor de aerobactina férrica de *E. coli* (IutA). O gene *iutA* foi subclonado no vetor pET28a e a proteína recombinante (rIutA) foi produzida em *E. coli* transformada com este plasmídeo e induzida com IPTG. A proteína recombinante com cauda de Histidina foi purificada em coluna HisTrap. Para avaliar os efeitos imunoestimulatórios, células do baço de camundongos C57BL/6, marcadas com CFSE, foram estimuladas com 20µg/mL de rIutA por 72h. Resultados da citometria de fluxo revelaram que as células B proliferavam em resposta à estimulação. Análises subsequentes com camundongos deficientes em MyD88, TLR2 ou TLR4 mostraram que a proliferação induzida por rIutA necessita de um receptor do tipo Toll (TLR) diferente de TLR2 ou TLR4. Além disso, no ensaio com cloroquina, um inibidor da acidificação endossômico (um pré-requisito para a ativação dos TLRs 7, 8 e 9), também não houve inibição da proliferação de células B. Estas características sugerem que um TLR, exceto os TLRs 1 a 9, em uma via dependente de MyD88, medeia o detecção de IutA, não sendo a proliferação de células B devida à contaminação por LPS. Além disso, a subpopulação de células B que prolifera de maneira predominante é a B-1, tanto B-1a quanto B-1b, visto que não há proliferação de células B em camundongos BALB/Xid, deficientes em células B-1. Nossos resultados sugerem que o receptor de aerobactina férrica estimula o sistema imunológico do hospedeiro através da ativação das células B-1.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Células B-1. Receptor de aerobactina férrica.

ABSTRACT

BERLESE, A. **Ferric aerobactin receptor of commensal *Escherichia coli* induces proliferation of B-1 cells.** 2009. 110 p. Dissertation (Masters) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The antigens from the gut commensal bacteria induce immunological stimulation that may play a crucial role in the control of bacterial microbiota and the combat to potential pathogens. In the present study we aimed to identify a carbohydrate binding protein of the *E. coli* K-12 and its *in vitro* immunostimulatory properties. An affinity chromatography on Sepharose column was used to purify the *E. coli* protein. The electrophoretic analysis of the Sepharose-bound material, eluted with NaCl 1M, revealed a band of 75-kDa, which was identified by electrospray ionization ion trap mass spectrometry as a virulence factor responsible for the iron uptake termed *E. coli* ferric aerobactin receptor IutA. The *iutA* gene was subcloned in pET28a and the recombinant protein (rIutA) was produced in plasmid-transformed *E. coli* induced with IPTG. The His-tagged IutA protein was purified on HisTrap column. To evaluate the immunostimulatory effects, C57BL/6 mice spleen cells, labeled with CFSE, were stimulated with 20 µg/mL of rIutA for 72 h. Flow cytometry analysis revealed that B cells proliferated in response to stimulation. Subsequent analysis with MyD88-, TLR2- or TLR4-deficient mice showed that the rIutA-induced proliferation required some Toll-like receptor (TLR) different from TLR2 and TLR4. Moreover, data from chloroquine, an inhibitor of endosomal acidification (a prerequisite for TLRs 7, 8 and 9 activation), also did not inhibit proliferation of B cells. These characteristics suggest that some of the TLR, except for TLRs 1 to 9, mediate recognition of IutA in a MyD88-dependent pathway, and the B-cell proliferation was not due to LPS contamination. Furthermore, the proliferating B cell subset was the B-1, both B-1a and B-1b cells, since there was absence of proliferation in BALB/Xid mice, which lack B-1 cells. Our data suggest that the ferric aerobactin receptor protein stimulates the host immune system by activating B-1 cell clones.

Keywords: *Escherichia coli*. B-1 cells. Ferric aerobactin receptor.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4B – Sepharose CL-4B

A_{600nm} – Absorbância a 600nm

APC – Células Apresentadoras de Antígeno ou Aloficocianina

ATP – Trifosfato de Adenosina

BALT – Tecido Linfóide Associado aos Brônquios

BCR – Receptor de Célula B

BKO – Camundongo Geneticamente Deficiente de Células B

Btk – Tirosina Quinase de Bruton

CALT – Tecido Linfóide Associado à Conjuntiva

CCR – *CC Chemokine Receptor*

CCL/CXCL – *CC or CXC Chemokine Ligand*

CD – *Clusters of Differentiation*

cDNA – DNA Complementar

CFSE – *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*

CLQ - Cloroquina

ConA – Concanavalina A

D-Man – D-Manose

D-Gal – D-Galactose

DMEM – Meio Essencial Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DO – Densidade Óptica

EAEC – *Escherichia coli* Enteroagregativa

ELISA – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPEC – *Escherichia coli* Enteropatogênica

ERK – Quinase Regulada por Sinal Extracelular

ETEC – *Escherichia coli* Enterotoxigênica

FACS – *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FSC – *Forward Scatter*

Fur – Proteína Reguladora da Aquisição de Ferro

GALT – Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal

GlcNAc – N-acetil glicosamina

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
IRAK – Quinase Associada ao Receptor de IL-1
IROMP – Proteínas de Membrana Reguladas pelo Ferro
iuc – *iron uptake chelate*
iut – *iron uptake transport*
JNK – *cJun N-terminal kinase*
Lac - Lactose
LALT – Tecido Linfóide Associado à Laringe
LB – Meio de Cultura Luria-Bertani
LN – Linfonodo
LNM – Linfonodo Mesentérico
LP – Lâmina Própria
LPS – Lipopolissacarídeo
LRR – Repetições Ricas em Leucina
MAL – Proteína Adaptadora Semelhante a MyD88
MALT – Tecido Linfóide Associado à Mucosa
MAPK – Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MIF – Média da Intensidade de Fluorescência
MM – Massa Molecular
MOPS – Ácido 3-(N-morfolino propano sulfônico)
MS – Espectrometria de Massas
MyD88 – Fator 88 de Diferenciação Mielóide
MyD88^{-/-} – Camundongo Geneticamente Deficiente de MyD88
NALT – Tecido Linfóide Associado à Nasofaringe
NF- κ B – Fator Nuclear κ B
Neu5Gc – Ácido N-glicolilneuramínico
Neu5Ac – Ácido N-acetilneuramínico
OmpA – Proteína A de Membrana Externa
PAMP – Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PBS – Tampão Fosfato
PE – Ficoeritrina
PerCP-Cy5.5 – Proteína Clorofila Peridina - Cianina 5.5

PP – Placa de Peyer

RNA – Ácido Ribonucléico

rpm – Rotações por Minuto

SALT/DALT – Tecido Linfóide Associado à Glândula ou ao Duto Salivar

SARM – *Sterile α - and Armadillo-Motif-Containing Protein*

SBF – Soro Bovino Fetal

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*

SPF – Livre de Patógenos Específicos

SSC – *Side Scatter*

TA – Temperatura Ambiente

TBS – Tampão Tris Salino

TIR – Receptor de Toll/interleucina-1

TLR – *Toll-like Receptors*

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TRAF – *Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor*

TRAM – *TRIF-Related Adaptor Molecule*

TRIF - *TIR Domain-Containing Adaptor Protein Inducing IFN- β*

UPEC – *Escherichia coli* Uropatogênica

VAE – Vênulas de Endotélio Alto

XLA – Agamaglobulinemia Ligada ao X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INTERAÇÕES DA MICROBIOTA BACTERIANA INTESTINAL COM O HOSPEDEIRO	1
1.2. SISTEMA BACTERIANO DE CAPTURA DE FERRO	5
1.3. TECIDOS LINFÓIDES ASSOCIADOS À MUCOSA (MALT'S)	9
1.4. DESCOBERTA DE UMA LECTINA SIMILAR A SM60 EM E. COLI: UMA DOCE COINCIDÊNCIA	18
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. ANIMAIS E REAGENTES	21
3.2. PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA BACTERIANA LIGANTE DE CARBOIDRATO	22
3.2.1. Obtenção de sobrenadante de lisado bacteriano	22
3.2.2. Isolamento de proteínas de <i>E. coli</i> ligantes de carboidrato	23
(A) Screening para se conhecer as resinas mais promissoras.	23
(B) Cromatografia de afinidade	23
3.3. ANÁLISE ELETROFORÉTICA	24
3.4. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	25
3.5. SUBCLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE IUTA RECOMBINANTE EM SISTEMA BACTERIANO	25
3.5.1. Subclonagem de <i>iutA</i> em vetor de expressão	25
3.5.2. Indução e cinética de expressão da proteína recombinante	28
3.5.3. Purificação da proteína recombinante	29
3.6. COLETA E OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO BAÇO E DOS LINFONODOS MESENTÉRICOS	30
3.7. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS B CONVENCIONAIS (B-2 OU CD43-) E CD43+ POR ESFERAS MAGNÉTICAS	30
3.8. COLETA E OBTENÇÃO DE CÉLULAS B-1 DA CAVIDADE PERITONEAL	30
3.9. CITOMETRIA DE FLUXO	31
3.9.1. Análise da expressão de marcadores característicos de leucócitos	31
3.9.2. Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE	32
3.10. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO AZUL DE TRYPAN	33
3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4. RESULTADOS	34
4.1. E. COLI K-12 APRESENTA PROTEÍNAS LIGANTES DE AGAROSE	34
4.2. SEQUÊNCIAMENTO DE PROTEÍNAS DE E. COLI LIGANTES DE CARBOIDRATO	44
4.3. EXPRESSÃO DE IUTA RECOMBINANTE	45
4.4. CÉLULAS B DO BAÇO PROLIFERAM FRENTE AO ESTÍMULO COM IUTA RECOMBINANTE	47
4.5. POLIMIXINA B NÃO INIBE A RESPOSTA PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS B INDUZIDA PELO RECEPTOR DE AEROBACTINA	49
4.6. CÉLULAS B CONVENCIONAIS (CD43-) E B-1 (CD43+) PROLIFERAM QUANDO ESTIMULADAS COM IUTA ..	51
4.7. A PROLIFERAÇÃO DOS LINFÓCITOS B DEPENDE DE MyD88 E PROVAVELMENTE OCORRE VIA UM DOS TLR	60
4.8. RECEPTOR DE AEROBACTINA INDUZ PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS B-1 NO LINFONODO MESENTÉRICO	65
5. DISCUSSÃO	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
7. ANEXO	94
7.1. ESQUEMA DE GATES UTILIZADO NA CITOMETRIA DE FLUXO	94

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal dos mamíferos compreende inúmeras espécies de bactérias (Xu, Bjursell *et al.*, 2003) as quais, em geral, estabelecem uma relação de mutualismo com o hospedeiro. A natureza pacífica desta relação pode ser definida nas palavras simbiose, uma relação mutuamente vantajosa entre dois ou mais organismos vivos, e comensal, originária do latim *cum mensa*, “compartilhando a mesa”. De fato, o lúmen intestinal provê às bactérias um habitat estável e rico em fontes de energia derivadas dos alimentos ingeridos (revisado por Macpherson e Harris, 2004). Por outro lado, as bactérias quebram componentes alimentares não digeridos pelo hospedeiro, geram nutrientes essenciais, estimulam o crescimento e as funções protetoras das células epiteliais intestinais, induzem a angiogênese e facilitam o desenvolvimento do sistema imunológico intestinal (Macpherson e Harris, 2004; Rakoff-Nahoum, Paglino *et al.*, 2004; Rhee, Sethupathi *et al.*, 2004). A importância da microbiota bacteriana no desenvolvimento do sistema imunológico intestinal é revelada por vários estudos que demonstram que animais mantidos em condições estéreis (*germ-free*) apresentam defeitos na barreira formada pela mucosa epitelial, estruturas linfóides desorganizadas, células do sistema imunológico imaturas (menor número de células B e T) e níveis muito baixos de imunoglobulinas (Ig) das classes G, A e E (Van Der Heijden, Stok *et al.*, 1987).

1.1. Interações da microbiota bacteriana intestinal com o hospedeiro

A primeira etapa do processo de colonização de um hospedeiro constitui-se na ligação do agente colonizador ao epitélio do organismo colonizado. Esse contato inicia uma dinâmica molecular de intercomunicação que determina a resultante da colonização. Essa capacidade de aderir às células do hospedeiro é mediada por estruturas da superfície do microorganismo coletivamente chamadas de adesinas. A especificidade da adesina por tipos de ligantes

diferencialmente expressos nos tecidos epiteliais do hospedeiro é, certamente, o determinante da especificidade do microorganismo pelo tecido (Henderson, Wilson *et al.*, 1999).

As adesinas podem ser divididas em duas classes principais, de acordo com sua estrutura e mecanismos de organização: as adesinas fimbriais e as não-fimbriais. Adesinas fimbriais são compostas de heteropolímeros de diversas subunidades, enquanto as não-fimbriais consistem de uma simples proteína ou homotrímeros (Soto e Hultgren, 1999). Em bactérias Gram-negativas, uma grande variedade de moléculas ou estruturas pode funcionar como adesinas, sendo todas as descritas localizadas em fímbrias ou *pili*. Em geral, as estruturas de reconhecimento estão localizadas na extremidade da fímbria, o que promove uma melhor adesão ao receptor da célula epitelial. O fato da camada mucosa dos organismos superiores ser altamente glicosilada permitiu que no processo de co-evolução as bactérias pudessem desenvolver adesinas bacterianas que reconhecem carboidratos específicos desses tecidos. Assim, as lectinas, proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico que se liga reversível e especificamente a um monossacarídeo ou oligossacarídeo, têm emergido como estruturas importantes nesse processo de reconhecimento tecidual pelo microorganismo, exercendo um papel essencial na colonização e em determinadas infecções (Sharon e Lis, 2004).

A especificidade de ligação a glicolipídios pode explicar o tropismo tecidual de algumas bactérias. O epitélio colunar que margeia o intestino grosso expressa o dissacarídeo galabiose covalentemente associado à ceramida (Gal α 1-4Gal-Cer), glicolipídio que não é encontrado nas células que limitam o intestino delgado; assim, *Bacteroides*, *Clostridium*, *E. coli* e *Lactobacillus*, que aderem ao epitélio através de lectina que reconhece esse glicolipídio, só colonizam o intestino grosso.

Dentre as bactérias Gram-negativas que colonizam o intestino grosso, destaca-se a *E. coli* como um dos seres vivos mais estudados. *E. coli* tipicamente coloniza o trato

gastrointestinal humano dentro de poucas horas após o nascimento. Geralmente, a *E. coli* e o seu hospedeiro humano coexistem de forma saudável e com benefícios mútuos por décadas. Estas linhagens de *E. coli* comensais raramente causam doenças, exceto em hospedeiros imunocomprometidos e nos locais onde as barreiras gastrointestinais estão rompidas como, por exemplo, na peritonite. O nicho da *E. coli* comensal é a camada mucosa do intestino dos mamíferos. Esta bactéria é um excelente competidor neste local, habitado extensivamente por inúmeras outras bactérias, sendo o microorganismo anaeróbico facultativo mais abundante da microbiota intestinal humana. Apesar da extensa literatura sobre a genética e fisiologia desta espécie, os mecanismos pelos quais *E. coli* garante esta bem sucedida simbiose no cólon estão pouco caracterizados. Uma hipótese interessante sugere que *E. coli* explora a habilidade em utilizar o gluconato no cólon mais eficientemente que as outras espécies residentes, assim permitindo que esta espécie ocupe um nicho metabólico altamente específico (Sweeney, Klemm *et al.*, 1996).

O papel das adesinas e lectinas na simbiose de *E. coli* com o hospedeiro não é bem conhecida, talvez por serem os estudos com essas bactérias centrados nas linhagens patogênicas, onde muitas dessas estruturas foram descritas. A primeira evidência direta de que bactérias poderiam conter lectina foi obtida em *E. coli*, em 1979, quando Aronson *et al.* demonstraram que a infecção do trato urinário de camundongos por *E. coli* poderia ser prevenida por metil- α -D-manopiranosídeo. Após essa importante descoberta, foi determinado que nas fímbrias tipo 1 de *E. coli* existe uma lectina, subunidade FimH, que se liga preferencialmente à oligomanose e oligossacarídeos de glicoproteínas da superfície de células animais. Esses carboidratos estão presentes no epitélio do trato urinário de algumas espécies de mamíferos e o seu reconhecimento pela lectina das fímbrias promove a adesão do patógeno às células do epitélio local. Essas fímbrias são indutoras de fagocitose e de *burst* respiratório de neutrófilos, fenômeno importante na resposta inflamatória aguda. As fímbrias de tipo S

dessas mesmas bactérias reconhecem resíduos de ácido siálico em laminina, constituinte da membrana basal (Johnson, 1994).

A fímbria do tipo 1 é um fator de virulência que está presente em 80% de todas as infecções por *E. coli* uropatogênicas (UPEC). O segundo fator de virulência mais comumente encontrado em UPEC são as fímbrias P. Tais fímbrias reconhecem glicoesfingolipídios de rim que carregam o dissacarídeo Gal α 1–4 Gal, sendo importante na patogênese de pielonefrite causada por UPEC. A ligação de fímbrias P aos receptores oligossacarídicos também induzem ativação de células epiteliais e a produção de citocinas inflamatórias IL-6 e IL-8 (Kucheria, Dasgupta *et al.*, 2005). Já algumas cepas de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), que afetam ruminantes, apresentam fímbrias F17, cuja subunidade terminal F17-G se liga especificamente a N-acetil-glucosamina (GlcNAc) presente em receptores nas microvilosidades do epitélio intestinal desses animais, o que leva a diarreia ou septicemia (Buts, Bouckaert *et al.*, 2003; Sharon, 2006).

E. coli K99 ilustra muito bem a relação que há entre lectinas de superfície bacteriana e tropismo para o tecido animal. Essas bactérias se ligam à glicolipídios que contém ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), na forma de Neu5Gc α 2–3Gal β 1–4Glc, entretanto não se ligam à glicolipídios que contenham ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac). Esses açúcares diferem em apenas um grupo hidroxil, presente no grupo amino do carbono-5 de Neu5Gc e ausente em Neu5Ac. O Neu5Gc é encontrado nas células intestinais de porcos recém-nascidos, porém desaparece durante o desenvolvimento desses animais, não sendo formado normalmente em adultos. Esse fato explica o porquê de *E. coli* K99 causar diarreia letal em leitões mas não em porcos adultos (Connell, Agace *et al.*, 1996; Mouricout, 1997; St Geme, 1997; Aikawa e Esko, 1999; Sauer, Mulvey *et al.*, 2000). Dessa maneira, torna-se evidente que lectinas são estruturas relevantes nos processos de colonização e infecção por bactérias, bem como para muitos outros microorganismos. Apesar da interação proteína-carboidrato

estar sendo extensivamente estudada, ela ainda representa um campo a ser explorado, pois novas lectinas, bem como suas estruturas e funções, podem ainda ser pesquisadas.

1.2. Sistema bacteriano de captura de ferro

As sequências genômicas de diversas espécies bacterianas comensais fornecem uma noção de como as bactérias foram selecionadas evolutivamente para realizarem suas diferentes funções metabólicas dentro do intestino do hospedeiro (Hooper, Wong *et al.*, 2001; Xu, Bjursell *et al.*, 2003; Pridmore, Berger *et al.*, 2004). Por exemplo, um grande número de proteínas envolvidas no metabolismo de polissacarídeos é codificado nas sequências genômicas de duas bactérias comensais intestinais, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *Bifidobacterium longum* (Schell, Karmirantzou *et al.*, 2002; Xu, Bjursell *et al.*, 2003). Ainda, outros genes relacionados ao metabolismo capacitam essas bactérias em utilizar glicoconjugados do hospedeiro como fontes alternativas de energia, ilustrando assim, a precisão desta adaptação evolutiva (Sonnenburg, Xu *et al.*, 2005).

Além destes genes, vários outros estão relacionados à aquisição de nutrientes essenciais como, por exemplo, o ferro. O ferro é um nutriente indispensável para o crescimento de quase todas as células procarióticas e eucarióticas, com notáveis exceções incluindo as bactérias *Borrelia burgdorferi* (Posey e Gherardini, 2000) e *Lactobacillus plantarum* (Weinberg, 1997). Desta maneira, uma forma de controlar o crescimento bacteriano pode ser atingida pelo controle da disponibilidade de ferro no ambiente. Este nutriente é muito importante, pois participa em vários processos metabólicos e bioquímicos, incluindo passos da transferência de elétrons através da cadeia respiratória e síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA). Pelo fato de o Fe^{3+} formar hidróxidos insolúveis, a concentração deste íon na água é muito baixa (10^{-18}M). Proteínas ligantes de ferro de mamíferos reduzem ainda mais esta concentração para aproximadamente 10^{-24}M no soro humano (Raymond,

Dertz *et al.*, 2003). Esta escassez de ferro disponível representa um fator limitante para as bactérias, que necessitam de uma concentração citoplasmática de ferro de $\sim 10^{-6}$ M para o crescimento (Andrews, Robinson *et al.*, 2003). As bactérias responderam a esta pressão seletiva por meio da evolução da capacidade em adquirir ferro por numerosos (e muitas vezes redundantes) mecanismos, incluindo a captura do ferro ligado aos carreadores de ferro de mamíferos (transferrina, ferritina, lactoferrina e heme) e a produção de moléculas de baixo peso molecular com alta afinidade pelo Fe^{3+} , conhecidas como sideróforos (Crosa e Walsh, 2002).

A ligação e internalização dos sideróforos ocorrem por meio de proteínas de membrana reguladas pelo ferro (do inglês *iron-regulated outer membrane proteins* – IROMPs). Estas proteínas medeiam a captura específica dos sideróforos aerobactina férrica ou enterobactina férrica (Neilands, 1992). O operon da aerobactina regulado pelo ferro, com cerca de 8kb, do plasmídeo ColV-K30 de *E. coli* K-12 consiste de no mínimo cinco genes para a síntese (*iuc* – *iron uptake chelate*) e transporte (*iut* – *iron uptake transport*) da aerobactina (Figura 1). A ordem destes genes é *iucA*, *iucB*, *iucC*, *iucD* e *iutA*. O produto do gene *iutA* é um receptor de membrana externa para a aerobactina férrica, com massa molecular de 74kDa, enquanto as quatro proteínas restantes estão envolvidas na biossíntese da aerobactina (De Lorenzo, Bindereif *et al.*, 1986).

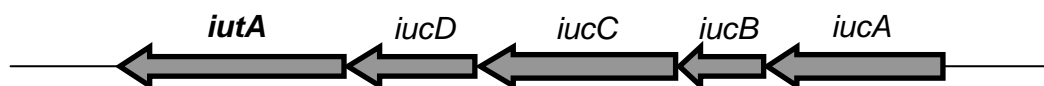


Figura 1 | Representação esquemática dos genes da região do plasmídeo ColV-K30 de *E. coli* K-12 que codificam os componentes envolvidos no sistema de captura de ferro pela aerobactina. Destaque para o gene *iutA* que codifica o receptor de aerobactina.

Durante o crescimento em ambientes depletados em ferro, as bactérias secretam no ambiente os sideróforos. Os sideróforos têm como função tornar o ferro solúvel antes deste

ser transportado para o interior da célula. Este complexo ferro-sideróforo se liga a um dos vários receptores de membrana externa que reconhece especificamente este complexo ou outras fontes de ferro, como o citrato férrico, heme, lactoferrina e transferrina (Ferguson, Hofmann *et al.*, 1998; Buchanan, Smith *et al.*, 1999; Ferguson, Chakraborty *et al.*, 2002). Cada receptor é específico para uma condição de falta de ferro ou para uma fonte de ferro disponível (Hantke e Braun, 2000). Pelo fato dos complexos ferro-sideróforo serem muito grandes para difundir pelos poros, eles são ativamente transportados através da membrana externa por uma maquinaria que utiliza trifosfato de adenosina (ATP): o complexo TonB-ExbB-ExbD (Larsen, Thomas *et al.*, 1994; Higgs, Myers *et al.*, 1998). Já no periplasma, os complexos são transportados através da membrana interna por diferentes sistemas de transporte ABC (FecBCDE, FepBCDEFG e FhuBCD). Então, após estes complexos ferro-sideróforo atingirem o citoplasma, acredita-se que o metal seja liberado do sideróforo, provavelmente pela redução para a forma solúvel do ferro (Fe^{2+}) e, sequestrado pelas proteínas que utilizam o ferro. Em condições anaeróbicas, na qual o metal é solúvel, *E. coli* também captura o ferro diretamente através da FeoB, um sistema dependente de ATP específico para a forma solúvel do ferro (Hantke, Nicholson *et al.*, 2003).

Após o ferro intracelular atingir níveis aceitáveis para o metabolismo bacteriano, a proteína Fur é ativada (do inglês *ferric uptake regulation*), se liga aos promotores da maioria dos genes de aquisição de ferro e reprime a transcrição destes. A forma solúvel do ferro, Fe^{2+} , atua como um cofator para a proteína Fur na regulação gênica (Hantke e Braun, 1997). De maneira inversa, quando a concentração de ferro diminui, Fur se torna inativa e a repressão dos genes ligados à aquisição de ferro é abolida. Pelo fato de Fur detectar o nível de ferro intracelular e ajustar a expressão gênica de acordo com o microambiente da bactéria, ela é considerada como o regulador chave da homeostase do ferro nas bactérias. Além disso, pelo fato dos genes regulados pela proteína Fur estarem envolvidos em inúmeras funções celulares,

Fur é considerada uma proteína reguladora global (Mchugh, Rodriguez-Quinones *et al.*, 2003).

Recentemente, alguns autores sugeriram que as moléculas do sistema de captura de ferro poderiam ser usadas como alvo vacinal. Essa proposição se fundamenta no fato de serem encontrados frequentemente em soros de pacientes em fase de convalescência anticorpos antireceptores de membrana externa do sistema de captação de ferro de bactérias Gram-negativas (Wooldridge e Williams, 1993). Entretanto, têm-se discutido que essas vacinas poderiam ser ineficientes em algumas linhagens de *E. coli* devido a inacessibilidade dos receptores aos anticorpos (Roberts, Wooldridge *et al.*, 1989). Além disso, bactérias simbiotes e comensais também compartilham sistema de captura de ferro com bactérias patogênicas, e respostas imunológicas contra esses sistemas poderiam ser mais danosas que benéficas. Williamns *et al.* (2006) sugerem que as imunoglobulinas seriam protetoras se produzidas contra as diversas estruturas da bactéria e não apenas aos receptores de sideróforo-Fe. A manipulação do sistema de captura de ferro seria importante para atenuar as bactérias a ser usadas como alvo vacinal. Esses autores imunizaram camundongos com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutante para os genes *iron*, *fepA* e *cir* e obtiveram proteção completa desses camundongos quando desafiados com linhagem virulenta parental. Caso se confirme que esse protocolo é realmente eficaz em conferir resistência a patógenos dependente de sideróforos, tais linhagens atenuadas abrem perspectivas para testes clínicos e veterinários (Williams, Rabsch *et al.*, 2006).

1.3. Tecidos linfóides associados à mucosa (MALTs)

Além de alterar a disponibilidade de micronutrientes essenciais à replicação das bactérias no ambiente intestinal, o hospedeiro utiliza outras estratégias para controlar o crescimento bacteriano e manter a homeostase com a microbiota intestinal (Doherty, Weaver *et al.*, 2002). A mucosa intestinal é um importante centro imunológico do corpo, abrigando cerca de 80% da população de leucócitos. Estas células são importantes para a homeostase, com uma população estimada em 100 trilhões de bactérias que residem no intestino. A desregulação desta homeostase resulta em uma classe de doenças coletivamente denominadas doenças inflamatórias intestinais.

A mucosa intestinal é formada por diversos componentes anatômicos e celulares altamente especializados, cada um dos quais é necessário para manter a homeostase. Os compartimentos envolvidos na imunidade intestinal podem ser divididos principalmente em sítios de indução – onde antígenos obtidos da superfície mucosa estimulam as células B e T *naïve* – e sítios efetores – onde as células efetoras após extravasamento, retenção e diferenciação desempenham suas ações, por exemplo, contribuindo com a formação de anticorpos IgA (Brandtzaeg, Kiyono *et al.*, 2008) (Figura 2). Os sítios de indução na imunidade de mucosa são constituídos pelos MALTs (do inglês *mucosa-associated lymphoid tissues*) assim como pelos linfonodos drenantes de mucosa (LNs) locais ou regionais, enquanto os sítios efetores consistem de compartimentos histológicos distintos incluindo a lâmina própria (LP), o estroma das glândulas exócrinas, e a superfície epitelial (Brandtzaeg e Pabst, 2004). As placas de Peyer (PPs) no intestino delgado de humanos, roedores e coelhos são estruturas MALT típicas as quais se acredita ser a principal fonte de células B (Fagarasan e Honjo, 2003; Brandtzaeg e Johansen, 2005). Notavelmente, todas as estruturas MALT se assemelham a linfonodos por possuírem zonas de células T entremeando os folículos de células B, além disso, contêm uma variedade de células apresentadoras de antígenos,

incluindo células dendríticas e macrófagos. Entretanto, os MALTs não possuem vasos linfáticos aferentes porque todas estas estruturas linfóides obtêm antígenos exógenos diretamente das superfícies mucosas através das células M presentes na superfície epitelial (Brandtzaeg e Pabst, 2004). Estas células epiteliais, delgadas e especializadas, transferem efetivamente antígenos solúveis e especialmente particulados, como microorganismos, do lúmen intestinal para os MALTs (Neutra, Mantis *et al.*, 2001). Os MALTs são subdivididos de acordo com a localização anatômica principalmente em tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT), tecido linfóide associado aos brônquios (BALT) e tecido linfóide associado à nasofaringe (NALT). Muitas outras potenciais estruturas MALT foram nomeadas, porém não estão muito bem caracterizadas como as citadas anteriormente. Alguns exemplos são o tecido linfóide associado à laringe (LALT), o tecido linfóide associado à glândula ou ao duto salivar (SALT/DALT) e o tecido linfóide associado à conjuntiva (CALT) (Brandtzaeg, Kiyono *et al.*, 2008).

Os GALTs compreendem as placas de Peyer, o apêndice, e os folículos linfóides isolados, que são considerados sítios de indução para as células B e T da mucosa (Brandtzaeg e Pabst, 2004). É importante ressaltar que, embora façam parte do sistema imunológico intestinal, os linfonodos mesentéricos não são considerados GALTs/MALTs. Esta distinção é importante para enfatizar a característica exclusiva dos MALTs em obterem antígenos diretamente do lúmen através das células M (Neutra, Mantis *et al.*, 2001).

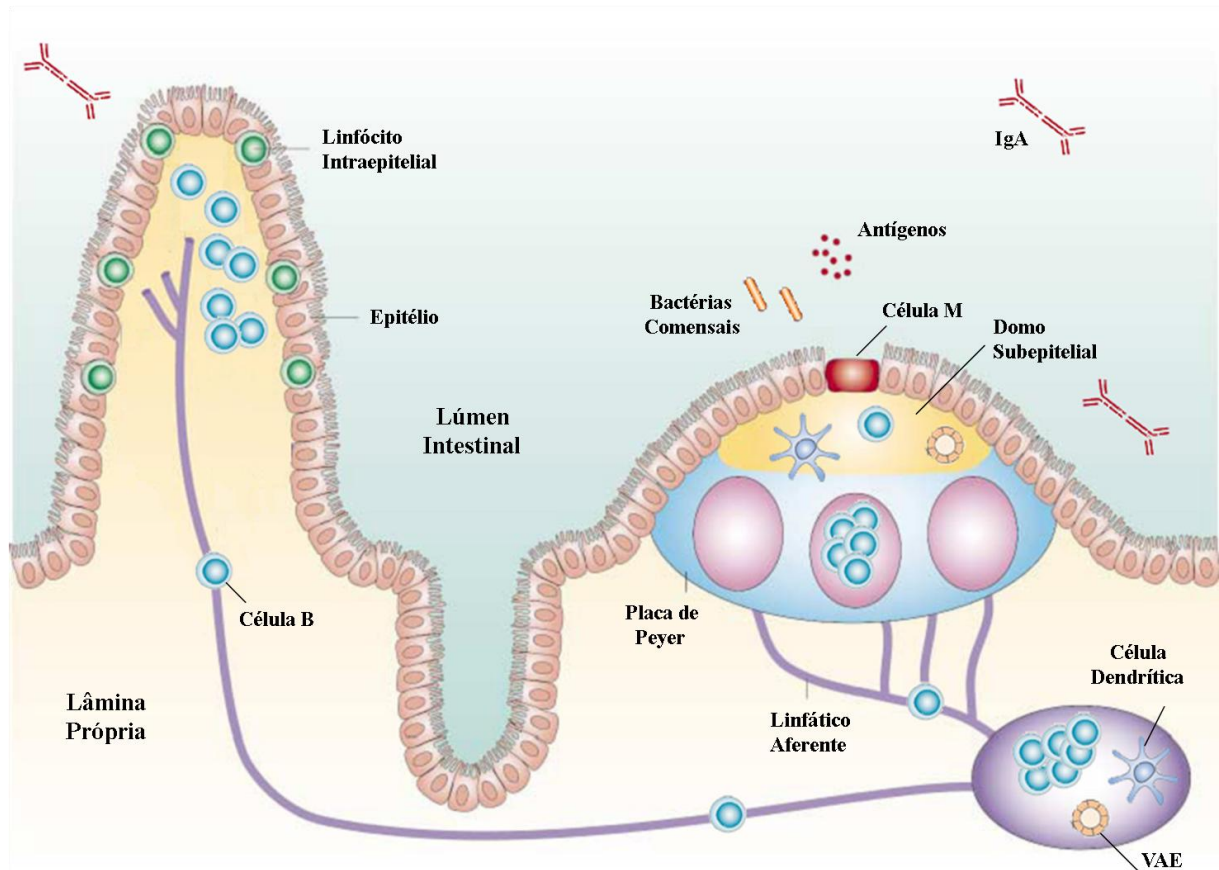


Figura 2 | Representação esquemática dos elementos linfóides do sistema imunológico intestinal e da migração das células B. Sítios de indução da imunidade de mucosa são constituídos pelos MALTs regionais, como as placas de Peyer, com seus folículos de células B e células M associadas ao epitélio através das quais os antígenos exógenos ou bactérias inteiras são transportados até o domo subepitelial onde entrarão em contato com as APCs ou as células B. As células B *naïve* entram no MALT (e linfonodos mesentéricos) através das vênulas pós capilares de endotélio alto (VAE). Após serem primadas e se tornarem células B efetoras ou de memória, elas migram do MALT e dos linfonodos em direção ao sangue periférico para um subsequente extravasamento em sítios efetores na mucosa, como a lâmina própria. Nos sítios efetores ocorre a secreção de IgA que é transportada para o lúmen intestinal pelas células epiteliais. (Figura modificada de Mowat, 2003).

No intestino, os antígenos do lúmen são obtidos de maneira inespecífica pelas células M e transportados à região rica em células do sistema imunológico, o domo subepitelial (Neutra, Mantis *et al.*, 2001). Em relação às células B, estas podem ser ativadas diretamente por estes antígenos ou indiretamente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) locais. Estas APCs capturam e apresentam estes antígenos para as células B e T na placa de Peyer e também migram para o linfonodo mesentérico para ativar outras células (Pron, Boumaila *et al.*, 2001; Shreedhar, Kelsall *et al.*, 2003). Ainda, estas APCs ativadas produzem citocinas e quimiocinas que provocam a amplificação da resposta por meio da ativação e o recrutamento

de outras células. Algumas das células B ativadas começam a proliferar e formam centros germinativos dentro das placas de Peyer ou nos linfonodos mesentéricos (LNMs), locais que foram identificados como os sítios onde ocorre a maturação de afinidade e provavelmente a troca de isotipo de IgM para IgA. Entretanto, recentemente foi demonstrado que a troca de isotipo de células B220⁺IgM⁺, ao menos em parte, ocorre na lâmina própria sob influência de estímulos locais. A maioria das células B diferenciadas deixam as placas de Peyer e os LNMs e migram através dos vasos linfáticos e do duto torácico para o sangue e finalmente à lâmina própria onde acumulam (Fagarasan, Kinoshita *et al.*, 2001).

Em conjunto, os compartimentos citados anteriormente compreendem sítios anatômicos para a organização, indução e execução das fases efetoras da imunidade intestinal, que são essenciais à sobrevivência do hospedeiro. Os leucócitos destes compartimentos desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase com a microbiota entérica e os antígenos alimentares, assim como mantêm a imunidade aos agentes infecciosos. Um leucócito com papel chave em manter a homeostase e a imunidade é a célula B. A função mais estudada das células B na mucosa é a da gênese de plasmócitos produtores de IgA (revisado por Fagarasan e Honjo, 2003). A IgA constitui o anticorpo mais abundante no intestino, local onde provê proteção por meio de anticorpos com ligação de alta ou baixa afinidade (Suzuki, Ha *et al.*, 2007). Enquanto a IgA de alta afinidade neutraliza toxinas e patógenos, a IgA de baixa afinidade impede a adesão de bactérias comensais às células epiteliais do intestino. As células epiteliais são requeridas para que as IgAs realizem suas funções de maneira completa. Estas células epiteliais expressam um receptor de Ig polimérico que transporta os oligômeros de IgA secretados pelas células B da LP para a superfície mucosa (Cerutti, 2008).

Trabalhos recentes indicam que as células epiteliais funcionam não somente como transportadoras de IgA, mas também como indutoras da produção de IgA (Cerutti, 2008).

Acredita-se que as células B IgA⁺ ou os plasmablastos IgA⁺ migrem das PPs aos LNMs e através dos dutos torácicos linfático e sanguíneo retornam à LP do intestino (Guy-Grand, Griscelli *et al.*, 1974; McWilliams, Phillips-Quagliata *et al.*, 1977). O *homing* preferencial das células IgA⁺, mas não de células IgM⁺ ou IgG⁺, para o intestino é explicado pela alta expressão de CCR9. O ligante de CCR9 é o TECK/CCL25, uma quimiocina expressa no intestino delgado, especialmente nas criptas epiteliais (Kunkel, Campbell *et al.*, 2000; Bowman, Kuklin *et al.*, 2002). A migração para o interior da LP das vilosidades parece depender da CXCL12, pelo fato das células B IgA⁺ (assim como as células IgM⁺ e IgG⁺) responderem a CXCL12, e esta quimiocina também ser expressa no intestino (Agace, Amara *et al.*, 2000; Bowman, Kuklin *et al.*, 2002; Cyster, 2003).

Uma das fontes de células B que contribui para a geração de plasmócitos intestinais secretores de IgA é a cavidade peritoneal, que abriga um tipo especial de células B denominadas células B-1 (Kroese, Butcher *et al.*, 1989; Fagarasan, Watanabe *et al.*, 2000; Herzenberg e Tung, 2006). As células B-1, de modo geral, diferem das células B convencionais por sua capacidade de auto-renovação, localização anatômica, marcadores de superfície, origem e repertório de anticorpos (Kantor, Stall *et al.*, 1992). Além disso, estas células estão presentes em diferentes frequências nos órgãos linfóides variando inclusive de acordo com a linhagem do camundongo. Dentre os vários órgãos linfóides, as menores quantidades e proporções destas células são encontradas nos linfonodos e no baço, enquanto as cavidades pleural e peritoneal são os locais de maior frequência destas células em camundongos (Thiriot, Drapier *et al.*, 2007). As células B-1 peritoneais expressam altos níveis de IgM de superfície e baixos níveis de IgD, CD23 e B220. E além do Mac-1 (integrina α M β 2, receptor do complemento 3, CD11b/CD18), um marcador de superfície de macrófagos, uma fração significativa de células B-1 peritoneais expressam CD5 (marcador de superfície de

células T), e são denominadas células B-1a, enquanto a fração restante constitui as células B-1b.

As células B-1 expressam altos níveis de integrinas e CD9, uma tetraspanina que se associa a outras moléculas de superfície, como as integrinas $\beta 1$ ou $\alpha 6$, e regulam a motilidade celular (Won e Kearney, 2002; Tumang, Hastings *et al.*, 2004; Ha, Tsuji *et al.*, 2006). Embora o número de células B-1 seja relativamente reduzido quando comparado ao número de células B convencionais periféricas (B-2), elas têm uma contribuição significativa na produção de anticorpos IgM de baixa afinidade que estão presentes no soro de camundongos *germ-free* conhecidos como anticorpos naturais (Avrameas e Ternynck, 1995; Baumgarth, Tung *et al.*, 2005). Diferente das IgMs naturais derivadas de B-1, a produção de IgA requer a presença da microbiota intestinal (Kroese e Bos, 1999). Isto indica que a participação das células B-1 na produção de IgA no intestino é provavelmente induzida por meio da estimulação antigênica. Camundongos *germ-free* acumulam um número significativamente maior de células B-1 na cavidade peritoneal quando comparados a animais mantidos em locais livres de patógenos, porém abrigando diversas comunidades microbianas comensais (Ha, Tsuji *et al.*, 2006). Juntas, estas observações sugerem que uma fração significativa de células B-1 detecta as bactérias intestinais e é constantemente induzida a migrar para fora da cavidade peritoneal.

Lesões intestinais induzidas por inflamações agudas do intestino ou estimulação direta das células B-1 peritoneais por ligantes dos receptores do tipo Toll (TLR – do inglês *Toll-like receptors*) como o lipopolissacarídeo (LPS) ou peptidoglicano, induzem um egresso significativo de células B-1 da cavidade peritoneal e sua relocalização nos tecidos efetores, como a lâmina própria no intestino (Ha, Tsuji *et al.*, 2006). O mecanismo molecular que contribui para a mobilização induzida pelos TLRs de células B-1 da cavidade peritoneal envolve uma diminuição coordenada na expressão de integrinas e CD9, e a ativação de receptores acoplados à proteína G (Itakura, Szczepanik *et al.*, 2005; Ha, Tsuji *et al.*, 2006).

Conjuntamente, estas mudanças permitem o desprendimento das células da matriz local e um movimento rápido em resposta às quimiocinas homeostáticas. Observações recentes sugerem que o ambiente peritoneal compromete não apenas as células B-1, mas também as células B do baço com as propriedades de migração à região intestinal, por meio do aumento da expressão da integrina $\beta 7$ e também de receptores de quimiocinas como a CXCR5 e CXCR4 (Berberich, Forster *et al.*, 2007).

Além de apresentarem um papel na indução da migração das células B-1 da cavidade peritoneal aos tecidos efetores, os TLRs desempenham papéis essenciais na transdução de sinais de ativação que estimulam diferentes células relacionadas à imunidade inata, refletindo no desenvolvimento de uma eficiente resposta imunológica adquirida. Os TLRs são glicoproteínas transmembrana compostas de domínios de sinalização extracelular, transmembrana e intracelular (Gay e Gangloff, 2007). O domínio extracelular tem repetidos módulos de repetições ricas em leucina (LRR, do inglês *leucine-rich repeat*) e é responsável pela ligação dos chamados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs – do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) os quais são altamente conservados (Janeway, 1989; Medzhitov, 2001). Até o momento 13 TLRs foram identificados em camundongos (Takeda e Akira, 2005). Os respectivos ligantes da maioria dos TLRs são conhecidos (Kawai e Akira, 2006). Por exemplo, o TLR2, em associação com o TLR1 ou o TLR6, detecta diferentes componentes bacterianos incluindo peptidoglicano, lipopeptídeo e lipoproteína (Takeuchi, Kawai *et al.*, 2001; Takeuchi, Sato *et al.*, 2002). O TLR3 detecta ácido ribonucléico (RNA) de dupla fita que é produzido por muitos vírus durante a replicação e também pode ser ativado por um análogo sintético do RNA de dupla fita, o ácido poliinosínico-policitidílico [poly(I:C)] (Alexopoulou, Holt *et al.*, 2001). O TLR4 detecta o LPS, um dos principais componentes da membrana externa de bactérias Gram-negativas (Akashi, Nagai *et al.*, 2001; Nagai, Akashi *et al.*, 2002). O TLR5 detecta a flagelina bacteriana (Hayashi, Smith *et al.*, 2001). O TLR7

detecta moléculas sintéticas semelhantes à imidazolquinolina, análogos da guanosina, RNA simples fita, e o vírus influenza (Diebold, Kaisho *et al.*, 2004; Heil, Hemmi *et al.*, 2004). O TLR8 possui a maior homologia ao TLR7, enquanto o TLR8 humano medeia a detecção de imidazolquinolinas e RNA simples fita, o TLR8 murino parece não ser funcional (Heil, Hemmi *et al.*, 2004). O TLR9 detecta motivos CpG nos DNA bacteriano e viral, e o pigmento malárico hemozoína (Krug, French *et al.*, 2004; Coban, Ishii *et al.*, 2005). O TLR11 responde especificamente às bactérias uropatogênicas (Zhang, Zhang *et al.*, 2004) e à molécula semelhante à profilina das infecções por protozoários (Yarovinsky, Zhang *et al.*, 2005). Os ligantes de TLR10, TLR12 e TLR13 ainda não foram identificados (Akira e Takeda, 2004; Hasan, Chaffois *et al.*, 2005).

A dimerização induzida pelos ligantes de TLR ativa o recrutamento de proteínas sinalizadoras aos domínios intracelulares do receptor de Toll/interleucina-1 (TIR – do inglês *Toll/interleukin receptor*) para iniciar a sinalização (O'Neill e Bowie, 2007). Os domínios intracelulares TIR são compostos de cerca de 150 resíduos de aminoácidos. As cascatas de sinalização desencadeadas por estes domínios são mediadas por moléculas adaptadoras específicas que incluem MyD88 (*myeloid differentiation factor-88*), MAL (*MyD88 adapter-like protein* - também conhecida como TIRAP), TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) e SARM (*sterile α - and armadillo-motif-containing protein*) (Kawai e Akira, 2006; O'Neill e Bowie, 2007). Estas proteínas adaptadoras também contêm domínios TIR e interações TIR-TIR entre receptor-receptor, receptor-adaptador e adaptador-adaptador são essenciais para a sinalização (Palsson-Mcdermott e O'Neill, 2007). Esta sinalização sequencial envolve, além das moléculas adaptadoras, o recrutamento de proteínas quinases como IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) e TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*) que levam à ativação de NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) assim como as MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), ERK

(*extracellular signal-regulated kinase*), p38 e JNK (*cJun N-terminal kinase*) (Barton e Medzhitov, 2003). Estas cascatas bioquímicas culminam, por exemplo, na produção de citocinas e na síntese de Ig pelas células B, inclusive pelas células B-1 (Cariappa, Liou *et al.*, 2000).

Apesar do presente trabalho dividir a população de células B em somente três subpopulações, B convencionais (B-2), B-1a e B-1b (Tabela 1), Hastings *et al.* propuseram, em 2006, a existência de uma nova subpopulação de células B-1 na cavidade peritoneal de camundongos, a qual eles nomearam B-1c, devido ao fato desta subpopulação possuir fenótipo CD5⁺/Mac-1⁻. Esta subpopulação é funcionalmente similar às células B-1 além de compartilhar um fenótipo muito semelhante com estas células (B220^{lo}/CD5⁺/IgM^{hi}/IgD^{lo}/CD23⁻/CD43⁺/CD80⁺/Mac-1⁻). Entretanto, Ghosn *et al.*, em 2008, demonstraram que estas células B-1c (CD5⁺/CD11b⁻) não se tratavam de uma nova subpopulação de células B-1, mas de células que possuem uma clara relação de desenvolvimento com as células B-1 CD11b⁺. Estas células B-1 CD11b⁻ da cavidade peritoneal de camundongos adultos apareceram, durante a ontogenia, anteriormente às células B-1 CD11b⁺, e por meio de experimentos os autores demonstram que estas células B-1 CD11b⁻ foram capazes tanto de auto-renovação quanto diferenciação e reconstituição das subpopulações CD11b⁺ em animais que receberam transferência adotiva destas células. Assim, devido ao fato deste debate ser recente e não haver um consenso consideramos neste trabalho a caracterização e divisão das células B somente nas três subpopulações clássicas (como mostrado na Tabela 1). Além disso, em nosso trabalho a caracterização de células B-1 foi realizada utilizando-se somente os marcadores CD19 e CD11b, da mesma maneira como feito em outros trabalhos (De Lorenzo, Brito *et al.*, 2007; Popi, Godoy *et al.*, 2008).

Tabela 1 | Caracterização das subpopulações de células B em camundongos (dados retirados de Tachikawa, Kawamura *et al.*, 2008 com modificações).

Subpopulação	Fenótipo							
B-2	B220 ^{hi}	CD5 ⁻	IgM ^{lo}	IgD ^{hi}	CD23 ⁺	CD43⁻	CD80 ⁻	Mac-1 ⁻
B-1a	B220 ^{lo}	CD5⁺	IgM ^{hi}	IgD ^{lo}	CD23 ⁻	CD43 ⁺	CD80 ⁺	Mac-1⁺
B-1b	B220 ^{lo}	CD5⁻	IgM ^{hi}	IgD ^{lo}	CD23 ⁻	CD43 ⁺	CD80 ⁺	Mac-1⁺

1.4. Descoberta de uma lectina similar a Sm60 em *E. coli*: uma doce coincidência

Em 2002, Coelho-Castelo *et al.* descreveram uma lectina ligante de D-manose isolada do tegumento de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Esse relato se constituiu na primeira identificação de uma lectina de *S. mansoni*. E sua estória, como tantas outras, foi devido a uma conjunção de fortuitas observações.

Curiosamente, a descoberta de Sm60 teve início ao se tentar a expressão da proteína recombinante Sm44; um antígeno recombinante isolado de uma biblioteca de cDNA de vermes adultos de *S. mansoni*, que era reconhecido por soros de camundongos infectados cronicamente com esse parasita, mas não por soros de animais na fase aguda da infecção. Durante as tentativas de purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de glutationa imobilizada, já que o antígeno recombinante deveria sair em fusão com uma porção da glutationa S-transferase de *S. japonicum*, invariavelmente eluía-se uma proteína que em SDS-PAGE aparecia como um duplex de massa molecular (MM) de 60/66kDa, que era reconhecida em *immunoblotting* por soros de pacientes com esquistossomose crônica. Poderia-se de fato estar trabalhando com a proteína recombinante, a não ser pelo fato dos extratos das bactérias controles (não transformadas com o plasmídeo recombinante) também apresentarem tal proteína. Esses resultados nos indicaram que a proteína era proveniente da bactéria *E. coli*, que provavelmente estava interagindo com a resina de agarose. Além da cepa DH5 α , outras cepas bacterianas, como a JM109, usadas em

biologia molecular, também continham essa lectina, que foi denominada Ec60/66. Um dado interessante foi que a proteína bacteriana era reconhecida por soros de pacientes com esquistossomose ou camundongos cronicamente infectados. Esse achado possibilitou que fosse investigada a presença de uma proteína análoga em *S. mansoni*. A proteína isolada em *S. mansoni* foi designada Sm60, apresentando maior afinidade por D-manose e reatividade a soro de pacientes com esquistossomose ou camundongos cronicamente infectados (Coelho-Castelo, 2000).

Trabalho posterior mostrou que a lectina de *S. mansoni*, designada de Sm60, apresenta papel inflamatório na fase aguda da infecção, levando ao recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, o que é modulado por mecanismos dependentes de mastócitos (Coelho-Castelo, Panunto-Castelo *et al.*, 2002). Sm60 também tem atividade inibidora de linfoproliferação após estímulos policlonais ou antígeno-específico (Coelho-Castelo, 2000). A detecção de Ec60/66 de *E. coli* abriu perspectivas de investigação de novas lectinas na colonização por *E. coli*, bem como em processos infecciosos.

2. OBJETIVOS

Isolar e identificar proteínas ligantes de carboidrato de *E. coli* comensal, e avaliar os possíveis papéis imunológicos destas proteínas em culturas celulares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e reagentes

Foram utilizados camundongos SPF (*Specific Pathogen Free*) de ambos os sexos das seguintes linhagens: BALB/c selvagem ou deficiente de células B-1 (BALB/Xid); C57BL/6 selvagem, deficiente de células B (C57BL/6-BKO – *B cell knockout*), de molécula adaptadora de sinalização intracelular MyD88 (C57BL/6-MyD88^{-/-}) ou de receptor do tipo Toll (TLR) 2 (C57BL/6-TLR2^{-/-}). Além disso, foram utilizados camundongos deficientes de TLR4 (C3H/HeJ) e seu respectivo *background* controle (C3H/HePas). Os animais tinham entre 8 e 12 semanas de idade e foram provenientes do Biotério de Animais Isogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). Esses animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, com livre acesso à água e ração. Os animais deficientes foram mantidos em microisoladores em uma sala com aeração e temperatura controladas automaticamente. Após o término dos experimentos, os animais foram mortos por deslocamento cervical, colocados em sacos plásticos e incinerados segundo as normas de segurança.

Os reagentes dos seguintes fabricantes foram usados: extrato de levedura da INLAB (Diadema, Brasil), peptona e ágar bacteriológico da HIMEDIA (Mumbai, Índia), ácido acético glacial, ácido clorídrico e cloreto de sódio da QHEMIS (São Paulo, Brasil), canamicina, estreptomicina, gentamicina, isopropil β-D-tiogalactopiranosídeo, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), agarose, penicilina e soro bovino fetal (SBF) da Invitrogen (Carlsbad, EUA), nitrato de ferro III, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, fosfato de potássio monobásico, fosfato de sódio monobásico, azida sódica, glicerol, tiosulfato de sódio e Tween-20 da LABSYNTH (Diadema, Brasil), azul de Coomassie (G-250), duodecil sulfato de sódio (SDS), persulfato de amônia, TEMED, Triton X-100 e imidazol da USB Corporation (Cleveland, EUA), 2-mercaptoetanol, acrilamida,

bisacrilamida, D-manose-agarose, D-lactose-agarose, N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc)-agarose, meio RPMI-1640, MOPS, orto-fenilenodiamino (OPD), polimixina B, Tris, lipopolissacarídeo de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (LPS), concanavalina A (ConA), D-manose, lactose, D-galactose, azul de Trypan e cloroquina da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, EUA), Sepharose CL-4B da GE Healthcare Life Sciences (Uppsala, Suécia), D-galactose-agarose, polimixina B imobilizada em agarose (*Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel*) da Pierce (Rockford, EUA), enzima de restrição *Nde* I e *Hind* III, tampão R, dNTPs, tampão de ligação e enzima *Taq* DNA polimerase da Fermentas (Burlington, Canadá), pET-28a da Novagen (Madison, EUA), anticorpos contra CD3 (clone 145-2C11), CD11b (clone M1/70) e CD19 (clone 1D3) da BD Bioscience (Franklin Lakes, EUA), éster succinimidil diacetato carboxifluoresceína (CFSE) da Molecular Probes (Eugene, EUA), nitrato de prata da Tec-Lab (Jundiaí, Brasil).

3.2. Purificação da proteína bacteriana ligante de carboidrato

3.2.1. Obtenção de sobrenadante de lisado bacteriano: Amostras de *E. coli*, oriundas de bancos de bactérias, foram plaqueadas em ágar Luria-Bertani (LB) [peptona a 1% (m/v), extrato de levedura a 0,5% (m/v), NaCl a 0,5% (m/v) e ágar bacteriológico a 1,5% (m/v), pH 7,4] e cultivadas por 24 horas, a 37°C. Uma colônia foi transferida para 10mL de caldo LB [peptona a 1% (m/v), extrato de levedura a 0,5% (m/v) e NaCl a 0,5% (m/v), pH 7,4] ou meio DMEM, pH 7,0, sendo as culturas mantidas por toda a noite, a 37°C, sob agitação constante (200rpm). No dia seguinte, cada cultura foi diluída 100 vezes em caldo LB ou DMEM e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. Quando se avaliou a influência de certos íons na produção de proteínas bacterianas, o meio DMEM foi suplementado com 22mM de fosfato de potássio monobásico (KH₂PO₄), 10mM de cloreto de cálcio (CaCl₂) ou 0,25mM de nitrato de ferro III [Fe(NO₃)₃]. As células obtidas desses processos de cultivo

foram coletadas por centrifugação e ressuspensas em 25mL de TBS-azida (solução salina tamponada com Tris-HCl a 50mM, contendo CaCl_2 a 10mM, pH 7,4, acrescido de azida sódica a 0,02%), contendo ou não Triton X-100 a 2% (v/v) e MOPS a 100mM. As bactérias ressuspensas em TBS foram sonicadas em banho de gelo, com 5 pulsos de 30 segundos cada, a 60Hz (Vibra-cell, Sonics & Materiais Inc., Danbury, EUA). Já as bactérias ressuspensas em TBS contendo Triton X-100 foram mantidas por 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Após esse período, parte do material foi sonicado. Todas as amostras bacterianas foram centrifugadas a $10.000 \times g$, por 15 minutos a 4°C , sendo o sedimento descartado e o sobrenadante usado nos procedimentos de purificação.

3.2.2. Isolamento de proteínas de *E. coli* ligantes de carboidrato: A detecção de proteínas bacterianas com afinidade por carboidratos nos sobrenadantes obtidos foi realizada com dois procedimentos:

(A) Screening para se conhecer as resinas mais promissoras: As resinas de D-manose, D-lactose, D-GlcNAc e D-galactose imobilizadas em agarose e Sepharose CL-4B foram incubadas com uma amostra de sobrenadante de lisado bacteriano, lavadas 4 vezes com TBS contendo 0,5M de NaCl e 2 vezes com TBS. As preparações foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em condições dissociantes (SDS-PAGE a 10%).

(B) Cromatografia de afinidade: Amostras de sobrenadantes foram submetidas à cromatografia de afinidade em colunas de Sepharose CL-4B e de carboidratos imobilizados, quais sejam D-manose, D-lactose, D-GlcNAc e D-galactose, com volume leito de 2,5mL. Os materiais não adsorvidos às colunas foram retirados com TBS (20 volumes de coluna). O material adsorvido à coluna foi eluído com solução de NaCl a 1M ou ácido acético a 0,1M. Nas cromatografias de afinidade convencionais, foram coletadas frações de 2mL, sendo estas

monitoradas por absorvância a 280nm em espectrofotômetro (Ultraspec 3100 – GE Healthcare Life Sciences).

Condições cromatográficas similares a descrita acima foram usadas no processo automático de cromatografia, usando-se o sistema ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Sciences). No entanto, neste processo as colunas tinham volume leito de 1mL e o material foi injetado com *superloop*. As cromatografias tiveram fluxo de 1mL/min e foram monitoradas continuamente por absorvância a 280nm. O material não adsorvido à coluna foi eliminado com TBS, enquanto os materiais eluídos com solução de NaCl a 1M ou ácido acético a 0,1M foram coletados automaticamente em frações de 1mL (coletor de frações Frac-920, GE Healthcare Life Sciences).

Os materiais adsorvidos e eluídos de cada cromatografia foram colecionados em *pools* e concentrados/dialisados contra TBS utilizando os filtros de centrifugação Amicon Ultra-15 (com membrana de exclusão por tamanho de 10kDa) (Millipore, Billerica, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. As preparações foram analisadas por SDS-PAGE a 10%.

3.3. Análise eletroforética

As análises eletroforéticas foram realizadas em gel de poliacrilamida a 10% em condições dissociantes (SDS-PAGE), em sistema *Mini Protean Tetra* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA) (Laemmli, 1970). Amostras das preparações eluídas das colunas ou resinas com material adsorvido foram ressuspensas em tampão de amostra [Tris-HCl a 0,5M, pH 6,5, contendo 2,5% de SDS (m/v) e 20% de glicerol (v/v)], fervidas a 100°C, por 3 minutos, e aplicadas no gel. Algumas preparações foram ressuspensas em tampão de amostra contendo 2,5% (v/v) de 2-mercaptoetanol. As corridas eletroforéticas tiveram duração aproximada de 1 hora (200V). Os géis foram corados pelo método da prata (Blum, Beier *et al.*, 1987) ou com azul de Coomassie.

Em uma das raias de cada corrida foi aplicada uma mistura de proteínas com massas moleculares conhecidas, sendo usadas como padrão de migração. São elas: fosforilase b (97kDa), albumina sérica bovina (66kDa), albumina de ovo de galinha (45kDa), anidrase carbônica (31kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1kDa) e lisozima (14,4kDa) (GE Healthcare Life Sciences).

3.4. Identificação de proteínas

Bandas coradas com azul de Coomassie foram recortadas no gel e enviadas para a identificação no 'FingerPrints' Proteomics Facility, Post-Genomics and Molecular Interactions Centre, Universidade de Dundee, Dundee, Escócia. A identificação foi realizada através da análise do perfil das massas de peptídeos trípticos (*peptide mass fingerprints*) por espectrometria de massa (MS) (electrospray ionization ion trap mass spectrometry) e busca por identidade em banco de dados:

Genbank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>.

3.5. Subclonagem, expressão e purificação de *IutA* recombinante em sistema bacteriano

3.5.1. Subclonagem de *iutA* em vetor de expressão: O plasmídeo pPOC9 clonado com o gene *iutA* foi gentilmente cedido pelo Dr. Michael O'Connell da Universidade da Cidade de Dublin, Irlanda (Cuiv, Clarke *et al.*, 2006). Para a subclonagem de *iutA* foram desenhados, com o auxílio do programa Gene Runner (versão 3.01) (www.generunner.net), dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a amplificação do gene *iutA* diretamente de pPOC9. A Figura 3 mostra as sequências dos *primers* do gene *iutA* sintetizados pela IDT (Prodinol, Brasil): **primer 5'**, constituído de 26 nucleotídeos, foi confeccionado para conter 15 nucleotídeos da porção 5' de *iutA*, seis nucleotídeos referentes à sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Nde* I, para permitir a clonagem, e mais cinco

nucleotídeos adequadamente escolhidos na extremidade 5' para maior eficiência de clivagem pela enzima de restrição. O **primer 3'**, constituído de 28 nucleotídeos, continha 19 nucleotídeos da região 3' de *iutA*, seis nucleotídeos da sequência de reconhecimento da enzima de restrição *Hind* III e mais três nucleotídeos adequadamente escolhidos na extremidade 5' para maior eficiência de clivagem com esta enzima de restrição. As sequências dos *primers* estão mostradas na Figura 3, e as temperaturas de desnaturação (T_m) foram determinadas pelo próprio fabricante:

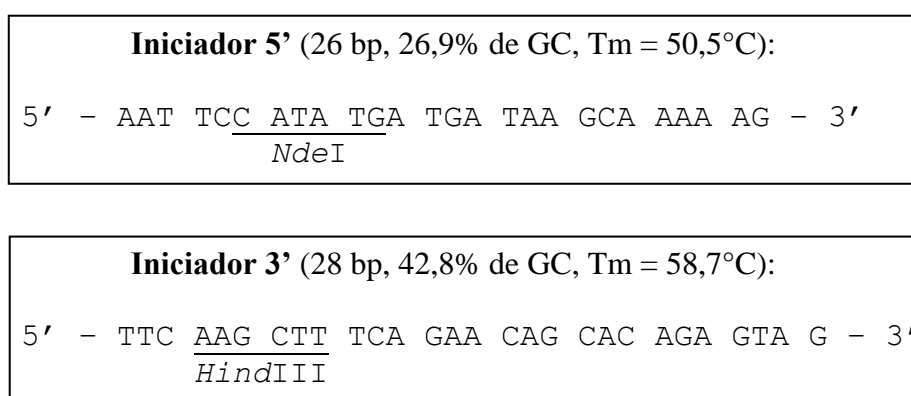


Figura 3 | Sequência dos primers utilizados na amplificação do gene *iutA*.

A etapa inicial do processo de subclonagem foi a propagação do plasmídeo pPOC9-*iutA* em bactérias *E. coli* DH5 α transformadas com esse plasmídeo. O plasmídeo foi extraído com o *Concert Rapid Plasmid Miniprep System Kit* (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e usado em uma reação de amplificação do gene *iutA*. Para tanto, preparou-se 100 μL de uma reação de amplificação contendo 50ng do molde pPOC9-*iutA*, 0,1 μM de cada *primer*, 0,2mM de cada dNTPs, tampão da Taq DNA polimerase, 1,5mM de MgCl_2 e 2 unidades da enzima Taq DNA polimerase. A reação de amplificação, realizada no termociclador MJ Thermal Cycler PTC-200 (Bio-Rad, Hercules, EUA), ocorreu nas seguintes condições: 94 $^\circ\text{C}$ por 5 minutos, 30 ciclos com 94 $^\circ\text{C}$ por 1 minuto, 51 $^\circ\text{C}$ por 1 minuto e 72 $^\circ\text{C}$ por 2,5 minutos, e ao fim destes 30 ciclos, 72 $^\circ\text{C}$ por 5 minutos. A reação foi mantida a 4 $^\circ\text{C}$ até o uso. Os produtos da reação em

cadeia da polimerase (PCR) foram analisados em gel de agarose a 1% e os fragmentos purificados, utilizando-se o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Chatsworth, EUA).

O fragmento amplificado correspondente ao gene *iutA* (3 μ g) foi digerido com 30 unidades da enzima *Nde* I (Fermentas) e 15 unidades da enzima *Hind* III (Fermentas), utilizando-se o tampão R (Fermentas), em um volume final de 60 μ L. A reação foi mantida a 37°C, durante uma noite, sendo purificados os digestos com *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Separadamente, o vetor pET-28a (Figura 4) foi transformado em bactéria, propagado, purificado, digerido com as enzimas de restrição *Nde* I e *Hind* III, e purificado pelo *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), seguindo as mesmas condições descritas anteriormente.

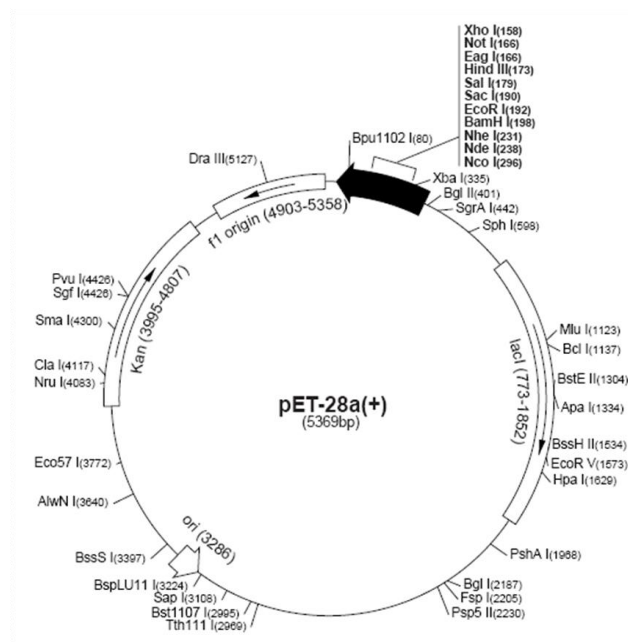


Figura 4 | Plasmídeo pET-28a usado como vetor de expressão.

Após as digestões, plasmídeo e fragmento foram submetidos a seguinte reação de ligação: 150ng de *iutA* e 100ng de pET-28a incubados no tampão da reação contendo 1 unidade da T4 DNA ligase, num volume final de 20 μ l. A reação foi mantida feita a 4°C, durante uma noite. Metade do volume da ligação foi utilizada na transformação de células de

E. coli Top10 competentes que foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 50µg/mL do antibiótico canamicina.

Quinze colônias da ligação pET-28a-*iutA* foram submetidas a reação de PCR, conforme descrito anteriormente para a amplificação de *iutA*. No entanto, nessa PCR se substituiu o plasmídeo, como molde, pela bactéria transformada, não alterando-se a concentração dos componentes da reação, variando-se apenas o volume final. Assim foram utilizados: 0,1µM de cada oligonucleotídeo, 0,2mM de cada dNTPs, tampão da reação, 1,5mM de MgCl₂, 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase e 5µL de suspensão bacteriana em água, num volume final de 20µL. Essa suspensão foi feita picando-se uma colônia com um palito de dente estéril, dissolvendo-a na água e fervendo por 10 minutos. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1%.

Os plasmídeos de sete das quinze colônias submetidas à PCR foram extraídos e dois desses foram transformados em células de *E. coli* Top10 competentes para posterior expressão da proteína recombinante.

3.5.2. Indução e cinética de expressão da proteína recombinante: A IutA recombinante foi obtida de cultura de bactérias *E. coli* BL21 transformadas com o pET-28a-*iutA*, que continha o gene completo do receptor de aerobactina de *E. coli* K-12 fusionada a um oligopeptídeo com seis resíduos de histidina (His₆) situado na extremidade N-terminal.

As bactérias foram cultivadas em 6mL de caldo LB com canamicina (50µg/mL) a 37°C, de 14 a 16 horas, sob agitação constante (200rpm). Após este período, 2mL foram transferidos para 3 tubos estéreis contendo 20mL/tubo de meio LB, previamente autoclavado, contendo o mesmo antibiótico anteriormente citado na mesma concentração. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação (200rpm), e a densidade óptica (DO) em 600nm foi acompanhada até que atingisse uma DO entre 0,5 e 0,6. A fim de se induzir a expressão de

IutA pelas bactérias, adicionou-se às culturas isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) nas concentrações de 0,4, 0,8 e 1 mM. O cultivo foi novamente iniciado no agitador (37°C – 200rpm) e a cinética de expressão foi avaliada após 1, 2, 4, 5, 6 e 8 horas da indução com IPTG, sendo utilizado como controle uma alíquota da cultura não induzida. Das culturas foram retiradas alíquotas de 1,5mL, centrifugadas a $10.000 \times g$, por 5 minutos. Os sedimentos bacterianos obtidos foram pesados, ressuspensos em volume de tampão de amostra proporcionais ao peso para que ficassem com a mesma proporção massa/volume, sonicados em banho de gelo com três pulsos de 30 segundos cada, a 60Hz (Vibra-cell, Sonics & Materiais Inc.). Essas preparações foram analisadas por SDS-PAGE a 10%.

3.5.3. Purificação da proteína recombinante: Para a purificação da proteína recombinante, 2L de cultura em caldo LB foram induzidos por 6 horas com 0,8mM de IPTG. Após centrifugação, o sedimento bacteriano foi ressuspensado em tampão de lise contendo NaH_2PO_4 a 50mM, NaCl a 300mM, e imidazol a 10mM, pH 8,0, e sonificado em banho de gelo com seis pulsos de 30 segundos cada, a 60Hz (Vibra-cell, Sonics & Materiais Inc.). As proteínas contendo cauda de histidina foram submetidas à cromatografia de afinidade em colunas HisTrap HP (GE Healthcare Life Sciences). O material não adsorvido à coluna foi retirado com o tampão de lise contendo 20mM de imidazol (20 volumes de coluna). O material adsorvido foi eluído com o mesmo tampão contendo 500mM de imidazol. O tampão do eluato foi substituído por tampão fosfato (PBS) em coluna de dessalinização (HiTrap Desalting – GE Healthcare Life Sciences). As amostras de proteína purificada foram passadas em coluna contendo polimixina B imobilizada em agarose (*Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel*) para remoção do LPS contaminante. As proteínas recombinantes purificadas foram quantificadas (*Coomassie Bradford Protein Assay Kit* – Pierce) e analisadas em SDS-PAGE 10%.

3.6. Coleta e obtenção de células do baço e dos linfonodos mesentéricos

Os baços e os linfonodos mesentéricos foram coletados e colocados em placas de Petri de 22 mm de diâmetro (Corning, Nova York, EUA) estéreis contendo 2 mL de meio RPMI-1640. Com o auxílio de pinças estéreis, o baço e os linfonodos foram divulsionados separadamente para obtenção de uma suspensão celular homogênea e foi realizada a lise das hemáceas. Após a contagem das células em câmara de Neubauer, estas foram preparadas para proceder à separação por esferas magnéticas ou prosseguiram diretamente para a marcação com CFSE, para o ensaio de proliferação *in vitro*.

3.7. Separação de células B convencionais (B-2 ou CD43-) e CD43+ por esferas magnéticas

Após contagem das células do baço, um total de 1×10^8 células foram retiradas para iniciar o processo de separação de células B (CD43-) com o *Mouse CD43 (Ly-48) MicroBeads, LS Columns* e o *MidiMACS™ Separator* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany), segundo instruções do fabricante.

3.8. Coleta e obtenção de células B-1 da cavidade peritoneal

Células B-1 foram obtidas da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c como descrito por (Almeida, Aroeira *et al.*, 2001). Sucintamente, células peritoneais foram coletadas da cavidade abdominal dos camundongos através de duas lavagens com 5 mL de meio RPMI-1640 gelado suplementado com 3% de SBF. Estas células peritoneais, na concentração de 2×10^5 células/mL, foram colocadas em garrafas de cultura estéreis de 75 cm² (BD Bioscience, Franklin Lakes, EUA) e incubadas por 1 hora, a 37°C, em estufa com ar umidificado e acrescido de 5% CO₂. As células não aderentes foram descartadas e a monocamada de células aderentes foi lavada com meio. Subsequentemente, foi adicionado às

garrafas meio RPMI-1640 completo (suplementado com 10% de SBF, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, 10µg/mL de gentamicina e 30µg/mL de polimixina), seguido de incubação por 5 dias, a 37°C, em estufa com ar umidificado e acrescido de 5% CO₂, sem a troca do meio de cultura. Segundo (Almeida, Aroeira *et al.*, 2001), após este procedimento, as células B-1 são o principal tipo celular na população de células não aderentes. A alta porcentagem de células B-1 nestas culturas foi analisada por citometria de fluxo com marcadores específicos.

3.9. Citometria de fluxo

3.9.1. Análise da expressão de marcadores característicos de leucócitos: As populações de células do baço, da cavidade peritoneal e dos linfonodos mesentéricos (após processamento e/ou separação por esferas magnéticas) de camundongos foram caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície utilizando anticorpos monoclonais específicos conjugados a fluorocromos.

Cerca de 1×10^6 células foram distribuídas em tubos para citometria em um volume de 100µL/tubo e incubadas durante 40 minutos, a 4°C, com anticorpo contra CD16/CD32 de camundongo (Fc Block™ BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, EUA), na concentração de 0,5µg/ 10^6 células. Posteriormente, essas células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse (0,5 a 0,75µg de anticorpo/ 1×10^6 células) contra CD3 ou contra CD5, ambos marcados com ficoeritrina (PE), contra CD19 marcado com alofococianina (APC) e contra CD11b marcado com proteína clorofila peridina – cianina 5.5 (PerCP-Cy5.5), durante 30 minutos, a 4°C, no escuro. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 2mL de PBS contendo 2% de SBF, centrifugadas a $300 \times g$, 4°C, por 10 minutos e ressuspensas em 200µL de PBS.

As preparações celulares foram adquiridas em FACSCanto™ II (BD Bioscience). Foram adquiridos de 10.000 a 100.000 eventos por tubo dependendo do experimento. As células foram selecionadas pelo programa FACSDiva 6.1 (BD Bioscience) de acordo com parâmetros de tamanho (FSC – *Foward Scatter*), granularidade (SSC – *Side Scatter*) e intensidade de fluorescência dos anticorpos. Inicialmente, foi determinada a população de linfócitos, baseado nos parâmetros FSC e SSC, para a posterior detecção das porcentagens de linfócitos expressando os marcadores CD3, CD19 e/ou CD11b.

3.9.2. Ensaio de proliferação com células marcadas com CFSE: Células totais isoladas do baço de camundongos selvagens e deficientes foram obtidas em uma concentração de 10^7 células/mL de PBS estéril livre de endotoxinas e, em seguida, marcadas com CFSE em concentração final de $1,25 \mu\text{M}$. A solução foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e, então, às células foi adicionado SBF (aproximadamente 5% do volume total) para interromper o processo de marcação. As células foram lavadas duas vezes com PBS estéril livre de endotoxinas, sendo centrifugadas a $300 \times g$ por 10 minutos. Após este procedimento, as células foram cultivadas em 1mL de RPMI-1640, na concentração de 2×10^6 células em placa de 48 poços, durante 72 horas, a 37°C , em estufa com ar umidificado e acrescido de 5% de CO_2 . Todas as culturas de células foram realizadas em meio RPMI-1640 completo. Estas culturas de células foram feitas na ausência de estímulos, em presença de LPS ($25\mu\text{g/mL}$), ConA ($10\mu\text{g/mL}$) ou IutA recombinante ($20\mu\text{g/mL}$). Após o período de incubação, as células foram recuperadas e analisadas por citometria de fluxo. Foram adquiridos de 10.000 a 100.000 eventos e a determinação da porcentagem de células que sofreram proliferação mediante cada estímulo testado foi realizada na população de linfócitos (determinada pelos parâmetros $\text{FSC} \times \text{SSC}$). Sendo assim, foi computado o valor correspondente à porcentagem de linfócitos que proliferaram.

O mesmo procedimento descrito anteriormente foi realizado para marcação das células provenientes dos linfonodos mesentéricos e da cavidade peritoneal com CFSE.

3.10. Avaliação da citotoxicidade pelo azul de Trypan

A avaliação *in vitro* da citotoxicidade pelo método de viabilidade por azul de Trypan foi realizada após o tratamento das células com cloroquina por 1 hora. Após o período de incubação das células (72 horas) uma alíquota da suspensão de células foi retirada e diluída em azul de Trypan (0,4%). As células foram observadas ao microscópio por suas alterações morfológicas e contadas em câmara de Neubauer. A viabilidade celular, dada em porcentagem, foi calculada da seguinte maneira:

$$VC (\%) = \frac{TCV}{TC} \times 100$$

VC – Viabilidade Celular, TCV – Total de Células Viáveis (não coradas) e TC – Total de Células (coradas e não coradas) $\times 100$

3.11. Análise estatística

A determinação estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi feita por análise da variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Diferenças com $p < 0.01$ foram consideradas estatisticamente significativas. Todos os experimentos foram realizados ao menos duas vezes.

4. RESULTADOS

4.1. *E. coli* K-12 apresenta proteínas ligantes de agarose

Com o intuito de se fazer um *screening* inicial de proteínas de *E. coli* capazes de se ligar a açúcares, realizou-se a incubação de resinas, Sepharose e agarose contendo carboidratos imobilizados, com o sobrenadante de lisado de *E. coli* comensal (K-12). Após lavagem, as resinas contendo as proteínas bacterianas adsorvidas foram submetidas à SDS-PAGE. Embora as amostras adsorvidas às resinas mostrassem um perfil de bandas muito similar, algumas proteínas foram diferencialmente expressas (Figura 5). Dentre essas proteínas destaca-se uma banda principal no material adsorvido à Sepharose 4B (Figura 5, ponta de seta). Esta banda também pode ser observada nos materiais adsorvidos às colunas de lactose e D-galactose, apesar de não ser tão predominante quanto à detectada no material adsorvido à Sepharose 4B. Além destas proteínas, destacam-se algumas bandas de menor massa molecular que podem ser observadas em todas as resinas, apesar destas bandas serem predominantes nos materiais adsorvidos às colunas de D-manose, lactose e D-galactose. Apesar da definição das MM das proteínas expressas ser prejudicada por um problema com os marcadores de MM da corrida, esse *screening* inicial mostrou que algumas proteínas poderiam ser promissores candidatos a novas proteínas ligantes de carboidrato de *E. coli*.

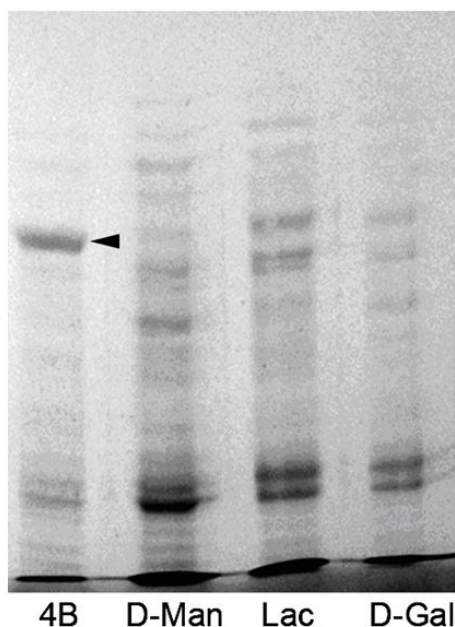


Figura 5 | Cepa de *E. coli* K-12 apresenta proteínas ligantes de carboidratos diferencialmente expressas. SDS-PAGE de proteínas de *E. coli* adsorvidas às resinas de Sepharose CL-4B (4B), D-manose-agarose (D-Man), lactose-agarose (Lac) e D-galactose-agarose (D-Gal). Gel corado com azul de Coomassie.

A detecção de proteínas de *E. coli* comensal ligantes de carboidratos nos levou a analisar estas proteínas por cromatografia de afinidade convencional. Para o isolamento de proteínas ligantes de carboidrato de K-12, submeteu-se o lisado bacteriano sequencialmente às cromatografias de afinidade em colunas de (1) Sepharose 4B, (2) D-galactose-agarose, (3) lactose-agarose e (4) D-manose-agarose. Tencionando-se eluir material adsorvido especificamente às resinas, inicialmente foram usadas soluções de D-galactose a 0,1M e lactose a 0,1M para as três primeiras colunas e de D-manose a 0,1M para a última. Não foi detectada nenhuma proteína em nenhum desses eluatos (dados não mostrado). De um modo inespecífico, proteínas adsorvidas à coluna foram eluídas com NaCl a 1M (Figura 6). Dentre as bandas mais proeminentes destacam-se as de 60 e 55kDa, exclusivamente no material adsorvido à Sepharose 4B, de ~80kDa, apenas no material adsorvido em lactose-agarose, de ~40kDa, que estão contidas nos materiais adsorvidos em D-manose e lactose, e de 20 e 23kDa, que estão presentes nos materiais obtidos das colunas de Sepharose 4B e D-manose.

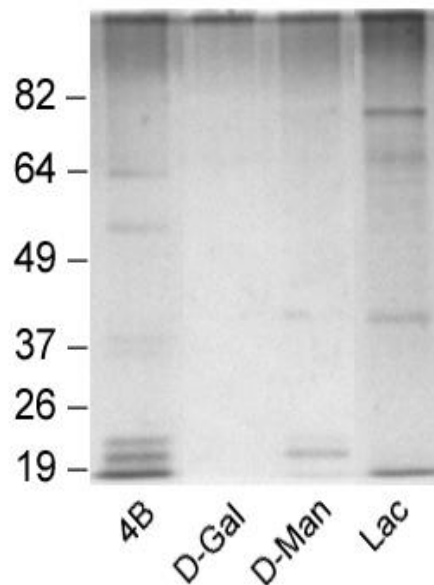


Figura 6 | SDS-PAGE de proteínas de *E. coli* K-12 adsorvidas às colunas de Sepharose CL-4B (4B), D-galactose-agarose (D-Gal), D-manose-agarose (D-Man) ou lactose-agarose (Lac) e eluídas com NaCl a 1M. Gel corado pelo método da prata. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

Uma nova cromatografia com lisado de *E. coli* K-12 foi realizada e o material eluído das colunas de Sepharose 4B novamente mostrou uma banda de ~60kDa em SDS-PAGE, embora dessa vez na forma de um duplex (Figura 7, raia 2). No material eluído da coluna de D-manose apareceram duas bandas proeminentes de ~80 e ~70kDa na fração 1 e 2 (Figura 7, raias 4 e 5).

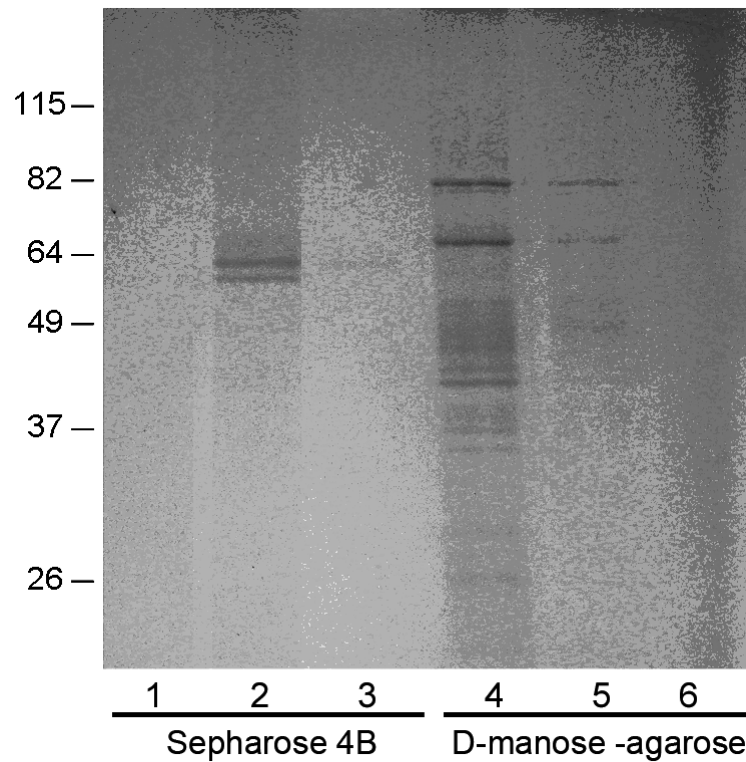


Figura 7 | SDS-PAGE de proteínas de *E. coli* K-12 que foram adsorvidas às colunas de Sepharose CL-4B e D-manose-agarose. Foram eluídas três frações de cada cromatografia (números indicados na figura, sob as raias). Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

As cromatografias realizadas com *E. coli* K-12 permitiram a padronização das condições para a separação das proteínas bacterianas. Nessa etapa, todas as colunas foram re-empacotadas com resinas novas, substituindo-se a coluna de D-galactose, cujos resultados não foram satisfatórios, por D-GlcNAc imobilizada. Como pode ser observado na Figura 8, o material da linhagem bacteriana apresentou proteína ligante de Sepharose com MM na faixa de 60kDa.

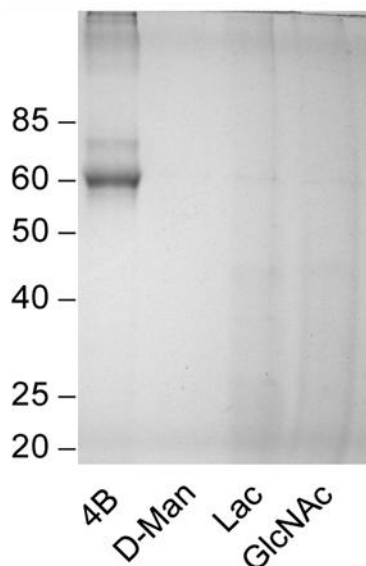


Figura 8 | SDS-PAGE de proteínas de *E. coli* K-12 adsorvidas às colunas de Sepharose CL-4B (4B), D-manose-agarose (D-Man), lactose-agarose (Lac), ou N-acetil-glucosamina-agarose (GlcNAc) e eluídas com NaCl a 1M. Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

Até este ponto do estudo, as proteínas bacterianas solúveis estavam sendo obtidas por sonicação em TBS. Após centrifugação, os sobrenadantes eram usados nos processos cromatográficos, enquanto os sedimentos eram descartados. Nessas condições, muitas proteínas de membrana externa da parede bacteriana poderiam ser eliminadas juntamente com o sedimento. Com o intuito de avaliar o processo de solubilização das proteínas do lisado bacteriano, incubaram-se as bactérias com ou sem Triton X-100 por 30 minutos, seguindo-se ou não de sonicação. Os resultados revelaram que a amostra obtida pela solubilização com Triton X-100 por 30 minutos, seguida de três pulsos de sonicação rendeu melhor concentração de proteínas que são adsorvidas às resinas quando comparada a amostras tratadas com Triton X-100, mas não sonicadas, e amostras não tratadas com Triton X-100 e sonicadas (dados não mostrados). Amostras tratadas com Triton X-100 e sonicadas foram usadas como preparação padrão em todos os experimentos subsequentes.

Com a padronização das condições de corrida, iniciou-se os procedimentos cromatográficos de afinidade de modo automático no sistema de cromatografia líquida ÄKTA

Purifier, com monitoramento contínuo de absorvância a 280nm. Nos primeiros experimentos realizados, tencionou-se verificar se havia variação na produção das proteínas bacterianas adsorvidas à Sepharose durante a fase de crescimento. Assim, caldo LB foi inoculado com *E. coli* K-12 e amostras foram retiradas quando foi atingida a DO em 600nm (A_{600nm}) de 1, 2, 3 e 4. Como mostrado na Figura 9 (painel E), as bactérias cultivadas não apresentaram variação na proporção das proteínas adsorvidas à Sepharose, isto é, mantiveram a expressão das proteínas e, conseqüentemente, o perfil eletroforético similar. No entanto, quantidades maiores de bactérias (maiores DOs) não necessariamente significaram quantidades maiores de proteínas adsorvidas à Sepharose, haja vista que não houve uma variação significativa nos cromatogramas das proteínas adsorvidas à Sepharose dos materiais provenientes de amostras de culturas bacterianas com A_{600nm} de 1, 2 e 3 (Figura 9, painéis A a C). Nos materiais obtidos de bactérias cultivadas até a A_{600nm} de 4, cultivadas por 8 horas (Figura 9, painel D) houve a maior produção de proteínas ligantes de Sepharose o que se manteve até 16 horas (dados não mostrados). Esses resultados nortearam a escolha do tempo 8 horas de cultivo para as condições descritas nos experimentos que se seguem. A banda de ~60kDa (banda 1), presente na raia 4 da Figura 9, foi selecionada por ser a proteína mais frequente nas purificações realizadas até esse momento, recortada e submetida à identificação por espectrometria de massa. De um modo inexplicável, houve em grande parte dos cromatogramas a eluição de um pico de absorvância em 280nm durante o reequilíbrio da coluna com TBS (como exemplo, ver Figura 9), com pequena variação em termos de densidade óptica. O material desse pico gerou uma banda fraca de ~60kDa, insuficiente para a documentação.

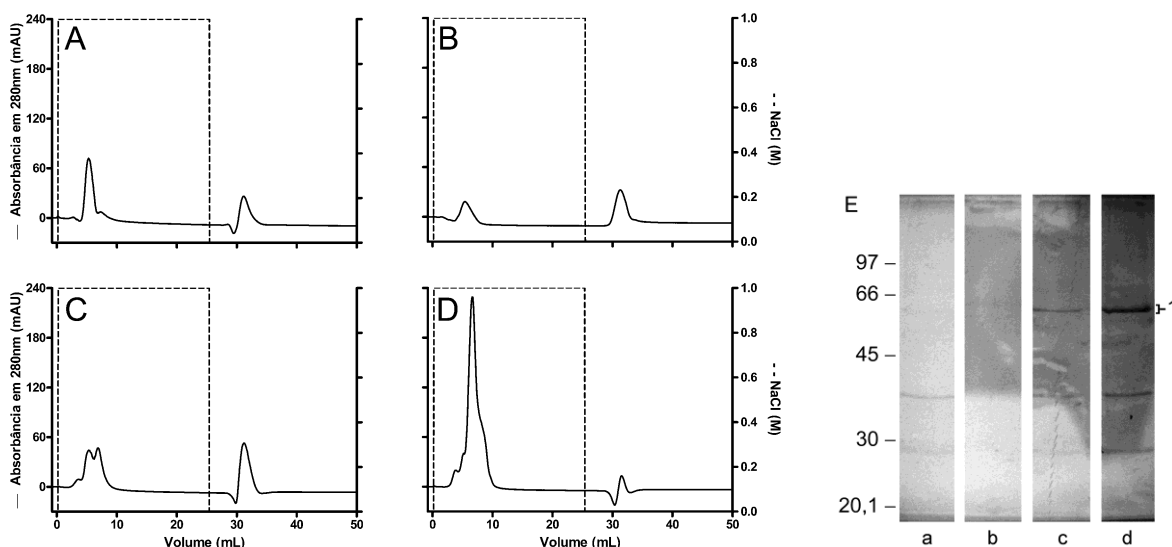


Figura 9 | *E. coli* K-12 cultivadas em caldo LB até atingir diferentes DOs apresentam o mesmo padrão de expressão de proteínas ligantes de Sepharose CL-4B (4B).

(A – D) Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CL-4B (sistema ÄKTA) do lisado de bactérias cultivadas em caldo LB até a absorbância a 600nm de 1 (A), 2 (B), 3 (C) e 4 (D). A coluna foi equilibrada com TBS e o material não adsorvido à coluna foi retirado com o mesmo tampão. O material adsorvido à coluna foi eluído com NaCl a 1M. (25mL - linha tracejada). A cromatografia foi feita à TA, num fluxo de 1mL/min, com monitoração pela absorbância a 280nm. Foram coletadas frações de 1mL.

(E) Material eluído com NaCl a 1M das cromatografias de afinidade descritas acima (A, B, C e D) foram submetidas à SDS-PAGE (a, b, c e d, respectivamente). Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada à esquerda da figura. Banda de 60kDa da raia 4 (indicada à direita da figura – 1) foi recortada e submetida à identificação por MS.

Para avaliar se a produção de proteínas bacterianas que são adsorvidas à Sepharose poderia variar, caso as condições de crescimento fossem similares às encontradas no trato gastrointestinal, as bactérias foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Kenny, Abe *et al.*, 1997). Embora o crescimento bacteriano no DMEM tenha sido aproximadamente 50% menor do que no meio LB, a massa bacteriana resultante foi suficiente para o isolamento das proteínas. No entanto, ao se incubar o lisado dessas bactérias com a resina Sepharose, não foi possível detectar proteínas adsorvidas (Figura 10, raia 1). Tendo como base o trabalho de Kenny *et al.* (1997), que obtiveram um aumento na produção de fatores de virulência protéicos de EPEC quando suplementavam o meio DMEM com sais, passou-se a cultivar as bactérias em DMEM suplementado com 22mM de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 10mM de cloreto de

cálcio (CaCl_2) ou 0,25mM de nitrato de ferro III [$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$]. Apesar desses sais não alterarem o crescimento bacteriano em relação ao meio sem suplementação, a indução de proteínas ligantes de Sepharose foi observada apenas nas bactérias cultivadas em DMEM suplementado com CaCl_2 (Figura 10, raia 3). Destaca-se nesse material a proteína majoritária de 75kDa, seguido das proteínas de ~85kDa e um duplex de 40kDa.

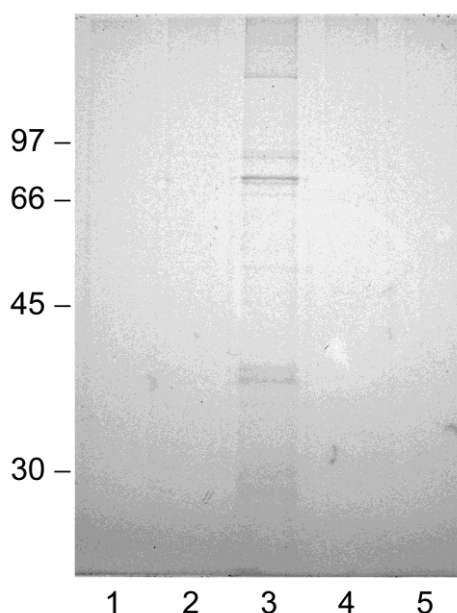


Figura 10 | Proteína de 75kDa de *E. coli* K-12 cultivada em DMEM se liga à Sepharose CL-4B (4B) de um modo dependente de Ca^{2+} . Lisados obtidos de bactérias cultivadas em DMEM (1) sem suplementação adicional com sais ou DMEM suplementado com KH_2PO_4 (2), CaCl_2 (3), $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (4), ou KH_2PO_4 e $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (5) foram incubados com Sepharose CL-4B. Após eliminação do material não adsorvido por lavagem com TBS, a resina foi submetida à SDS-PAGE. Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura.

Esses experimentos foram repetidos em cromatografia de afinidade para comparação da produção de proteínas produzidas por bactérias cultivadas em meio DMEM suplementado com CaCl_2 e aquelas crescidas em caldo LB. Em relação ao meio LB, obteve-se cromatograma similar ao da Figura 9, painel D (dado não mostrado) e perfil eletroforético característico – três proteínas principais com MM aparente de 60, 40 e 30kDa (Figura 11, painel B, raia 1). Já o cromatograma do lisado de bactérias crescidas em meio DMEM

suplementado com CaCl_2 mostra três picos de eluição com NaCl a 1M (Figura 11, painel A). Somente os picos II e III apresentaram bandas, sendo majoritária a de $\sim 75\text{kDa}$ (Figura 11, painel B, raias 3 e 4, respectivamente). Não podemos descartar que as bandas de 60, 40 e 30kDa não estejam presentes também no material proveniente de DMEM, porém nessas condições foram detectadas como proteínas minoritárias.

Nova cromatografia em Sepharose de lisados bacterianos obtidos de bactérias crescidas em meio DMEM suplementado com CaCl_2 foi realizada para a confirmação da presença da proteína de 75kDa. Conforme mostrado na Figura 11, tanto o material eluído com NaCl (painel C) quanto o eluído com ácido acético (painel D) apresentavam esta proteína, sendo ambas submetidas à identificação por MS.

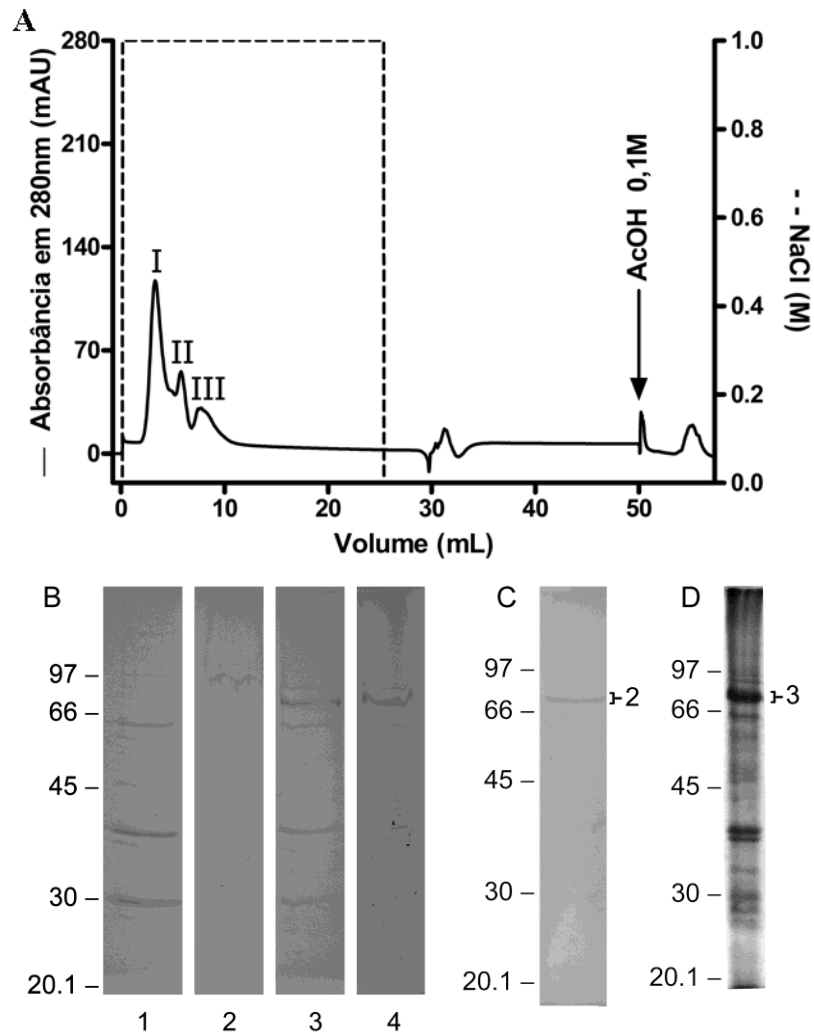


Figura 11 | Proteína de 75kDa ligante de Sepharose está presente em *E. coli* K-12 cultivadas em meio DMEM, mas não em cultivadas em LB. (A) Cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose CL-4B (sistema ÄKTA) do lisado de bactérias cultivadas em meio DMEM suplementado com CaCl_2 . A coluna foi equilibrada com TBS e o material não adsorvido à coluna foi retirado com o mesmo tampão. O material adsorvido à coluna foi eluído com NaCl a 1M (25mL - linha tracejada) e ácido acético (AcOH) a 0,1M. A cromatografia foi feita a TA, num fluxo de 1mL/min, com monitoração pela absorbância a 280nm. Foram coletadas frações de 1mL. (B) SDS-PAGE dos materiais isolados dos lisados de bactérias cultivadas em LB (1) ou DMEM suplementado com CaCl_2 (picos I, II e III - raias 2, 3 e 4, respectivamente) em coluna de Sepharose CL-4B. (C e D). SDS-PAGE de material obtido de nova cromatografia com lisados de bactérias cultivadas em meio DMEM suplementado com CaCl_2 , seguindo eluição com NaCl (C) e ácido acético (D). Géis corados com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura. Bandas de 75kDa nos géis dos painéis C e D (indicada à direita da figura - J-2 e J-3) foram recortadas e submetidas à identificação.

4.2. Sequenciamento de proteínas de *E. coli* ligantes de carboidrato

As proteínas de *E. coli* (banda 1 de 60kDa – Figura 9, e bandas 2 e 3 de 75kDa – Figura 11, painel C e D, respectivamente) obtidas nos processos de cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose foram submetidas à identificação através de MS (*electrospray ionization ion trap mass spectrometry*). Os peptídeos trípticos da proteína de 60kDa apresentaram identidade com sequências preditas de flagelina de *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (gi | 9211052) e de proteína A de membrana externa (OmpA) (gi | 129137) de *E. coli* (Figura 12). Com relação às proteínas de 75kDa, estas tiveram alta identidade com proteínas envolvidas na captação de ferro pela bactéria (Figuras 13 e 14), tais como receptor de aerobactina férrica e receptor de heme/hemoglobina da membrana externa.

[gi|9211052](#) flagellin [Escherichia coli]
[gi|67549](#) trypsin (EC 3.4.21.4) precursor - bovine
[gi|1346343](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1)
[gi|453155](#) keratin 9 [Homo sapiens]
[gi|109096823](#) PREDICTED: similar to keratin 1 isoform 7 [Macaca mulatta]
[gi|28317](#) unnamed protein product [Homo sapiens]
[gi|129137](#) Outer membrane protein A (Outer membrane protein II)
[gi|1195531](#) type I keratin 16; K16 [Homo sapiens]
[gi|515094](#) Chain , Trypsin (E.C.3.4.21.4) Variant (D189g,G226d)

Figura 12 | Proteínas que apresentaram alta identidade com os peptídeos trípticos da proteína de 60kDa (banda 1) de *E. coli* ligante de Sepharose CL-4B.

[gi|1333741](#) mature receptor protein [Escherichia coli]
[gi|67549](#) trypsin (EC 3.4.21.4) precursor - bovine
[gi|1346343](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1)
[gi|515094](#) Chain , Trypsin (E.C.3.4.21.4) Variant (D189g,G226d)
[gi|186629](#) keratin 10
[gi|26250130](#) Outer membrane heme/hemoglobin receptor [Escherichia coli CFT073]

Figura 13 | Proteínas que apresentaram alta identidade com os peptídeos trípticos da proteína de 75kDa (banda 2) de *E. coli* ligante de Sepharose CL-4B.

[gi|47600652](#) ferric aerobactin receptor precursor IutA [Escherichia coli Nissle 1917]
[gi|1333741](#) mature receptor protein [Escherichia coli]
[gi|75242704](#) COG1629: Outer membrane receptor proteins, mostly Fe transport [Escherichia coli F11]
[gi|67549](#) trypsin (EC 3.4.21.4) precursor - bovine
[gi|50121515](#) 30S ribosomal protein S1 [Erwinia carotovora subsp. atroseptica SCRI1043]
[gi|15803891](#) putative membrane protein; interferes with cell division [Escherichia coli O157:H7 EDL933]
[gi|515094](#) Chain , Trypsin (E.C.3.4.21.4) Variant (D189g,G226d) Complexed With Benzamidine
[gi|2443572](#) lysine N6-hydroxylase mutant [Escherichia coli]

Figura 14 | Proteínas que apresentaram alta identidade com os peptídeos trípticos da proteína de 75kDa (banda 3) de *E. coli* ligante de Sepharose CL-4B.

4.3. Expressão de *IutA* recombinante

Para a realização dos ensaios biológicos *in vitro*, primeiramente foi necessária a produção e purificação destas proteínas recombinantes. Ensaios iniciais foram realizados com a flagelina recombinante (dados não mostrados) assim como com o receptor de aerobactina recombinante. Os resultados com o receptor de aerobactina foram mais promissores e então o estudo focou em analisar as atividades biológicas desta proteína.

Após a subclonagem, o plasmídeo recombinante capaz de expressar a proteína *IutA* de K-12 foi transformado em *E. coli* BL21 e foi realizada a cinética de expressão para o conhecimento do tempo ideal de indução da expressão dessa proteína e também da concentração ideal de IPTG. Uma banda com MM aparente de 75kDa, referente à proteína *IutA*, foi observada em todas as raias com extratos de bactérias cultivadas na presença de IPTG (Figura 15). Esta cinética revelou que a expressão máxima da proteína recombinante ocorreu após 6 horas de indução com 0,8mM de IPTG. Assim, o tempo de 6 horas foi usado para a produção de *IutA* em larga escala para a sua posterior purificação. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna com níquel imobilizado. A produção média de *IutA* purificada foi de 3mg/L de cultura de bactérias transformadas. Esta proteína foi então dialisada, novamente dosada e checada por SDS-PAGE (Figura 16) para análise de uma eventual degradação. A análise eletroforética demonstrou que a proteína apresentou alto grau de homogeneidade e migrou com massa molecular aparente de 75kDa (Figura 16, raia 3).

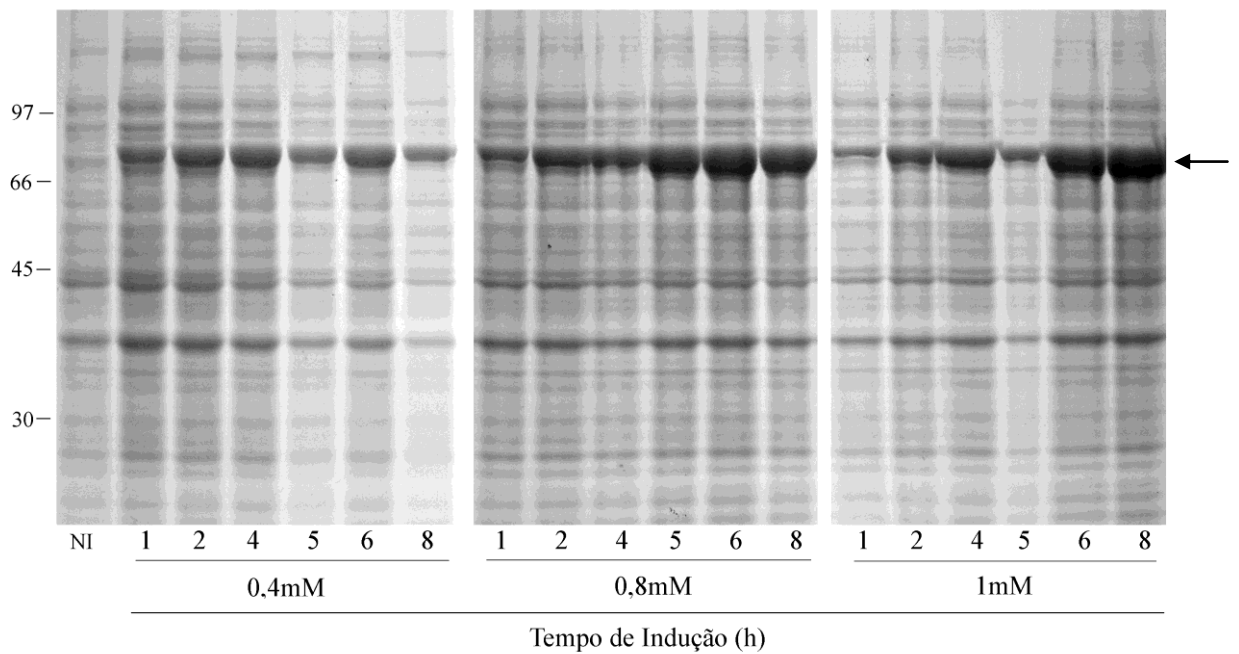


Figura 15 | SDS-PAGE da cinética de expressão do receptor de aerobactina recombinante de *Escherichia coli* K-12. Amostras da cultura de BL21 transformada com o vetor pET-28a-*iutA* (gene completo do receptor de aerobactina de K-12) foram coletadas antes e após a indução com 0,4, 0,8 ou 1mM de IPTG. Expressão na cultura não induzida (NI), e após diferentes tempos de indução, 1, 2, 4, 5, 6 e 8h. Essas amostras foram sonicadas em tampão de amostra e submetidas à SDS-PAGE. Gel corado com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura. Bandas de ~75-kDa referentes a IutA recombinante estão indicadas pela seta na figura.

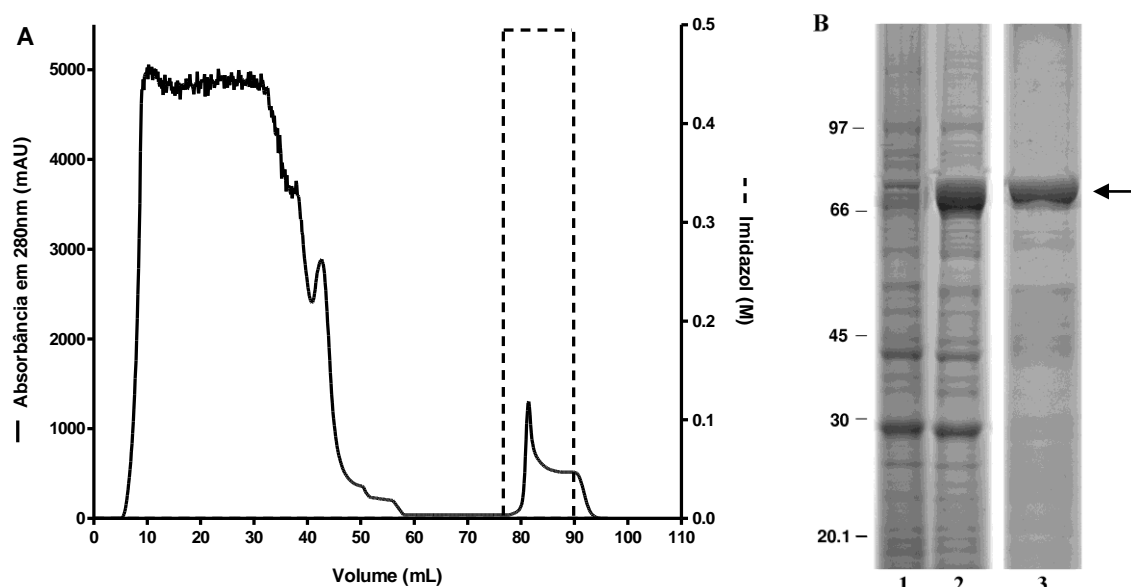


Figura 16 | (A) Cromatografia representativa do processo de purificação do receptor de aerobactina de *Escherichia coli* K-12 recombinante por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (sistema ÄKTA). A coluna foi carregada com o extrato bacteriano contendo a proteína recombinante. O material não adsorvido à coluna foi retirado com o tampão de lise contendo 20mM de imidazol. O material adsorvido à coluna foi eluído com o tampão de lise contendo 500mM de imidazol (linha tracejada). A cromatografia foi feita a TA, num fluxo de 2mL/min, com monitoração pela absorbância a 280nm. Foram coletadas frações de 2mL. (B) SDS-PAGE representativo do processo de expressão e purificação de IutA recombinante. SDS-PAGE das amostras das diferentes etapas da expressão de IutA recombinante: lisado da bactéria antes da indução com 0,8mM de IPTG (raia 1); lisado da bactéria após 6 horas da indução com 0,8mM de IPTG (raia 2), e proteína recombinante após processo de purificação em coluna de níquel (raia 3). Géis corados com azul de Coomassie. A migração eletroforética de proteínas com massas moleculares conhecidas (expressa em kDa) está indicada na figura. Bandas de ~75-kDa referentes a IutA recombinante estão indicadas pela seta na figura.

4.4. Células B do baço proliferam frente ao estímulo com IutA recombinante

O receptor de aerobactina recombinante purificado foi utilizado em ensaios de proliferação com células do baço de camundongos C57BL/6, BALB/c ou animais deficientes, marcadas com CFSE. O primeiro passo foi analisar por citometria de fluxo qual ou quais os tipos celulares proliferam quando estimulados com IutA recombinante. A Figura 17 mostra que a população de células B (CD19+) esplênicas de animais C57BL/6 é a única a proliferar sob estímulo de IutA, em uma frequência de cerca de 37%. As células T (CD3+) apresentam somente a proliferação espontânea (ou basal), com frequência aproximada de 6%. Como controles das respostas proliferativas das células T e B do baço destes animais, foram utilizados os estímulos policlonais ConA e LPS, respectivamente.

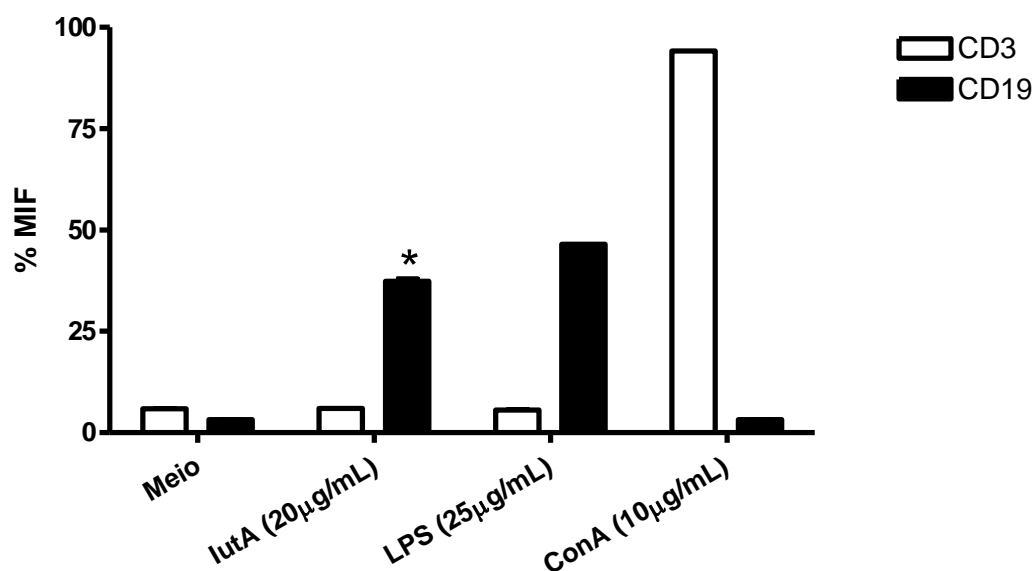


Figura 17 | Células B proliferam frente ao estímulo com IutA recombinante. Células esplênicas (2×10^6) foram marcadas com CFSE e cultivadas na presença de meio, 20µg/mL de IutA recombinante, 25µg/mL de LPS ou 10µg/mL de ConA. Após 72h, as células esplênicas foram marcadas com anticorpos monoclonais contra CD3 e contra CD19, de modo a identificar a população que prolifera diante do estímulo com IutA. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros FSC e SSC. Resultados expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) + desvio padrão da média da frequência das células que proliferaram. (Para o esquema de *gates* utilizado nesta análise, vide Figuras I a IV do Anexo). * $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (meio).

Simultaneamente ao ensaio anterior, foi realizado um ensaio dose-resposta para determinar a concentração da proteína recombinante que estimularia a proliferação máxima dos linfócitos B destas culturas celulares. Como pode ser notado na Figura 18, a frequência máxima de proliferação de células B (37%) foi atingida com uma concentração de 20µg/mL de IutA recombinante, resultando em um limite máximo de proliferação mesmo quando utilizadas concentrações mais elevadas como 40µg/mL e 80µg/mL. Assim, nos experimentos subsequentes utilizamos a dose de 20µg/mL como concentração ótima para a proliferação.

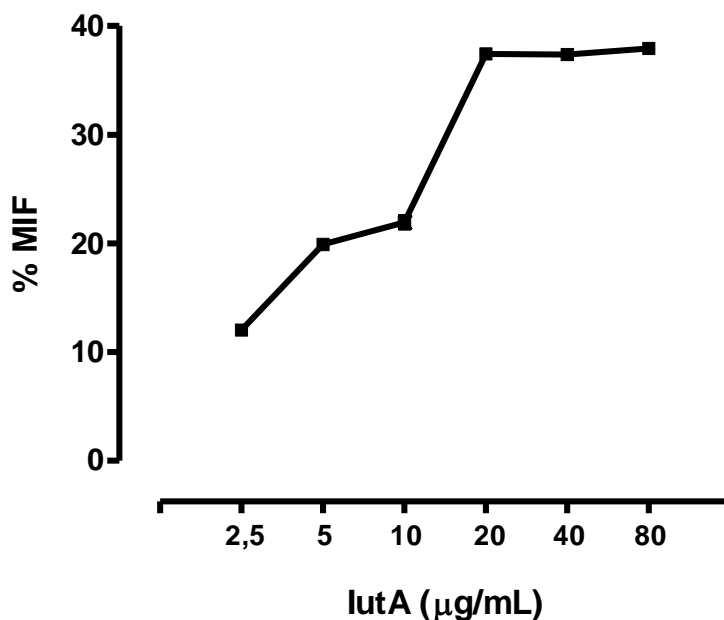


Figura 18 | A proliferação máxima de células B estimuladas com IutA recombinante é atingida em uma concentração de 20µg/mL. Células do baço (2×10^6) de animais C57BL/6 foram marcadas com CFSE e cultivadas por 72h em presença de diferentes concentrações de IutA recombinante (2,5µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 20µg/mL, 40µg/mL e 80µg/mL) na presença de 30 µg/mL de polimixina B. Dados são expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) das células B (CD19+) que proliferaram. A porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros FSC e SSC.

4.5. Polimixina B não inibe a resposta proliferativa das células B induzida pelo receptor de aerobactina

A produção da maioria das proteínas recombinantes é conseguida através da transformação de bactérias com vetores de expressão clonados com o gene de interesse. Uma limitação comum ao uso destas proteínas recombinantes produzidas por este processo é a contaminação destas com LPS, uma endotoxina que ativa células inflamatórias a produzir citocinas pró-inflamatórias e células B naïve à proliferarem de um modo independente de antígeno e linfócitos T (antígeno timo-independente) (Koga, Nishihara *et al.*, 1985). Assim, devido ao fato de IutA recombinante levar a proliferação de linfócitos B e esta proteína ser expressa e purificada de *E. coli*, havia uma possibilidade clara desta estar contaminada com LPS, sendo necessária a utilização de metodologias de remoção do excesso de contaminação. O próprio processo de purificação de IutA em colunas de níquel imobilizado em agarose

representa um método de redução da quantidade de LPS na amostra protéica. Para uma remoção ainda maior da contaminação por LPS, a amostra de IutA recombinante purificada foi cromatografada em uma coluna de polimixina B imobilizada em agarose, um método conhecidamente eficiente em reduzir endotoxinas em soluções (Issekutz, 1983), desde que a polimixina B apresenta uma alta afinidade de ligação à porção lipídica (lipídeo A) da maioria das endotoxinas (Morrison e Jacobs, 1976). Esse foi o motivo deste antibiótico também ser usado em todas as culturas celulares, visando inibir a atividade mitogênica do LPS contaminante na amostra purificada.

A Figura 19 representa o resultado de um experimento no qual a polimixina B foi utilizada com o intuito de comprovar que a proliferação dos linfócitos B foi devida à proteína IutA recombinante e não à contaminação por LPS. Assim, a atividade mitogênica de IutA foi comparada à do LPS na presença de polimixina B. Diferentes concentrações de polimixina B, 5µg/mL, 10µg/mL ou 30µg/mL foram adicionadas aos poços contendo células totais do baço de camundongos C57BL/6. Estas células foram estimuladas com 25µg/mL de LPS ou 20µg/mL de IutA recombinante e a proliferação avaliada após 72 horas. A Figura 19 mostra que a resposta proliferativa ao LPS sofreu uma acentuada redução após a adição de polimixina B. As células cultivadas em meio sem polimixina B proliferaram cerca de 47%, enquanto as cultivadas em meio acrescido de 30µg/mL de polimixina B proliferaram apenas cerca de 7,5%. A porcentagem de proliferação das células B esplênicas, entretanto, não sofreu uma redução muito acentuada, a queda foi de 29% em meio sem polimixina B para cerca de 18% em meio com 10µg/mL de polimixina B, o que foi mantido na concentração de 30µg/mL de polimixina. Esta diferença provavelmente é devida a uma pequena contaminação por LPS, o qual foi inibido pela adição de polimixina B. Assim, estes resultados revelam que a proliferação de células B do baço induzida por IutA recombinante não é devida à contaminação por endotoxina bacteriana.

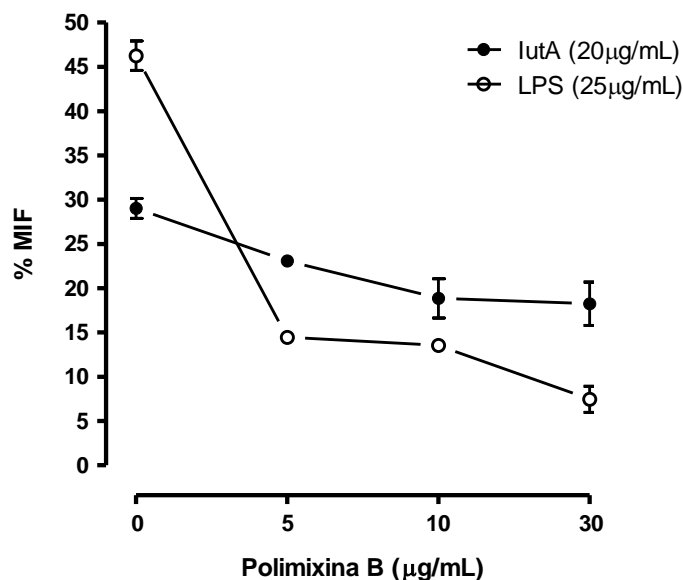


Figura 19 | Polimixina B não inibe a resposta proliferativa das células B induzida por IutA recombinante. Polimixina B foi adicionada a 5 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL ou não foi adicionada ao meio de cultura das células esplênicas (2×10^6) de animais C57BL/6 marcadas com CFSE e cultivadas na presença de 20 µg/mL de IutA recombinante (círculo fechado ●) ou 25 µg/mL de LPS (círculo aberto ○), por 72h. Dados são expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) das células B (CD19+) que proliferaram.

4.6. Células B convencionais (CD43-) e B-1 (CD43+) proliferam quando estimuladas com IutA

Devido à existência de diferentes subpopulações de linfócitos B, houve o interesse em estudar a subpopulação de linfócitos B que prolifera, e para isso foi necessária a separação das duas subpopulações principais de linfócitos B presentes no baço. Para esta finalidade, foram utilizadas as *Mouse CD43 (Ly-48) MicroBeads* (Miltenyi Biotec), kit de esferas magnéticas que separa as células B convencionais, também denominadas B-2, B-0 ou CD43-, por seleção negativa, e as demais células, CD43+, dentre as quais se encontram as células B-1, por seleção positiva.

Após o processo de separação, as diferentes populações obtidas foram incubadas na presença de 20 µg/mL de IutA recombinante ou 25 µg/mL de LPS. Os resultados revelam que apenas a população CD43+ apresentou uma proliferação significativa quando cultivada na

presença de IutA (Figura 20). A população CD19+CD43+ proliferou, em média, 33%, enquanto a população CD19+CD43-, com uma pureza de 98% avaliada pela marcação com anti-CD19 (dado não mostrado), proliferou cerca de 13%. Este dado pode ser um indício de que a subpopulação B-1, presente dentre as células CD43+, é a que prolifera de forma predominante. Para um painel representativo do esquema de *gates* utilizado na análise deste e dos demais experimentos com citometria de fluxo, ver Figura 21.

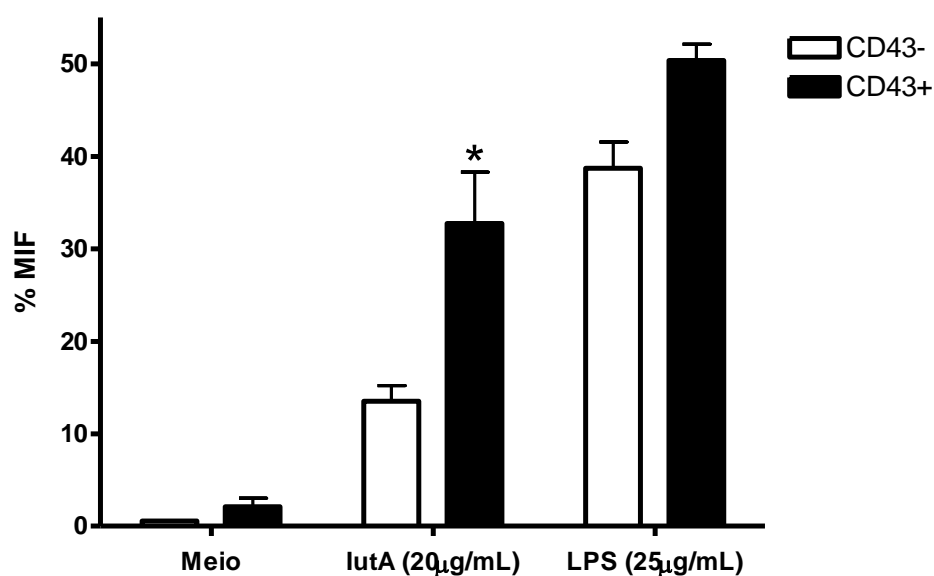


Figura 20 | Células CD43+ do baço de animais C57BL/6 são induzidas a proliferar por IutA recombinante. Células do baço de camundongos C57BL/6 foram isoladas por esferas magnéticas com base no marcador de superfície CD43. Os dois *pools* de células resultantes (CD43+ e CD43-) foram marcados com CFSE e cultivados por 3 dias em presença de meio, 20 µg/mL de IutA recombinante ou 25 µg/mL de LPS. Dados são expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) das células B (CD19+) que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação aos respectivos controles (meio).

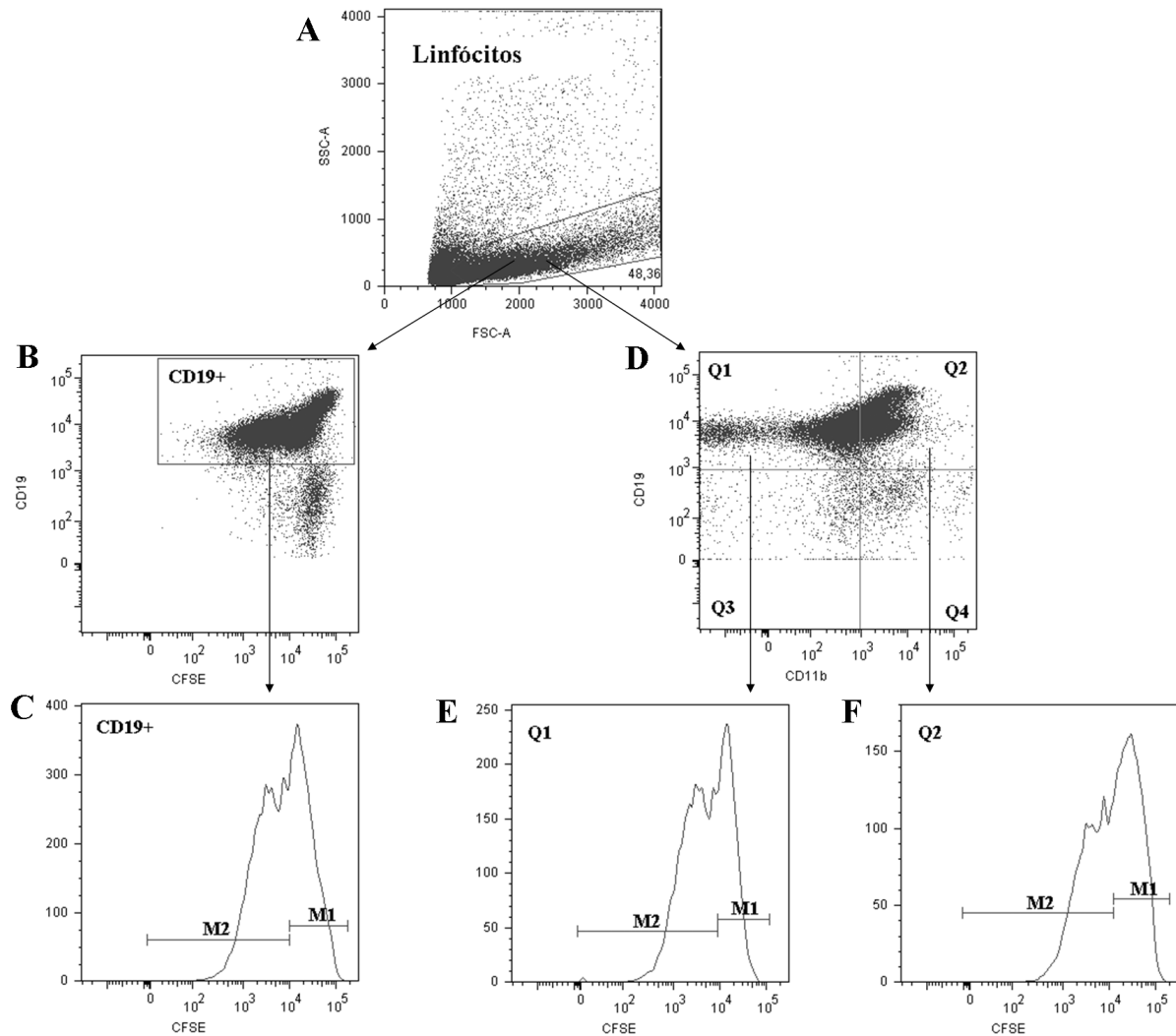


Figura 21 | Esquema de *gates* utilizado em todos os experimentos de citometria de fluxo. *Gates* sucessivas foram utilizadas para a identificação das diferentes subpopulações de células B murinas dependendo dos marcadores utilizados. A região de linfócitos foi selecionada com base nos parâmetros FSC (tamanho) e SSC (granularidade) (A). Para as análises das células B, utilizando-se apenas o marcador CD19, foi feita a *gate* representada em B e então a porcentagem de células que proliferaram foi analisada por histograma (C), onde M1 representa a população que não proliferou e M2 a população que proliferou. Para a análise das subpopulações de células B utilizando-se dois marcadores (CD19 e CD11b), os quadrantes no gráfico em *dot plot* foram delimitados com base na intensidade de fluorescência 10^3 (D) e a proliferação destas subpopulações foi então analisada separadamente por histogramas (E e F).

Com base nos resultados obtidos anteriormente pela separação de células com esferas magnéticas, foi investigada a proliferação de células totais do baço de animais BALB/Xid, os quais não possuem células B-1 (Figura 22). Como pode ser observado, quando estimuladas com IutA, ambas as populações celulares CD19+CD11b- e CD19+CD11b+ do animal controle (BALB/c) tiveram uma proliferação significativa (cerca de 15%) em comparação ao

controle sem estímulo (somente meio de cultura). Contudo, analisando as mesmas populações celulares do animal BALB/Xid, pode-se observar que ambas não proliferaram na presença do estímulo protéico, permanecendo apenas a proliferação espontânea.

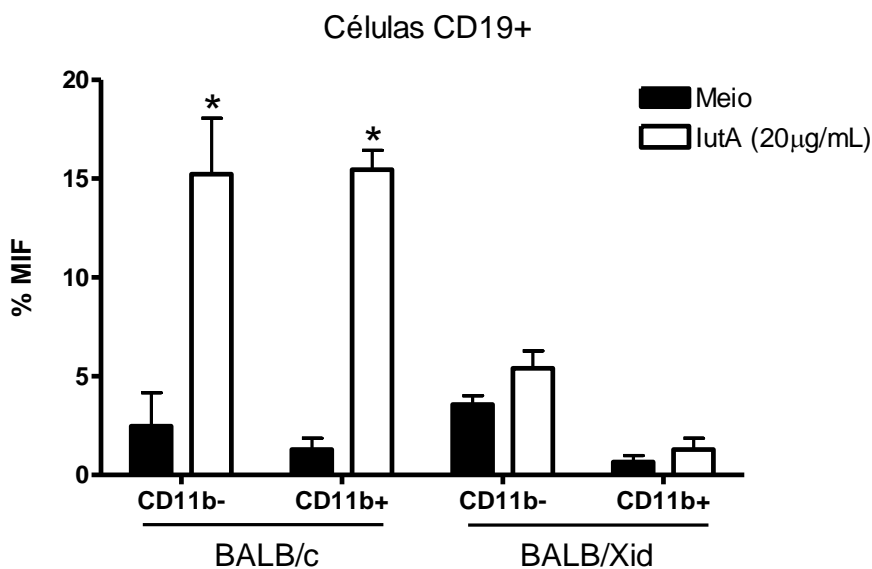


Figura 22 | IutA recombinante induz proliferação de células B de camundongos selvagens, mas não de células B deficientes na tirosina quinase de Bruton - Btk (BALB/Xid). Células esplênicas (2×10^6) de camundongos BALB/c e BALB/Xid foram marcadas com CFSE e cultivadas por 72h em presença de meio ou 20µg/mL de IutA recombinante. Dados são expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) das células B (CD19+) que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação ao respectivos controles (meio).

De acordo com os resultados descritos até o momento, aparentemente o receptor de aerobactina de *Escherichia coli* K-12 recombinante induz, predominantemente, a proliferação da subpopulação de células B-1. Além da metodologia de separação das subpopulações de células B por esferas magnéticas com base no marcador CD43 (leucosialina ou sialoforina), podem ser analisados, por citometria de fluxo, os marcadores CD19 (células B) e CD11b que, quando expressos, definem a subpopulação de células B-1. Desta maneira, células totais do baço de animais BALB/c foram cultivadas na presença ou ausência de IutA recombinante por 72 horas. A Figura 23 mostra um panorama da análise da proliferação das diferentes populações de linfócitos B. Os painéis A e B exibem gráficos representativos do esquema de *gates* utilizados para a delimitação destas diferentes populações com base na expressão dos

marcadores CD19 e CD11b. O painel A representa as células cultivadas na ausência de estímulo e o painel B as células estimuladas com IutA recombinante. Podemos notar que ambas as populações, CD19+CD11b- e CD19+CD11b+, proliferam quando estimuladas com a proteína. Como forma de facilitar a visualização e ressaltar a proliferação destas populações, o painel C mostra uma sobreposição dos histogramas correspondentes à proliferação das células CFSE+ na presença (preto) ou ausência (vermelho) do estímulo com IutA.

O painel D exibe um gráfico de barras que demonstra a porcentagem de proliferação das subpopulações CD19+CD11b- (média de 60%) e CD19+CD11b+ (média de 47%) induzida por IutA recombinante.

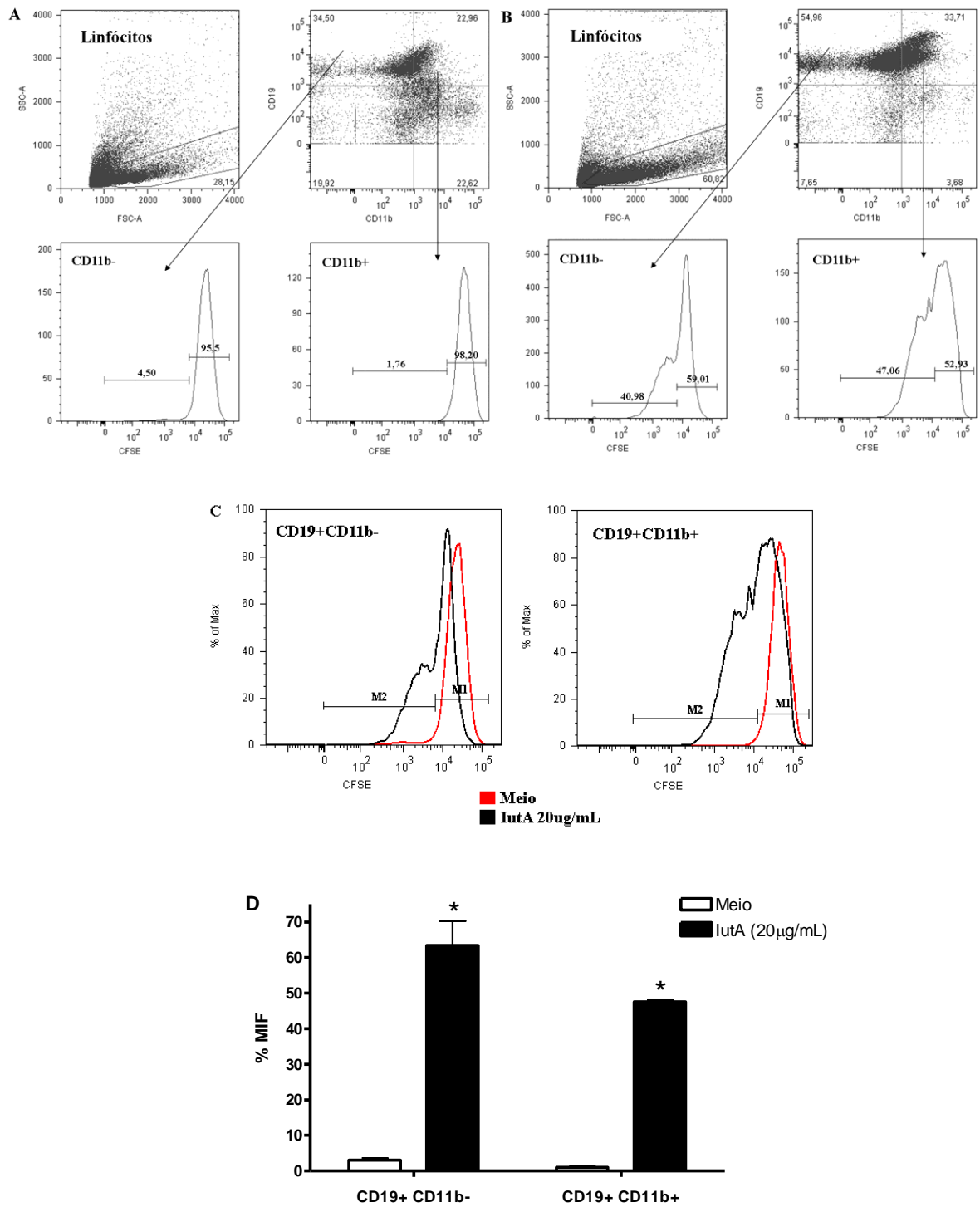


Figura 23 | IutA recombinante induz proliferação de células B-1. Painéis A e B representam o esquema de *gates* utilizado para identificar as subpopulações celulares CD19+CD11b- e CD19+CD11b+ (células B-1). Os linfócitos totais foram selecionados de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Dentro dessa região de linfócitos, a porcentagem de células CD19+CD11b- e CD19+CD11b+ foi determinada por *dot plot*. Então, a proliferação destas subpopulações foi analisada por histograma onde M1 representa a população que não proliferou e M2 a população que proliferou. (A) Cultura de células esplênicas (2×10^6) de camundongos C57BL/6 somente em meio de cultura ou (B) na presença de 20 µg/mL de IutA. (C) Sobreposição dos histogramas destas diferentes subpopulações de células B. (D) Gráfico em barras da proliferação das diferentes subpopulações de células B. * $p < 0,01$ em relação aos respectivos controles (meio).

Devido ao fato da subpopulação de células B-1 proliferar sob estímulo com IutA recombinante, tivemos o interesse em conhecer qual subtipo, B-1a ou B-1b, estava proliferando. Para isso, fizemos uma cultura de células do baço como foi feita até o momento e utilizamos os marcadores apropriados para analisar por citometria de fluxo o comportamento proliferativo destas populações celulares.

O painel A da Figura 24 mostra gráficos representativos do esquema de *gates* utilizados para a delimitação destas diferentes populações com base na expressão dos marcadores CD19, CD11b e CD5. Neste painel estão representadas as células cultivadas na presença de IutA recombinante.

Os resultados presentes no painel B revelam que a população CD19+CD11b+CD5+ (B-1a) proliferou, em média, 35%, enquanto a população CD19+CD11b+CD5- (B-1b) proliferou cerca de 23%, ambas estimuladas com o receptor de aerobactina recombinante. Podemos notar que ambas as populações B-1a e B-1b proliferam quando estimuladas com a proteína, porém B-1a apresenta uma proliferação mais expressiva que B-1b.

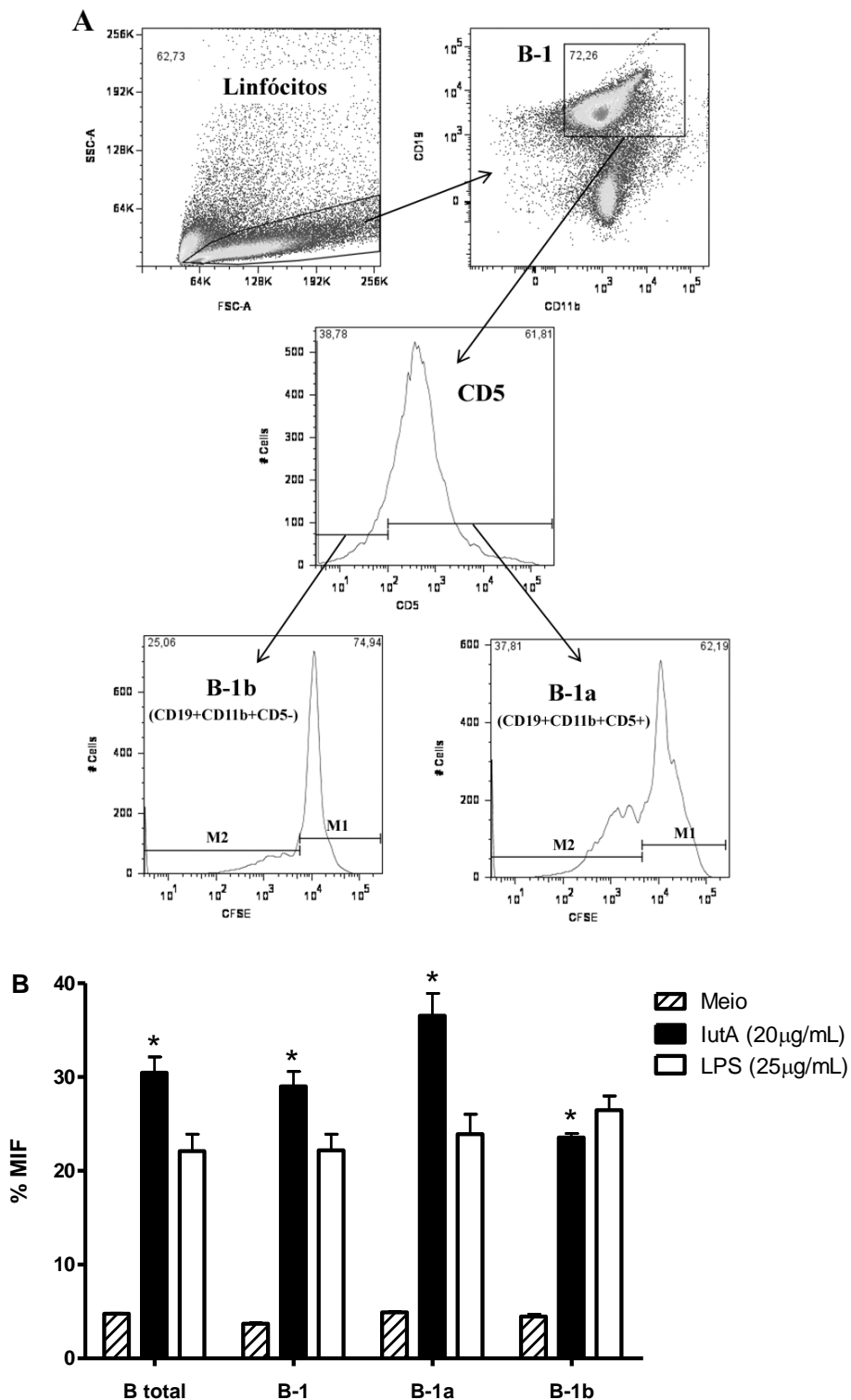


Figura 24 | IutA recombinante induz proliferação de células B-1a e B-1b. PAINEL A representa o esquema de *gates* utilizado para identificar as subpopulações de B-1. Os linfócitos totais foram selecionados de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Dentro dessa região de linfócitos, a porcentagem de células B-1 (CD19+CD11b+) foi determinada por *dot plot*. Posteriormente foi analisada a expressão do marcador CD5 por histograma e então a proliferação das subpopulações B-1a (CD19+CD11b+CD5+) e B-1b (CD19+CD11b+CD5-), onde M1 representa a população que não proliferou e M2 a população que proliferou. O esquema utilizado para a análise das células B totais e B-1 totais está representado na Figura 21. (B) Gráfico em barras da proliferação das diferentes subpopulações de células B. Cultura de células esplênicas (2×10^6) de camundongos C57BL/6 somente em meio de cultura, na presença de 20 µg/mL de IutA ou 25 µg/mL de LPS. * $p < 0,01$ em relação aos respectivos controles (meio).

Em vista da proliferação de células B-1b (CD19+CD11b+) observada anteriormente, fizemos uma cultura de células da cavidade peritoneal para a obtenção de células B-1b como descrito por Almeida *et al.* A Figura 25 revela que as células B-1b residentes peritoneais não proliferam na presença do receptor de aerobactina recombinante, no entanto estas células apresentam atividade proliferativa frente ao estímulo com o mitógeno LPS, o que sugere que estas células estão responsivas porém não proliferam frente ao estímulo protéico.

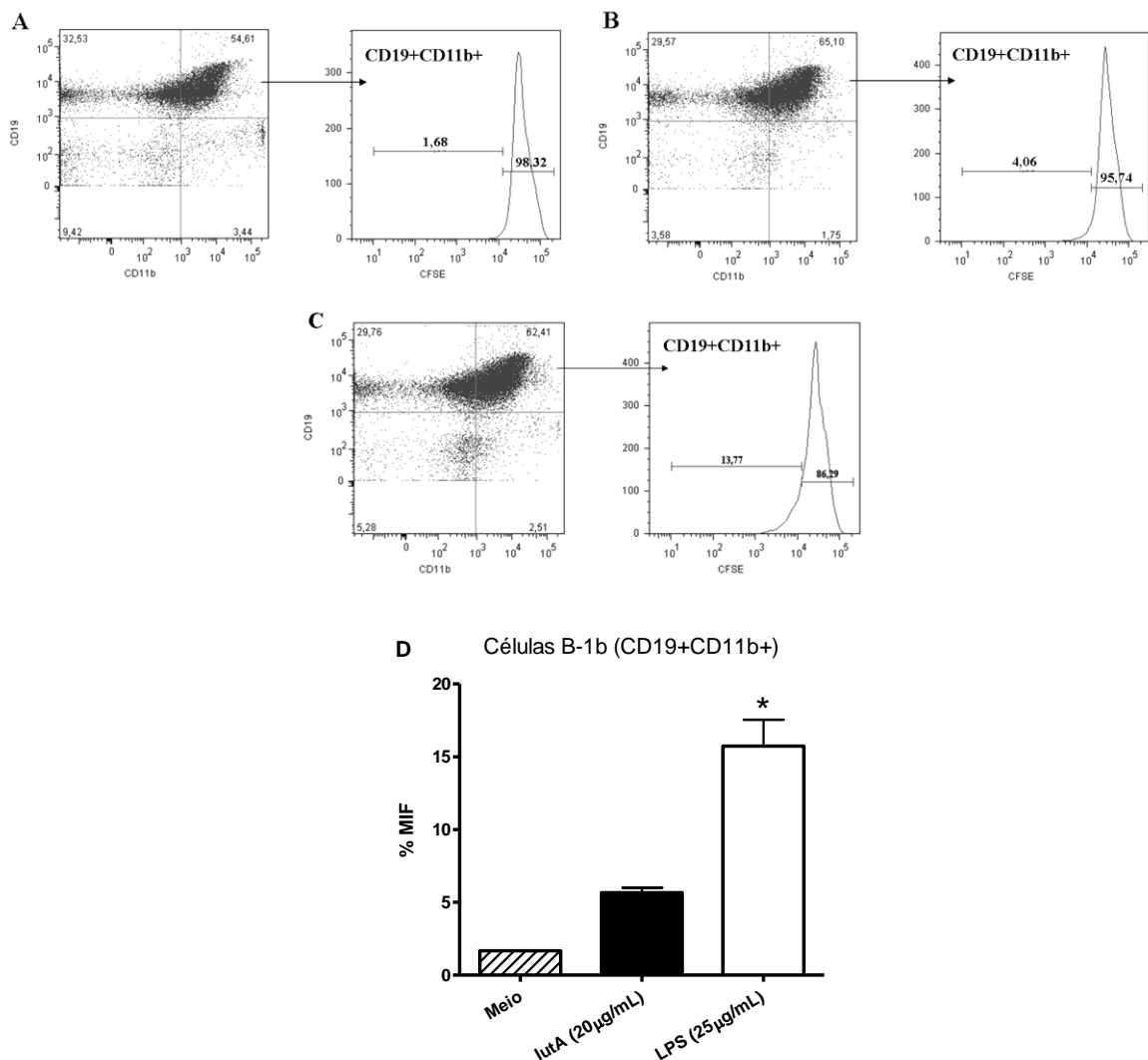


Figura 25 | Células B-1b (CD19+CD11b+) não proliferam quando estimuladas com IutA recombinante.

Análise por citometria de fluxo da subpopulação de células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c mostrando a porcentagem de células B-1b (CD19+CD11b+). (A) Células B-1b (1×10^6) marcadas com CFSE e incubadas por 72h na ausência de estímulo, (B) na presença de 20µg/mL de IutA recombinante ou (C) 25µg/mL de LPS. Os linfócitos totais foram selecionados de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). Dentro dessa região de linfócitos, a porcentagem de células B-1b (CD19+CD11b+) foi determinada por *dot plot*. Então, a proliferação desta subpopulação foi analisada por histograma. (D) Gráfico da média da porcentagem de proliferação das células B-1b cultivadas com diferentes estímulos. * $p < 0,01$ em relação ao controle (meio).

4.7. A proliferação dos linfócitos B depende de MyD88 e provavelmente ocorre via um dos TLR

A fim de se avaliar a via de sinalização pela qual o receptor de aerobactina estimula a proliferação das células B, animais deficientes em diferentes moléculas de sinalização foram utilizados (Figura 26).

As células totais do baço de animais deficientes da molécula adaptadora MyD88 (MyD88^{-/-}) e do TLR2 (TLR2^{-/-}) foram cultivadas na presença de 20µg/mL de IutA recombinante, 25µg/mL de LPS ou somente na presença de meio (sem estímulos). As células de animais controle (C57BL/6) foram submetidas às mesmas condições descritas acima. O painel A mostra que não há proliferação das células CD19⁺ do animal MyD88^{-/-} estimuladas com IutA quando comparadas ao grupo controle (meio). Entretanto, células CD19⁺ dos animais TLR2^{-/-} proliferaram cerca de 13%, ou seja, uma porcentagem de células próxima à porcentagem de 19% obtida com o animal controle (C57BL/6). Posteriormente, foi analisado se o receptor de aerobactina poderia se ligar ao TLR4 para estimular a proliferação das células B do baço. Desta maneira, células do baço de animais naturalmente deficientes em TLR4 (C3H/HeJ) foram cultivadas na presença de IutA recombinante ou na ausência de qualquer estímulo (somente meio). Foram utilizadas células do baço de animais controle que não possuem a deficiência na sinalização por TLR4 (C3H/HePas) as quais foram submetidas às mesmas condições das células do animal deficiente. No painel B podemos notar que mesmo na ausência de sinalização por TLR4, ainda há proliferação das células B. As células CD19⁺ do animal C3H/HeJ proliferaram 13% enquanto as células do animal controle C3H/HePas proliferaram 32%. Essa maior porcentagem de proliferação das células CD19⁺ do animal controle pode ser devida a uma possível contaminação por LPS na amostra.

Estes resultados indicam que a sinalização para a proliferação não ocorre via TLR2 ou TLR4, entretanto é uma via dependente da proteína adaptadora MyD88. Além disso, os

resultados obtidos com os animais deficientes em TLR4 corroboram os dados obtidos anteriormente e confirmam que a proliferação de células B estimulada por IutA recombinante não ocorre devida à contaminação por LPS já que as células B destes animais deficientes não proliferam frente ao estímulo com LPS. O experimento utilizando o LPS como estímulo para as células dos animais C3H/HeJ (deficiente) e C3H/HePas (selvagem) não foi realizado devido à contaminação do LPS comercial com ligantes de TLR2, como as lipoproteínas (Lee, Lee *et al.*, 2002), os quais também estimulam a proliferação de células B (Genestier, Taillardet *et al.*, 2007).

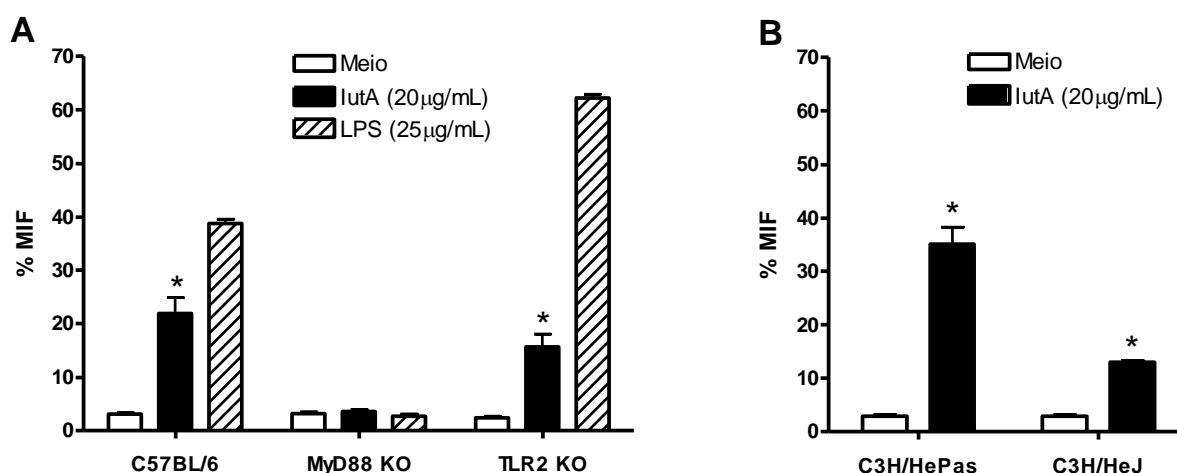


Figura 26 | Proliferação de células B do baço induzida por IutA é dependente da sinalização via molécula adaptadora MyD88 e independente de TLR2 e TLR4. Células esplênicas (2×10^6) de (A) camundongos C57BL/6 (controle), MyD88^{-/-}, TLR2^{-/-} e (B) deficientes (C3H/HeJ) e proficientes (C3H/HePas) na atividade de TLR4 (controle) foram marcadas com CFSE e cultivadas por 72h em presença de meio, LPS (25 µg/mL) ou 20 µg/mL de IutA recombinante. A porcentagem de células CD19⁺ que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros FSC e SSC. Dados expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) das células B (CD19⁺) que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação aos respectivos controles (meio).

Além da sinalização pelos TLR2 e TLR4, foi avaliada também a capacidade de IutA induzir a proliferação das células B através de um dos TLRs endossômicos (TLRs 3, 7, 8 e 9). Para isso, utilizamos a cloroquina, droga usada para inibir a acidificação dos endossomos, condição necessária para a ativação dos TLRs 3, 7, 8 e 9 (Lee, Chuang *et al.*, 2003; Rutz,

Metzger *et al.*, 2004; De Bouteiller, Merck *et al.*, 2005; Gibbard, Morley *et al.*, 2006). Anteriormente ao ensaio, foi avaliada a citotoxicidade da cloroquina na cultura das células do baço. A Figura 27 mostra que a cloroquina em concentrações a partir de 10 μ M provoca uma diminuição significativa na viabilidade celular, provocando a morte de todas as células em concentrações superiores a 1000 μ M.

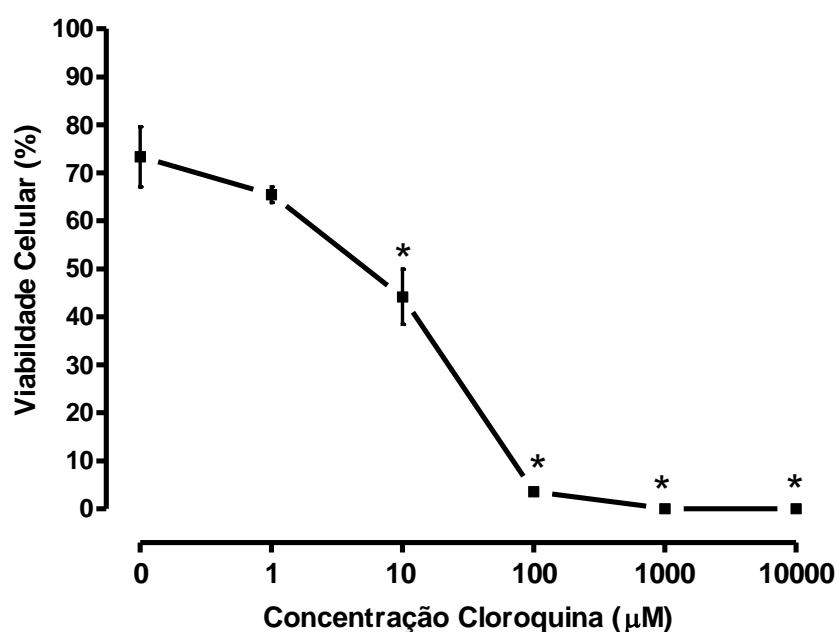


Figura 27 | Curva de viabilidade celular da cloroquina no teste de citotoxicidade pelo método de exclusão do azul de Trypan. Células esplênicas (2×10^6) de camundongos C57BL/6 foram cultivadas por 72h na presença de diferentes concentrações de cloroquina (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M, 10000 μ M) ou na ausência desta droga. A porcentagem de células viáveis foi avaliada por contagem pelo método de coloração azul de Trypan. * $p < 0,01$ em relação aos grupos 0 e 1 μ M.

Posteriormente à avaliação da citotoxicidade, foi realizado o ensaio para analisar a indução da proliferação por IutA através de um dos TLR endossômicos. As células, anteriormente à adição dos estímulos IutA ou LPS, foram tratadas por 1 hora com cloroquina nas concentrações 5 ou 10 μ M (Figura 28). As concentrações de 5 e 10 μ M não inibiram a proliferação das células B totais (CD19+) (A), assim como das células B-1 (CD19+CD11b+) (B) e de suas subpopulações B-1a (CD19+CD11b+CD5+) (C) e B-1b (CD19+CD11b+CD5-) (D) de forma significativa ($p > 0,05$). O estímulo com LPS foi utilizado neste experimento pois a cloroquina não possui um efeito inibitório sobre a proliferação induzida por um ligante

de um TLR de superfície. Além disso, é interessante ressaltar que apesar da concentração de 10 μ M de cloroquina ter diminuído a viabilidade celular de maneira significativa, as análises por citometria de fluxo mostraram que as células tratadas com as concentrações de 5 e 10 μ M de cloroquina mantiveram sua atividade proliferativa quando estimuladas com IutA, ou seja, na prática esta diminuição de viabilidade celular foi insignificante. Assim, estes dados demonstram que o receptor de aerobactina de *E. coli* não é detectado por um dos TLRs do compartimento endossômico.

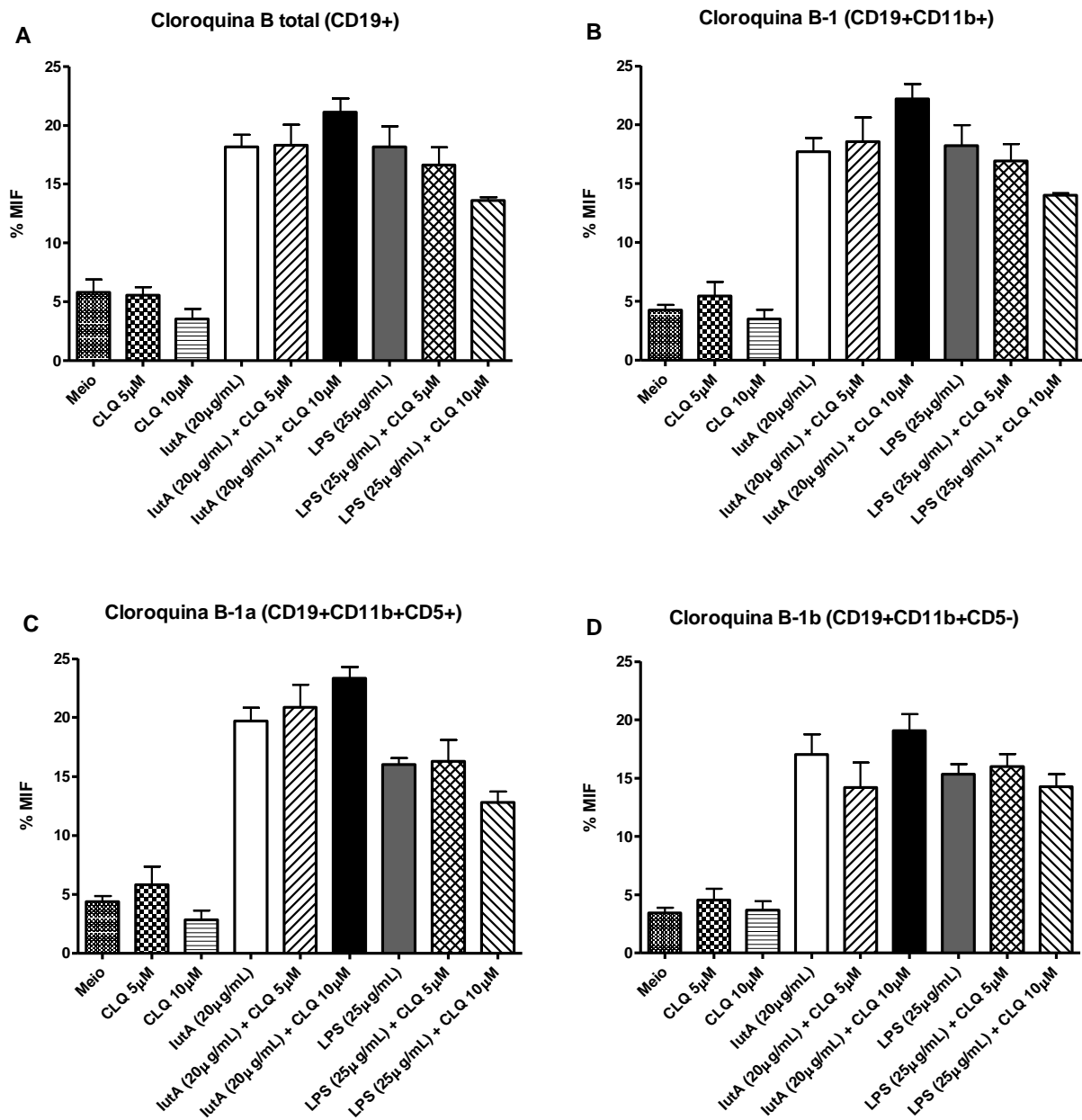


Figura 28 | Proliferação de células B do baço não é dependente de um TLR endossômico. Células esplênicas (2×10^6) de camundongos C57BL/6, marcadas com CFSE, foram cultivadas por 72h na presença de meio, 20µg/mL de IutA recombinante ou LPS (25µg/mL), na presença ou não de 5µM ou 10µM de cloroquina (CLQ). (A) Porcentagem de células CD19+, (B) CD19+CD11b+, (C) CD19+CD11b+CD5+ ou (D) CD19+CD11b+CD5- que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros FSC e SSC. Resultados expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) das células que proliferaram.

4.8. Receptor de aerobactina induz proliferação de células B-1 no linfonodo mesentérico

Para determinar se o receptor de aerobactina, naturalmente presente em *E. coli* comensal da microbiota intestinal, estimularia a proliferação de células B da região intestinal, foi realizado um experimento utilizando-se os linfonodos mesentéricos, os quais são passagem obrigatória de linfa e células imunológicas advindas da região do intestino (Figura 29). Os resultados com as células destes linfonodos estimuladas com IutA recombinante evidenciam a proliferação de somente uma subpopulação de linfócitos B, a população CD19+CD11b+, ou seja, as células B-1. A porcentagem de proliferação desta subpopulação estimulada com a proteína (cerca de 18%) foi significativamente superior ($p < 0,01$) à proliferação basal (cerca de 1%). Contrariamente, não houve proliferação significativa da subpopulação CD19+CD11b- (aproximadamente 2%). Com base nestes dados podemos dizer que esta proteína induz a proliferação de células B-1 do baço e dos linfonodos mesentéricos. Isso demonstra a ação do receptor de aerobactina num sítio para onde vários componentes bacterianos da microbiota intestinal são drenados e podem ser detectados por receptores presentes nas células do sistema imunológico, como as células B.

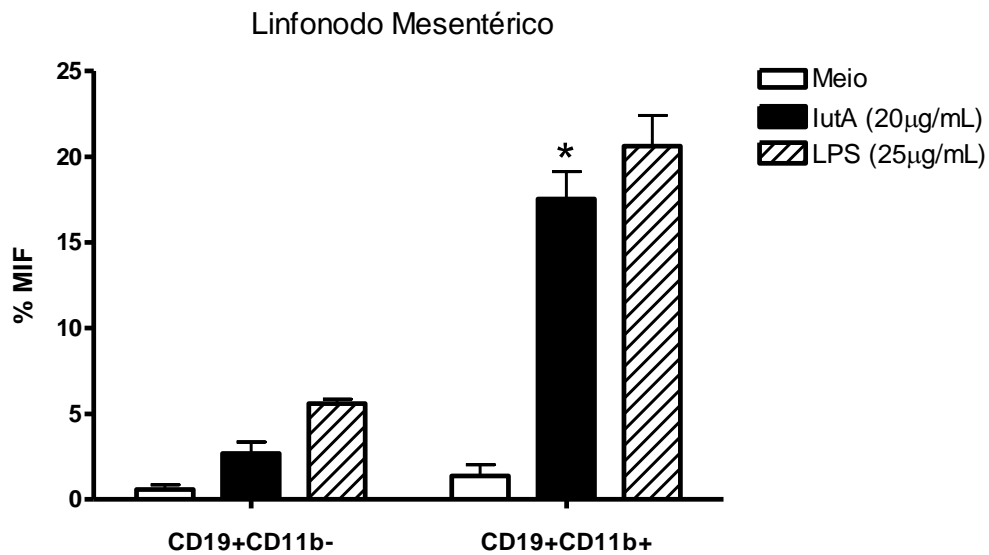


Figura 29 | Linfócitos B (CD19+CD11b+) do linfonodo mesentérico têm proliferação induzida pelo receptor de aerobactina da bactéria comensal *Escherichia coli* K-12. Células do linfonodo mesentérico (2×10^6) de camundongos C57BL/6 foram marcadas com CFSE e cultivadas por 72h em presença de meio, LPS (25µg/mL) ou 20µg/mL de IutA recombinante. A porcentagem de células CD19+CD11b- e CD19+CD11b+ que proliferaram foi determinada por histograma, dentro da região de linfócitos, delimitada pelos parâmetros FSC e SSC. Resultados expressos como a porcentagem da média da intensidade de fluorescência (%MIF) das células B (CD19+) que proliferaram. * $p < 0,01$ em relação aos respectivos controles (meio).

5. DISCUSSÃO

Embora tenham sido previamente identificadas proteínas ligantes de carboidrato em *E. coli* (revisto por Sharon, 2006), há uma grande chance de que existam nessas bactérias outras moléculas com esta propriedade de ligação a carboidratos, além do fato de se conhecer muito pouco da relação destas proteínas bacterianas com o sistema imunológico de mamíferos.

Resultados preliminares mostraram que *E. coli* apresenta uma proteína de 60/66kDa que se adsorve às resinas de agarose (durante estudo de Coelho-Castelo, 2000). Quando os experimentos foram repetidos com estas bactérias, cultivadas em caldo LB, utilizando-se colunas com diferentes carboidratos imobilizados, observamos que as bactérias apresentavam algumas proteínas ligantes às resinas que eram diferencialmente expressas. Dessas proteínas, destaca-se uma que foi altamente adsorvida à Sepharose, e em menor grau à lactose e à galactose. De um modo totalmente imprevisto, não foi observada esta proteína no material adsorvido à resina de D-manose-agarose. Nos experimentos de cromatografia de afinidade que se seguiram, observamos que uma proteína de ~60kDa estava presente na maioria dos materiais adsorvidos à Sepharose.

O perfil de proteínas expresso por determinados microorganismos pode variar dependendo das condições de seu habitat. Kenny *et al.* (1997) relataram a necessidade de condições similares àquelas encontradas no intestino para que a produção *in vitro* de certas proteínas de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) sejam alcançadas. Quando cultivamos as bactérias em meio mínimo essencial (DMEM) não obtivemos resposta em relação à produção de proteínas que eram adsorvidas à Sepharose. Ao investigarmos se a suplementação de DMEM com sais poderia induzir a produção de proteínas (Kenny, Abe *et al.*, 1997), observamos que somente o CaCl₂ se mostrou essencial para induzir tal produção, não alterando o crescimento bacteriano. Um dado extremamente interessante nesse experimento foi a obtenção de uma proteína principal com MM de 75kDa, e não a de 60kDa que foi obtida

nos experimentos com bactérias cultivadas em caldo LB. Mesmo quando o caldo LB foi suplementado com CaCl_2 , a proteína de 75kDa não foi observada, sugerindo que sinais adicionais do meio, como estresse nutricional, possam ser os responsáveis pela produção dessa proteína (Kenny, Abe *et al.*, 1997).

Devido ao fato de os lisados serem passados sequencialmente pelas diferentes colunas de cromatografias, as proteínas foram adsorvidas quase que invariavelmente na coluna de Sepharose. A ausência de material adsorvido à resina de galactose imobilizada foi indicativa que o material ligante de galactose teria sido destituído do lisado quando passado pela coluna de Sepharose, um polímero constituído de resíduos alternados de β -D-galactopiranosose 3-O-ligado e 3,6-anidro- α -L-galactopiranosose 4-O-ligado (Hamer, Bhattacharjee *et al.*, 1977), não restando ligantes para adsorção à galactose-agarose. Os resultados obtidos com as cromatografias de afinidade são sugestivos de que as proteínas de 60 e 75kDa isoladas do extrato de *E. coli* sejam ligantes de galactose, embora não se tenha eluído nenhuma delas com D-galactose ou lactose da coluna de Sepharose (dados não mostrados). Essa ausência de desadsorção poderia ser explicada por uma alta especificidade dessas proteínas pelo dissacarídeo que constitui o polímero de agarose e uma fraca especificidade por monossacarídeo ou dissacarídeo, como ocorre com algumas lectinas de plantas (Lis e Sharon, 1998). É por isso que a classificação de lectinas de acordo com a especificidade a monossacarídeos muitas vezes mascara as estranhas especificidades que essas proteínas frequentemente exibem para di, tri ou tetrassacarídeos, com constantes de associação até 1.000 vezes maior quando comparada a de monossacarídeos. Além disso, muitas vezes a conformação tridimensional do oligossacarídeo proporciona estruturas complexas que não podem ser mimetizadas por açúcares simples (Lis e Sharon, 1998).

Um fenômeno inesperado foi observado nas cromatografias em sistema automatizado. Ao se reequilibrar a coluna de Sepharose com TBS, após a eluição do material com NaCl a

1M, havia o aparecimento de um pico de absorvância em 280nm. A análise desse material revelou banda bastante tênue de 60kDa, o que dificultou a documentação (dados não mostrados). Aventamos que o aumento da força iônica do meio possa ter favorecido o aumento de possíveis interações hidrofóbicas de certas proteínas adsorvidas à resina. Assim, quando a força iônica foi diminuída rapidamente durante o reequilíbrio, houve o desprendimento dessas proteínas. Além disso, observamos que em todas as cromatografias de lisados bacterianos por nós realizadas, não houve muita variação nas absorvâncias desse material eluído no reequilíbrio, em contraste com as eluições com NaCl e ácido acético que variaram nas diversas situações experimentais.

Proteínas de 60 e 75kDa foram frequentemente isoladas de bactérias cultivadas em caldo LB e DMEM, respectivamente, o que nos motivou a enviá-las para a identificação. Com os resultados obtidos do sequenciamento dos fragmentos trópticos dessas proteínas por MS, foi estabelecida correspondência entre a proteína de 60kDa de *E. coli* ligante de Sepharose e a flagelina de *E. coli* enteroagregativa (Steiner, Nataro *et al.*, 2000). Apesar da proteína de 60kDa apresentar também similaridade com a OmpA de *E. coli*, sugerimos que elas não sejam correspondentes, pois OmpA tem MM de 35kDa em SDS-PAGE (Kleinschmidt, 2003), enquanto flagelina apresenta MM de 65kDa (Steiner, Nataro *et al.*, 2000). Flagelina é uma proteína que se associa para formar uma estrutura filamentosa, sendo o constituinte principal do flagelo, um apêndice bacteriano usado para a locomoção e quimiotaxia (Shapiro, 1995). Muitas bactérias são flageladas e a sua associação com a virulência ficou, no passado, restrita à motilidade. No fim da década de 90, a flagelina foi identificada por alguns grupos independentes como mediadores solúveis que causam inflamação intestinal após infecção com EAEC ou *Salmonella* (Ciacci-Woolwine, Blomfield *et al.*, 1998; Wyant, Tanner *et al.*, 1999b; 1999a; Steiner, Nataro *et al.*, 2000). A inflamação é dependente da ativação de receptores tipo Toll (TLR) 5 presentes em células dendríticas, macrófagos, células B e células epiteliais. A

estimulação de TLR5 por flagelina leva ao disparo de uma cascata de reações enzimáticas que culminam com a ativação da produção de proteínas inflamatórias via NF- κ B e proteína quinase ativada pelo mitógeno p38. Além disso, a flagelina parece estabelecer uma importante ponte entre a imunidade inata e a adaptativa, fato que explicaria sua imunogenicidade (Steiner, 2007). Apesar da grande quantidade de dados referentes ao papel da flagelina como um fator de virulência, não foi possível identificar nenhum trabalho na literatura que tenha assumido uma possível atividade lectínica dessa molécula. Dessa forma, não descartamos que a flagelina possa ser co-purificada no processo cromatográfico pela associação à outra proteína flagelar que tenha atividade lectínica. Nesse sentido, as duas bandas minoritárias de 40 e 30kDa ligantes de Sepharose detectadas nos materiais oriundos de bactérias cultivadas em caldo LB deverão ser submetidas ao sequenciamento protéico, no sentido de esclarecermos, num primeiro momento, se uma dessas proteínas apresenta estrutura compatível com proteínas ligantes de carboidrato.

Com relação às duas proteínas de 75kDa (bandas 2 e 3, Figura 11) submetidas ao sequenciamento de aminoácidos, ambas tiveram alta identidade com proteínas envolvidas na captura de ferro pela bactéria. Das proteínas assinaladas como correspondentes à proteína de 75kDa, a única presente nas duas bandas foi a proteína de receptor maduro (*mature receptor protein*). Essa proteína apresenta identidade absoluta com o precursor do receptor de aerobactina férrica, identificado a partir da banda 3 (Tabela 2). Outras proteínas pertencentes a essa família de proteínas envolvidas no transporte de ferro também foram identificadas – receptor de heme/hemoglobina de membrana externa da parede bacteriana e proteínas do receptor de membrana externa (ligado ao transporte de ferro). Essas proteínas apresentam uma alta identidade, com conservação de inúmeros resíduos de aminoácidos (Tabela 2), tornando bastante claro que elas pertençam à mesma família gênica.

A obtenção das sequências do receptor de aerobactina (*mature receptor protein*) nas duas proteínas de 75kDa enviadas ao sequenciamento, associado à MM de 76kDa dessa proteína (Marolda, Valvano *et al.*, 1987; Bouchet, Valvano *et al.*, 1994), sugerem uma correspondência entre essas proteínas. Ainda, este receptor de aerobactina tem sua expressão dependente da disponibilidade do íon ferro no ambiente, sendo sua expressão induzida em um ambiente depletado deste íon (Escolar, Perez-Martin *et al.*, 2000). Assim, estes dados da literatura corroboram os resultados obtidos por nós e embasaram a nossa escolha em considerar esta proteína como o receptor de aerobactina férrica e desta maneira dar continuidade ao trabalho.

Tabela 2 | Pareamento das sequências das proteínas correspondentes à proteína de *E. coli* de 75kDa ligante de Sepharose.

OM_hemoglobin_receptor	1	MLALAVSATLPTFAFAT ET MTVTATGNAR RSSE F E APMMVSVIDTSA
OM_receptor	1	MSRPQFTSLRSLALALAVSATLPTFAFAT ET MTVTATGNAR RSSE F E APMMVSVIDTSA
Aerobactin_receptor	1	MMISKKYTLWALNPLLLTMMAPAVAQQTDD ET FVVSANRSNR RTVA E MA QTTWVIENAE
Mature_receptor_protein	1	QQTDD ET FVVSANRSNR RTVA E MA QTTWVIENAE
OM_hemoglobin_receptor	46	PEN QTATS ATDLLRHV PG ITLDG TGR TNGQDV NMR GYDHR GV L VLVDGVR QG TD
OM_receptor	58	PEN QTATS...ATDLLRYV PG ITLDG TGR TNGQDV NMR GYDHR GV L VLVDGVR QG.TD
Aerobactin_receptor	59	LEQ IQGGKELKDALAQL PGL DVSSRS RTN .YGM NVRG ... RPLV VLVDGVR LNSSR
Mature_receptor_protein	34	LEQ IQGGKELKDALAQL PGL DVSSRS RTN .YGM NVRG ... RPLV VLVDGVR LNSSR
OM_hemoglobin_receptor	100	TG HLNGTFL DP AL IKR VE IVR GPSAL LYG SGAL GGV ISYD TVD AKDLLQEGQSS GFR V
OM_receptor	112	TG HLNGTFL DP AL IKR VE IVR GPSAL LYG SGAL GGV ISYD TVD AKDLLQEGQSS GFR V
Aerobactin_receptor	113	TDSR QLDS ID PFN IDH IE VIS G.ATS LYG GG STGGL INIV T KKGQPETMME FEA G T KS
Mature_receptor_protein	88	TDSR QLDS ID PFN IDH IE VIS G.ATS LYG GG STGGL INIV T KKGQPETMME FEA G T KS
OM_hemoglobin_receptor	158	FGTGGT GDH SLGLGASAF GR TE NLD G IV AWSSRD RGD LRQ NS GETAP ND ESIN.....
OM_receptor	170	FGTGGT GDH SLGLGASAF GR TE NLD G IV AWSSRD RGD LRQ NS GETAP ND ESIN.....
Aerobactin_receptor	167	.GFSSSK DH DERIAGAVSG NE HIS GR LSVAYQ KFG WFD NG DATLL DN TQTGLQYS
Mature_receptor_protein	145	.GFSSSK DH DERIAGAVSG NE HIS GR LSVAYQ KFG WFD NG DATLL DN TQTGLQYS
OM_hemoglobin_receptor	211	...N. MLAK GT WQ ID SAQ LS GLV RY YNN DARE PK...NPQTVEASDS SN PM VDR ..
OM_receptor	223	...N. MLAK GT WQ ID SAQ LS GLV RY YNN DARE PK...NPQTVEASDS SN PM VDR ..
Aerobactin_receptor	227	DRLD IM .G TG TLN ID ESRQ LQ LITQ YY KSQGDDDYGLNLGKGFSAIR GT ST PF V S NGL
Mature_receptor_protein	202	DRLD IM .G TG TLN ID ESRQ LQ LITQ YY KSQGDDDYGLNLGKGFSAIR GT ST PF V S NGL
OM_hemoglobin_receptor	259ST IQ RDAQLSYKLAPQ GN DWLNADAKIYWSEVR INA QN.....
OM_receptor	271ST IQ RDAQLSYKLAPQ GN DWLNADAKIYWSEVR INA QN.....
Aerobactin_receptor	284	NSDRIPGTERHLS IQ YSDSAFLGQELV GV QVYRDESLRFY PF PT VN ANKQV TAF SSS
Mature_receptor_protein	259	NSDRIPGTDGHLIS IQ YSDSAFLGQELV GV QVYRDESLRFY PF PT VN ANKQV TAF SSS
OM_hemoglobin_receptor	297	TGSSGE YR EQ IT KGAR.LENRSTLFADSFASHLL TY GGEY YR Q EQ HPGG.....
OM_receptor	309	TGSSGE YR EQ IT KGAR.LENRSTLFADSFASHLL TY GGEY YR Q EQ HPGG.....
Aerobactin_receptor	342	QQDTDQ YGM KL T LN SK PM DG WQ IT WGLDADHER F TS NQ MF DLA QASASGGLNNK KI Y
Mature_receptor_protein	317	QQDTDQ YGM KL T LN SK PM DG WQ IT WGLDADHER F TS NQ MF DLA QASASGGLNNK KI Y
OM_hemoglobin_receptor	345	AT T GF P Q AK ID FS SG W LQ DEITL RD L P I TLL GG TR YDSYRGSS D G Y KD VD ADK W SSRA
OM_receptor	357	AT T GF P Q AK ID FS SG W LQ DEITL RD L P I TLL GG TR YDSYRGSS D G Y KD VD ADK W SSRA
Aerobactin_receptor	400	TT GR Y PS YD IT N LAA F LQ SD YD IN NL. F T L NG G V RY Q Y TEN KID DFIGYA Q QR Q IA G
Mature_receptor_protein	375	TT GR Y PS YD IT N LAA F LQ SG YD IN NL. F T L NG G V RY Q Y TEN KID DFIGYA Q QR Q IA G
OM_hemoglobin_receptor	403	GMT.....INPT NW L ML F G SYA QA FRAP TM G EM Y ND SK H F S IG R F Y T N
OM_receptor	415	GMT.....INPT NW L ML F G SYA QA FRAP TM G EM Y ND SK H F S IG R F Y T N
Aerobactin_receptor	457	KATSAD A IP GG SVD Y DN FL N AG L LM H I TER QA W LN F SQ G V EL PD PG KY Y GR G Y GA
Mature_receptor_protein	431	KATSAD A FW RL SR.L RH FL N AGL LM H I TE PQ W LN F SQ G V EL PD PG KY Y GR G Y GA
OM_hemoglobin_receptor	446	YWV PN PN L RP ET NE TQ E Y GF GL RF DDL ML S ND A LE FK ASY F DT K AK D Y I ST T .V D FA A
OM_receptor	458	YWV PN PN L RP ET NE TQ E Y GF GL RF DDL ML S ND A LE FK ASY F DT K AK D Y I ST T .V D FA A
Aerobactin_receptor	515	AVNGHL PL T K SV N V S DS K LE GV K V DS Y EL G ... WR F T G NN L R TQ IA A Y Y S I SD K SV V A
Mature_receptor_protein	489	AVNGHL PL T K SV N V S DS K LE GV K V DS Y EL G ... WR F T G NN L R TQ IA A Y Y S I SD K SV V A
OM_hemoglobin_receptor	502	ATTMS YN V PN ..AK I W G W D VM T K Y TT D LF S LD V AY NR TR G K D TD T GE Y ISS IN PD TV T
OM_receptor	515	ATTMS YN V PN ..AK I W G W D VM T K Y TT D LF S LD V AY NR TR G K D TD T GE Y ISS IN PD TV T
Aerobactin_receptor	570	NKDL T IS V DD K RR I Y G VE G AV D Y L IP D T D W ST GV N .F N VL K T E SK V NG T W Q K Y D V K T
Mature_receptor_protein	544	NKDL T IS V DD K RR I Y G VE G AV D Y L IP D T D W ST GV N .F N VL K T E SK V NG T W Q K Y D V K T
OM_hemoglobin_receptor	559	STLNI PIA H S G F SV G . W VG T F A DR ST H I SS S Y S K Q P GY G V ND F Y. V S Y Q Q Q AL K G M T
OM_receptor	571	STLNI PIA H S G F SV G . W VG T F A DR ST H I SS S Y S K Q P GY G V ND F Y. V S Y Q Q Q AL K G M T
Aerobactin_receptor	627	ASPSK A Y I G W AP D P WS ...LR V Q ST T S F D V S DA Q G Y V D G Y TT V DL L G S Y Q L P V G T
Mature_receptor_protein	601	ASPSK A Y I G W AP D P WS ...LR V Q ST T S F D V S DA Q G Y V D G Y TT V DL L G S Y Q L P V G T
OM_hemoglobin_receptor	614	TTLVL G NA F D K E Y W S P Q G I P Q D GR NG K I F V S Y Q W
OM_receptor	627	TTLVL G NA F D K E Y W S P Q G I P Q D GR NG K I F V S Y Q W
Aerobactin_receptor	682	LS F SI EN L F DR D Y TT V W G Q R A PL Y Y S PG Y GP A S L Y D Y K GR G RT F GL N Y S V L F
Mature_receptor_protein	656	LS F SI EN L F DR D Y TT V W G Q R A PL Y Y S PG Y GP A S L Y D Y K GR G RT F GL N Y S V L F

As letras sublinhadas e em negrito são correspondentes aos aminoácidos conservados entre as quatro proteínas.
 OM_hemoglobin_receptor – receptor de heme/hemoglobina de membrana externa da parede bacteriana,
 OM_receptor – proteínas do receptor de membrana externa,
 Aerobactin_receptor – precursor do receptor de aerobactina férrica, e
 Mature_receptor_protein - proteína de receptor maduro.

O sistema de aerobactina é um sistema de aquisição de ferro e é indispensável para o crescimento bacteriano no hospedeiro (Williams, 1979; Dho e Lafont, 1984). O *iutA*, um dos 5 genes do *operon* da aerobactina, codifica uma proteína da membrana externa envolvida na ligação de alta afinidade ao Fe^{3+} (Escolar, Perez-Martin *et al.*, 2000). Embora os genes que codificam proteínas do sistema de aquisição de ferro, assim como *iutA*, sejam considerados fatores de virulência e estejam presentes em várias linhagens patogênicas de *E. coli* (revisado por Ratledge e Dover, 2000), é importante ressaltar que um fator de virulência só pode ser definido no contexto de outros elementos utilizados pela bactéria no processo infeccioso. Desta maneira, a presença de um único fator de virulência raramente torna uma linhagem virulenta, e somente a combinação de fatores de virulência determinará a capacidade de uma linhagem em provocar uma doença. Ainda, em muitos casos, um fator determinante não é somente a presença ou ausência do gene relacionado à virulência, mas seu nível de expressão, que pode variar entre linhagens patogênicas e não-patogênicas (Mokady, Gophna *et al.*, 2005).

Apesar de inúmeros estudos demonstrarem o modo de atuação dos receptores de sideróforos-Fe, como o receptor de aerobactina, nenhuma menção tem sido feita quanto à dependência de interação proteína-carboidrato nesse sistema. Apesar da glicosilação de proteínas ser escassa em bactérias, outros glicoconjugados são abundantes (Varki, Cummings *et al.*, 2008), e isso poderia de alguma forma ser um modo de sinalização tipo proteína-carboidrato análogo ao que ocorre em sistemas de organismos de complexidade maior. Além disso, sideróforos glicosilados têm sido encontrados, como as salmoquelinas, muito embora não se conheça completamente o porquê dessa modificação desses sideróforos (Hantke, Nicholson *et al.*, 2003; Fischbach, Lin *et al.*, 2006). A obtenção de correspondência entre a proteína de 75kDa ligante de Sepharose e proteínas do sistema de captação de ferro de *E. coli* abre perspectivas interessantes de estudo da participação de lectinas nesse processo.

Além desta provável atividade lectínica, nós demonstramos, através dos experimentos *in vitro* com culturas de células, que IutA recombinante de *E. coli* comensal pode ser uma proteína multifuncional, uma vez que funciona como um mitógeno de células B. O padrão cinético das respostas proliferativas das células do baço induzidas por IutA se assemelha àquele das respostas secundárias antígeno específicas, entretanto, IutA induziu respostas proliferativas proeminentes em células retiradas do baço de animais *naïve*. A análise das células respondedoras revelou que IutA induziu a proliferação de células B, mas não de células T. Os efeitos de moléculas protéicas, derivadas de bactérias, em células B foram previamente demonstrados por vários estudos. Watanabe *et al.* (1996), por exemplo, demonstraram a estimulação de células B por uma proteína de 75kDa da superfície celular de *Porphyromonas gingivalis*, uma bactéria que contribui com o desenvolvimento da doença periodontal. Esta proteína se mostrou um potente ativador policlonal de células B do baço de camundongos BALB/c e também de animais C3H/HeJ, deficientes na sinalização por TLR4.

Após os resultados iniciais, aventamos a possibilidade da proliferação das células B ser provocada pela contaminação por LPS durante o processo de obtenção da proteína recombinante. Para testarmos essa possibilidade, realizamos um teste com diferentes concentrações de polimixina B, um antibiótico que inibe a atividade estimuladora do LPS, e observamos que uma alta concentração de LPS (25µg/mL ou 250.000 UE – unidades de endotoxina) tem sua atividade estimuladora quase que totalmente inibida por 30µg/mL deste antibiótico. Notamos também que mesmo na presença da mais alta concentração de polimixina B, IutA recombinante ainda estimulou a proliferação das células B. Assim, utilizamos o antibiótico polimixina B, em todos os poços das culturas de células estimuladas com IutA recombinante, a qual foi previamente passada em coluna de polimixina B imobilizada em agarose. Ainda, para corroborar estes dados, utilizamos células provenientes de animais deficientes na sinalização por TLR4 (C3H/HeJ), receptor ao qual se liga o LPS e

promove a sinalização intracelular que entre outras atividades imunoestimuladoras, leva à proliferação celular e liberação de citocinas. As células destes animais C3H/HeJ são hiporresponsivas ao LPS devido a uma mutação pontual no gene que codifica TLR4, onde há a substituição de uma prolina por uma histidina no domínio TIR, impedindo TLR4 de sinalizar (Poltorak, He *et al.*, 1998; Qureshi, Lariviere *et al.*, 1999). O uso de células do baço destes animais e de seu *background* selvagem, C3H/HePas, comprovaram os resultados obtidos com polimixina B, sugerindo que a proteína recombinante é a responsável pelo estímulo proliferativo gerado nas células B, e não a possível contaminação da amostra com LPS. Estes ensaios são passos iniciais de extrema importância na pesquisa com proteínas recombinantes já que existem diversos exemplos na literatura que demonstram como contaminantes, por exemplo, o LPS, podem levar a conclusões errôneas sobre as atividades destas proteínas. Em 2003, um trabalho publicado por Gao e Tsan revelou que a proteína recombinante humana Hsp70 não possui a capacidade em induzir a produção de TNF- α em macrófagos murinos, porém esta atividade é inteiramente atribuída à presença do LPS contaminante na amostra.

Com o conhecimento de que a proliferação das células B não é totalmente resultante da atividade do LPS (embora não possamos descartar que parte desta porcentagem de proliferação possa ser devida à presença de LPS na amostra), nosso intuito foi analisar se esta proliferação era dependente da presença de outras células, principalmente das células T. Para isso foram realizados dois ensaios com células isoladas. O primeiro foi feito para células B convencionais (CD43-), utilizando-se a separação por esferas magnéticas, e o segundo feito com a cultura de células B-1b, seguindo o protocolo descrito por Almeida *et al.* (2001). Os resultados destes ensaios mostraram que não houve proliferação significativa destas células quando estimuladas com IutA. Uma possível explicação para esta falta de proliferação seria a ausência de outras células em cultura. Muitos ativadores policlonais descritos na literatura

(revisado por Reina-San-Martin *et al.*, 2000) induzem a proliferação de células B sem requerer a participação de células T, no entanto, esta ação pode ser modulada por células acessórias como os macrófagos ou as células dendríticas (CDs). Por exemplo, CDs e macrófagos podem ser estimulados via TLRs, por bactérias intactas ou componentes da parede celular bacteriana, a secretarem citocinas estimuladoras de células B, como IL-4 e IL-6 (Riva, Nolli *et al.*, 1996; Aiba e Tagami, 1998). Desse modo, não podemos descartar a participação de outras células na indução da proliferação das células B.

Pelos resultados obtidos até esta etapa, nosso próximo passo foi investigar se as diferentes subpopulações de células B proliferariam sob estímulo com IutA. O experimento inicial foi feito pela separação das células B convencionais (CD43-) do restante das células, entre elas as células B-1 (CD43+). Com base nos resultados deste ensaio, levantamos então a hipótese de IutA promover a proliferação principalmente de células B-1. Assim, foram utilizadas células totais dos baços de animais deficientes em células B-1 (CD19+CD11b+), os animais BALB/Xid. Observamos através dos resultados que os linfócitos B convencionais (CD19+CD11b-) destes animais não proliferaram frente ao estímulo com a proteína recombinante. Um fato interessante a ser destacado é que os linfócitos B convencionais (B-2), dos animais BALB/Xid, estavam na presença das demais células do baço, como as células T, células dendríticas e macrófagos, entretanto não houve uma proliferação significativa desta subpopulação. Contrariamente, as subpopulações de células B dos animais BALB/c, tanto CD19+CD11b- quanto CD19+CD11b+, ambas na presença das demais células do baço, proliferaram na presença de IutA. Uma provável explicação deste resultado seria a ausência de proliferação das células B de BALB/Xid devido à deficiente sinalização pela mutação na tirosina quinase de Bruton (Btk – do inglês *Bruton's tyrosine kinase*). Estes animais BALB/Xid têm uma mutação pontual com a substituição da arginina 28 por uma cisteína (R28C) no domínio homólogo à plecstrina (PH) de Btk e apresentam defeitos no

desenvolvimento das células B, com uma redução em 50% das células B maduras, uma ausência virtual da subpopulação B-1, e uma diminuição pronunciada nos níveis séricos de IgM e IgG3 (Satterthwaite e Witte, 2000). Btk (do inglês *Bruton's tyrosine kinase*) pertence à família Tec das tirosinas quinases. A importância de Btk na função das células B foi revelada com a descoberta de que mutações em Btk causam imunodeficiências adquiridas no homem (XLA – agamaglobulinemia ligada ao X) e em camundongos (*xid*) (Lindvall, Blomberg *et al.*, 2005).

Tendo em vista que IutA recombinante induz a proliferação das células B-1 (CD19+CD11b+), examinamos a capacidade de células B-1b, isoladas da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, em proliferar na presença deste estímulo protéico. De modo bastante interessante e inesperado, estas células não exibiram uma proliferação significativa, e isso pode ser atribuído a dois motivos. O primeiro, já discutido anteriormente, pode ser devido à ausência de fatores estimuladores liberados por outras células, como macrófagos e células dendríticas. E um segundo motivo, talvez mais plausível, pode ser o fato da subpopulação B-1b, proveniente da cultura de células peritoneais aderentes de camundongos, ter se transformado/diferenciado em um tipo de fagócito mononuclear não relacionado ao macrófago derivado de monócito (Almeida, Aroeira *et al.*, 2001).

Considerando que as células que respondem à estimulação por IutA são principalmente as células B-1, nós então focamos na análise do receptor e da via de sinalização que são utilizados por esta proteína para induzir a proliferação. Inicialmente foi analisada a via dos TLRs devido ao fato destes serem receptores para muitos componentes bacterianos, como o LPS, as lipoproteínas, flagelina e peptidoglicanos, e estarem relacionados à primeira linha de contato/detecção destes microorganismos. A análise feita com células provenientes dos animais MyD88^{-/-} revelou que esta molécula adaptadora está envolvida na sinalização estimulada por IutA que resulta na proliferação das células B. Desta maneira, a proliferação

destas células deficientes de MyD88 foi abolida. Embora a sinalização da maioria dos TLRs seja dependente de MyD88, alguns destes receptores podem sinalizar via outras moléculas adaptadoras. Um caminho independente de MyD88 descrito é a sinalização via TRIF (do inglês *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon- β*), molécula conhecida por controlar a via MyD88-independente induzida por TLR4, e também ser a única molécula adaptadora usada por TLR3 (Yamamoto, Sato *et al.*, 2002). Com base neste conhecimento, podemos excluir a indução de proliferação pela ligação de IutA ao TLR3, por este ser o único receptor que não sinaliza via MyD88.

Como MyD88 é o adaptador universal dos demais TLRs, além de membro da subfamília dos receptores de IL-1, que, assim como os TLRs, sinalizam via o domínio TIR (Medzhitov, Preston-Hurlburt *et al.*, 1998), nós examinamos então o receptor ao qual IutA se ligaria. Avaliamos a proliferação de células B em animais deficientes em TLR4 (C3H/HeJ) e TLR2 (TLR2^{-/-}). As células B, mesmo na ausência de sinalização por estes dois TLRs, proliferaram de maneira significativa mediante o estímulo com IutA. Outro ponto importante a ser lembrado é que uma variedade de componentes bacterianos e fúngicos são detectados por TLR2 sozinho ou em associação aos TLR1 ou TLR6. Estes últimos funcionam como correceptores para TLR2 formando os heterodímeros TLR2/1 ou TLR2/6, e esta característica exclusiva de TLR2 aparentemente constitui um mecanismo evolutivo para aumentar o espectro de detecção de agonistas para TLR2 (Kirschning e Schumann, 2002). Desta maneira, dado que a detecção via TLR1 ou TLR6 somente ocorre na associação destes ao TLR2, e que as células B de animais deficientes para TLR2 proliferaram, sugerimos então que IutA não sinalize via TLR1, TLR2, TLR4 e TLR6.

Em contraste com as células B humanas *naïve*, que expressam baixos ou indetectáveis níveis de TLRs, ambas as células B *naïve* e de memória de camundongo expressam vários níveis de todos os TLRs. Muitos ligantes dos TLRs, como o LPS (TLR4), CpG (TLR9), R848

(TLR7), Pam3CSK4 (TLR1/2) e MALP2 (TLR2/6), são capazes de induzir a proliferação de células B murinas, e a produção de citocinas e imunoglobulinas (Bernasconi, Onai *et al.*, 2003; Genestier, Taillardet *et al.*, 2007). Em seu trabalho, Bernasconi *et al.* demonstram que todos os agonistas dos TLRs comumente utilizados, com exceção da flagelina (TLR5) e do poly(I:C) (TLR3), estimulam a proliferação de células B de camundongos qualquer que seja a subpopulação de células B considerada. Com base nestes trabalhos, podemos assim excluir a participação de TLR5 na proliferação induzida por IutA recombinante.

Os TLRs que reconhecem ácidos nucléicos bacterianos e virais são encontrados no interior do compartimento endossomal (Akira e Takeda, 2004; Iwasaki e Medzhitov, 2004) e parecem trafegar entre endossomos e lisossomos (Kox, Volk *et al.*, 2000; Ahmad-Nejad, Hacker *et al.*, 2002). Quando o tráfego e/ou a acidificação é interrompida por cloroquina ou bafilomicina A1, a sinalização por estes TLRs é inibida (Ahmad-Nejad, Hacker *et al.*, 2002; Lee, Chuang *et al.*, 2003; Matsumoto, Funami *et al.*, 2003; Rutz, Metzger *et al.*, 2004). A natureza lipofílica da cloroquina permite que ela difunda livremente através das membranas na sua forma não protonada, porém ao atingir ambientes intracelulares ácidos, como o compartimento endossomal, a cloroquina se torna protonada e então provoca o aumento do pH intravacuolar (Harrison, Griffin *et al.*, 2000). Baseado neste conhecimento, utilizamos a cloroquina como droga inibitória para analisar o envolvimento dos TLRs endossômicos, que sinalizam por vias dependentes de MyD88 (TLRs 7, 8 e 9), na proliferação induzida por IutA. Os resultados demonstram que a proteína IutA não é detectada por nenhum destes TLRs, pois não houve uma diminuição pronunciada na proliferação de nenhuma das populações de células B avaliada quando tratadas com 5 ou 10 μ M de cloroquina.

Em conjunto, todos os resultados dos ensaios com células de animais deficientes em TLR2 e TLR4, e também da inibição dos TLRs endossômicos demonstram que o reconhecimento do receptor de aerobactina férrica de *E. coli* não ocorre através destes TLRs

analisados. Provavelmente esta proteína se liga a um dos TLRs ainda não muito bem descritos, como o TLR11, ou ao receptor de IL-1 (IL-1R) ou de IL-18 (IL-18R), visto que estes receptores sinalizam por uma via dependente de MyD88 (Akira e Takeda, 2004; O'Neill e Bowie, 2007). O TLR11 está envolvido no reconhecimento da molécula semelhante à profilina do parasita *Toxoplasma gondii* e também de proteínas de *Escherichia coli* uropatogênia (UPEC) (Yarovinsky e Sher, 2006). Ainda são necessários experimentos mais específicos para encontrar a molécula que reconhece IutA.

Relatos na literatura que indicam que a indução de proliferação de células B-1 via TLR é dependente da molécula Btk são extremamente escassos. Embora o papel de Btk esteja bem caracterizado na sinalização e desenvolvimento de células B, algumas evidências na literatura sugerem que Btk esteja envolvida na sinalização via TLR3, 4, 8 e 9. Experimentos de imunoprecipitação demonstraram a interação física entre Btk e TLR4, TLR8 e também com a molécula adaptadora MyD88 (Lindvall, Blomberg *et al.*, 2005). Experimentos com macrófagos murinos evidenciaram a participação de Btk na sinalização via TLR3 e TLR9 (Schmidt, Thieu *et al.*, 2006) e, mais recentemente, estudos com a linhagem celular monocítica THP1 mostraram a participação de Btk na sinalização via TLR8, além destes estudos corroborarem os dados relatados anteriormente para TLR9 (Doyle, Jefferies *et al.*, 2007). Lee *et al.* (2008) relatam que até o momento não está totalmente claro se Btk é também ativada pelos vários outros TLRs e se esta molécula está realmente envolvida na sinalização de células B via TLR, apesar de saber-se do papel fundamental de Btk na sinalização via receptor de células B (BCR).

Poderia ser levantada a hipótese do receptor de aerobactina estimular a proliferação das células B através da ligação ao BCR, porém já foi demonstrado que a ligação cruzada de moléculas ao BCR das células B-1, diferentemente do que ocorre com as células B-2, induz a apoptose destas células ao invés de ativá-las (Bikah, Carey *et al.*, 1996).

Em conjunto, nossos resultados e os dados expostos na literatura nos permitem sugerir que a indução da proliferação de células B-1 ocorra via um TLR, que não os TLR1 ao TLR9, com a participação das moléculas MyD88 e Btk na sinalização intracelular.

Com a descoberta da proliferação de células B-1 do baço induzida por IutA, avaliamos então se a mesma situação ocorreria no linfonodo mesentérico (LNM). Este linfonodo foi testado por se tratar de um compartimento localizado próximo ao principal sítio de residência das células B-1, a cavidade peritoneal (revisado por Elphick, Wieseler-Frank *et al.*, 2003), além de existirem evidências de que após exposição antigênica, as células B-1 desta cavidade migram para o LNM talvez para ajudar na resposta ao antígeno (Fagarasan e Honjo, 2000). Ainda, o LNM é uma importante estrutura do sistema imunológico intestinal e um órgão de localização próxima ao habitat das bactérias comensais. Nossos resultados mostram, de forma bastante interessante, que há proliferação somente das células B-1 (CD19+CD11b+) neste órgão. Assim, poderíamos aventar a hipótese de um mecanismo de interação entre o receptor de aerobactina férrica e as células B-1 da região intestinal. Componentes bacterianos, como IutA, presentes no lúmen intestinal poderiam ganhar acesso aos MALTs, regiões ricas em células B, via células M (Brandtzaeg e Pabst, 2004). As células B presentes nestes locais (de todas as subpopulações) entrariam em contato com esta proteína que seria então detectada por um TLR. A ativação do TLR levaria a proliferação e ativação destas células B-1. Com a ativação das células B-1 ocorreria a troca de classes de imunoglobulina e estas células migrariam para a lâmina própria e se diferenciariam em plasmócitos secretores de IgA, o que auxiliaria na manutenção da homeostase intestinal (Kroese, Butcher *et al.*, 1989; Kroese, Ammerlaan *et al.*, 1993; Kroese, Cebra *et al.*, 1995).

Um provável significado biológico desta proteína para microorganismo, já que a mesma é expressa também em linhagens patogênicas de *E. coli*, seria a indução da proliferação policlonal das células B como uma estratégia para evitar a resposta imune

específica gerada pelo hospedeiro. Isso poderia ocorrer como um resultado da ativação das células B-1, que em camundongos são uma importante fonte de anticorpos naturais e polirreativos (revisado por Montes, Acosta-Rodriguez et al., 2007).

Acreditamos que o conhecimento a respeito do papel do receptor de aerobactina e de outros componentes bacterianos, esclarecendo os mecanismos de ação dos mesmos, servirá de base para um melhor entendimento da relação entre as bactérias comensais e o sistema imunológico intestinal, e também para o desenvolvimento de estratégias de intervenção para o controle das linhagens patogênicas causadoras de doenças humanas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agace, W. W., A. Amara, *et al.* Constitutive expression of stromal derived factor-1 by mucosal epithelia and its role in HIV transmission and propagation. Curr Biol, v.10, n.6, Mar 23, p.325-8. 2000.

Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, *et al.* Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. Eur J Immunol, v.32, n.7, Jul, p.1958-68. 2002.

Aiba, S. e H. Tagami. Dendritic cell activation induced by various stimuli, e.g. exposure to microorganisms, their products, cytokines, and simple chemicals as well as adhesion to extracellular matrix. J Dermatol Sci, v.20, n.1, May, p.1-13. 1998.

Aikawa, J. e J. D. Esko. Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family. J Biol Chem, v.274, n.5, Jan 29, p.2690-5. 1999.

Akashi, S., Y. Nagai, *et al.* Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor 4 species-specific lipopolysaccharide recognition. Int Immunol, v.13, n.12, Dec, p.1595-9. 2001.

Akira, S. e K. Takeda. Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, v.4, n.7, Jul, p.499-511. 2004.

Alexopoulou, L., A. C. Holt, *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, v.413, n.6857, Oct 18, p.732-8. 2001.

Almeida, S. R., L. S. Aroeira, *et al.* Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. Int Immunol, v.13, n.9, Sep, p.1193-201. 2001.

Andrews, S. C., A. K. Robinson, *et al.* Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol Rev, v.27, n.2-3, Jun, p.215-37. 2003.

Aronson, M., O. Medalia, *et al.* Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. J Infect Dis, v.139, n.3, Mar, p.329-32. 1979.

Avrameas, S. e T. Ternynck. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. Res Immunol, v.146, n.4-5, May-Jun, p.235-48. 1995.

Barton, G. M. e R. Medzhitov. Toll-like receptor signaling pathways. Science, v.300, n.5625, Jun 6, p.1524-5. 2003.

Baumgarth, N., J. W. Tung, *et al.* Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. Springer Semin Immunopathol, v.26, n.4, Mar, p.347-62. 2005.

Berberich, S., R. Forster, *et al.* The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine. Blood, v.109, n.11, Jun 1, p.4627-34. 2007.

- Bernasconi, N. L., N. Onai, *et al.* A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. Blood, v.101, n.11, Jun 1, p.4500-4. 2003.
- Bikah, G., J. Carey, *et al.* CD5-mediated negative regulation of antigen receptor-induced growth signals in B-1 B cells. Science, v.274, n.5294, Dec 13, p.1906-9. 1996.
- Blum, H., H. Beier, *et al.* Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, v.8, n.2, p.93-99. 1987.
- Bouchet, A., M. A. Valvano, *et al.* Immunological variants of the aerobactin-cloacin DF13 outer membrane protein receptor IutA among enteric bacteria. Infect Immun, v.62, n.7, Jul, p.3017-21. 1994.
- Bowman, E. P., N. A. Kuklin, *et al.* The intestinal chemokine thymus-expressed chemokine (CCL25) attracts IgA antibody-secreting cells. J Exp Med, v.195, n.2, Jan 21, p.269-75. 2002.
- Brandtzaeg, P. e F. E. Johansen. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. Immunol Rev, v.206, Aug, p.32-63. 2005.
- Brandtzaeg, P., H. Kiyono, *et al.* Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. Mucosal Immunol, v.1, n.1, Jan, p.31-7. 2008.
- Brandtzaeg, P. e R. Pabst. Let's go mucosal: communication on slippery ground. Trends Immunol, v.25, n.11, Nov, p.570-7. 2004.
- Buchanan, S. K., B. S. Smith, *et al.* Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from Escherichia coli. Nat Struct Biol, v.6, n.1, Jan, p.56-63. 1999.
- Buts, L., J. Bouckaert, *et al.* The fimbrial adhesin F17-G of enterotoxigenic Escherichia coli has an immunoglobulin-like lectin domain that binds N-acetylglucosamine. Mol Microbiol, v.49, n.3, Aug, p.705-15. 2003.
- Cariappa, A., H. C. Liou, *et al.* Nuclear factor kappa B is required for the development of marginal zone B lymphocytes. J Exp Med, v.192, n.8, Oct 16, p.1175-82. 2000.
- Cerutti, A. Location, location, location: B-cell differentiation in the gut lamina propria. Mucosal Immunol, v.1, n.1, Jan, p.8-10. 2008.
- Ciacchi-Woolwine, F., I. C. Blomfield, *et al.* Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. Infect Immun, v.66, n.3, Mar, p.1127-34. 1998.
- Coban, C., K. J. Ishii, *et al.* Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. J Exp Med, v.201, n.1, Jan 3, p.19-25. 2005.
- Coelho-Castelo, A. A., A. Panunto-Castelo, *et al.* Sm60, a mannose-binding protein from Schistosoma mansoni with inflammatory property. Int J Parasitol, v.32, n.14, Dec 19, p.1747-54. 2002.

Coelho-Castelo, A. A. M. Sm60: uma proteína multifuncional de Schistosoma mansoni com propriedade lectínica. Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000. 131 p.

Connell, I., W. Agace, *et al.* Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.18, Sep 3, p.9827-32. 1996.

Crosa, J. H. e C. T. Walsh. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev, v.66, n.2, Jun, p.223-49. 2002.

Cuiv, P. O., P. Clarke, *et al.* Identification and characterization of an iron-regulated gene, *chtA*, required for the utilization of the xenosiderophores aerobactin, rhizobactin 1021 and schizokinen by Pseudomonas aeruginosa. Microbiology, v.152, n.Pt 4, Apr, p.945-54. 2006.

Cyster, J. G. Homing of antibody secreting cells. Immunol Rev, v.194, Aug, p.48-60. 2003.

De Bouteiller, O., E. Merck, *et al.* Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. J Biol Chem, v.280, n.46, Nov 18, p.38133-45. 2005.

De Lorenzo, B. H., R. R. Brito, *et al.* Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. Immunol Lett, v.114, n.2, Dec 15, p.110-8. 2007.

De Lorenzo, V., A. Bindereif, *et al.* Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in Escherichia coli K-12. J Bacteriol, v.165, n.2, Feb, p.570-8. 1986.

Dho, M. e J. P. Lafont. Adhesive properties and iron uptake ability in Escherichia coli lethal and nonlethal for chicks. Avian Dis, v.28, n.4, Oct-Dec, p.1016-25. 1984.

Diebold, S. S., T. Kaisho, *et al.* Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. Science, v.303, n.5663, Mar 5, p.1529-31. 2004.

Doherty, C. P., L. T. Weaver, *et al.* Micronutrient supplementation and infection: a double-edged sword? J Pediatr Gastroenterol Nutr, v.34, n.4, Apr, p.346-52. 2002.

Doyle, S. L., C. A. Jefferies, *et al.* Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. J Biol Chem, v.282, n.51, Dec 21, p.36953-60. 2007.

Elphick, G. F., J. Wieseler-Frank, *et al.* B-1 cell (CD5+/CD11b+) numbers and nIgM levels are elevated in physically active vs. sedentary rats. J Appl Physiol, v.95, n.1, Jul, p.199-206. 2003.

Escolar, L., J. Perez-Martin, *et al.* Evidence of an unusually long operator for the fur repressor in the aerobactin promoter of Escherichia coli. J Biol Chem, v.275, n.32, Aug 11, p.24709-14. 2000.

Fagarasan, S. e T. Honjo. T-Independent immune response: new aspects of B cell biology. Science, v.290, n.5489, Oct 6, p.89-92. 2000.

_____. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. Nat Rev Immunol, v.3, n.1, Jan, p.63-72. 2003.

Fagarasan, S., K. Kinoshita, *et al.* In situ class switching and differentiation to IgA-producing cells in the gut lamina propria. Nature, v.413, n.6856, Oct 11, p.639-43. 2001.

Fagarasan, S., N. Watanabe, *et al.* Generation, expansion, migration and activation of mouse B1 cells. Immunol Rev, v.176, Aug, p.205-15. 2000.

Ferguson, A. D., R. Chakraborty, *et al.* Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. Science, v.295, n.5560, Mar 1, p.1715-9. 2002.

Ferguson, A. D., E. Hofmann, *et al.* Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. Science, v.282, n.5397, Dec 18, p.2215-20. 1998.

Fischbach, M. A., H. Lin, *et al.* How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. Nat Chem Biol, v.2, n.3, Mar, p.132-8. 2006.

Gao, B. e M. F. Tsan. Endotoxin contamination in recombinant human heat shock protein 70 (Hsp70) preparation is responsible for the induction of tumor necrosis factor alpha release by murine macrophages. J Biol Chem, v.278, n.1, Jan 3, p.174-9. 2003.

Gay, N. J. e M. Gangloff. Structure and function of Toll receptors and their ligands. Annu Rev Biochem, v.76, p.141-65. 2007.

Genestier, L., M. Taillardet, *et al.* TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses. J Immunol, v.178, n.12, Jun 15, p.7779-86. 2007.

Ghosn, E. E., Y. Yang, *et al.* CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.13, Apr 1, p.5195-200. 2008.

Gibbard, R. J., P. J. Morley, *et al.* Conserved features in the extracellular domain of human toll-like receptor 8 are essential for pH-dependent signaling. J Biol Chem, v.281, n.37, Sep 15, p.27503-11. 2006.

Guy-Grand, D., C. Griscelli, *et al.* The gut-associated lymphoid system: nature and properties of the large dividing cells. Eur J Immunol, v.4, n.6, Jun, p.435-43. 1974.

Ha, S. A., M. Tsuji, *et al.* Regulation of B1 cell migration by signals through Toll-like receptors. J Exp Med, v.203, n.11, Oct 30, p.2541-50. 2006.

Hamer, G. K., S. S. Bhattacharjee, *et al.* Analysis of the enzymic hydrolysis products of agarose by ¹³C-n.m.r. spectroscopy. Carboh Res, v.54, n.1, p.C7-C10. 1977.

Hantke, K. e V. Braun. Control of bacterial iron transport by regulatory proteins.: Chapman and Hall. 1997. 11–44 p. (Metal Ions in Gene Regulation)

_____. The art of keeping low and high iron concentrations in balance.: ASM Press. 2000. 275–288 p.

Hantke, K., G. Nicholson, *et al.* Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor *IroN*. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.7, Apr 1, p.3677-82. 2003.

Harrison, T. S., G. E. Griffin, *et al.* Conditional lethality of the diprotic weak bases chloroquine and quinacrine against *Cryptococcus neoformans*. J Infect Dis, v.182, n.1, Jul, p.283-9. 2000.

Hasan, U., C. Chaffois, *et al.* Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. J Immunol, v.174, n.5, Mar 1, p.2942-50. 2005.

Hastings, W. D., S. M. Gurdak, *et al.* CD5⁺/Mac-1⁻ peritoneal B cells: a novel B cell subset that exhibits characteristics of B-1 cells. Immunol Lett, v.105, n.1, May 15, p.90-6. 2006.

Hayashi, F., K. D. Smith, *et al.* The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature, v.410, n.6832, Apr 26, p.1099-103. 2001.

Heil, F., H. Hemmi, *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science, v.303, n.5663, Mar 5, p.1526-9. 2004.

Henderson, B., M. Wilson, *et al.* Cellular Microbiology: Bacteria-Host Interactions in Health and Disease: Wiley. 1999. 478 p.

Herzenberg, L. A. e J. W. Tung. B cell lineages: documented at last! Nat Immunol, v.7, n.3, Mar, p.225-6. 2006.

Higgs, P. I., P. S. Myers, *et al.* Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. J Bacteriol, v.180, n.22, Nov, p.6031-8. 1998.

Hooper, L. V., M. H. Wong, *et al.* Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. Science, v.291, n.5505, Feb 2, p.881-4. 2001.

Issekutz, A. C. Removal of gram-negative endotoxin from solutions by affinity chromatography. J Immunol Methods, v.61, n.3, Jul 29, p.275-81. 1983.

Itakura, A., M. Szczepanik, *et al.* An hour after immunization peritoneal B-1 cells are activated to migrate to lymphoid organs where within 1 day they produce IgM antibodies that initiate elicitation of contact sensitivity. J Immunol, v.175, n.11, Dec 1, p.7170-8. 2005.

Iwasaki, A. e R. Medzhitov. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol, v.5, n.10, Oct, p.987-95. 2004.

Janeway, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.54 Pt 1, p.1-13. 1989.

Johnson, J. R. Host-pathogen interactions in *Escherichia coli* urinary tract infection. Curr. Op. Infect. Dis., v.7, p.284-94. 1994.

- Kantor, A. B., A. M. Stall, *et al.* Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.8, Apr 15, p.3320-4. 1992.
- Kawai, T. e S. Akira. TLR signaling. Cell Death Differ, v.13, n.5, May, p.816-25. 2006.
- Kenny, B., A. Abe, *et al.* Enteropathogenic Escherichia coli protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. Infect Immun, v.65, n.7, Jul, p.2606-12. 1997.
- Kirschning, C. J. e R. R. Schumann. TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. Curr Top Microbiol Immunol, v.270, p.121-44. 2002.
- Kleinschmidt, J. H. Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of Escherichia coli. Cell Mol Life Sci, v.60, n.8, Aug, p.1547-58. 2003.
- Koga, T., T. Nishihara, *et al.* Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from Bacteroides gingivalis and comparison with LPS from Escherichia coli. Infect Immun, v.47, n.3, Mar, p.638-47. 1985.
- Kox, W. J., T. Volk, *et al.* Immunomodulatory therapies in sepsis. Intensive Care Med, v.26 Suppl 1, p.S124-8. 2000.
- Kroese, F. G., W. A. Ammerlaan, *et al.* Evidence that intestinal IgA plasma cells in mu, kappa transgenic mice are derived from B-1 (Ly-1 B) cells. Int Immunol, v.5, n.10, Oct, p.1317-27. 1993.
- Kroese, F. G. e N. A. Bos. Peritoneal B-1 cells switch in vivo to IgA and these IgA antibodies can bind to bacteria of the normal intestinal microflora. Curr Top Microbiol Immunol, v.246, p.343-9; discussion 350. 1999.
- Kroese, F. G., E. C. Butcher, *et al.* Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. Int Immunol, v.1, n.1, p.75-84. 1989.
- Kroese, F. G. M., J. J. Cebra, *et al.* Contribution of B-1 cells to intestinal IgA production in the mouse. Methods, v.8, p.37. 1995.
- Krug, A., A. R. French, *et al.* TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. Immunity, v.21, n.1, Jul, p.107-19. 2004.
- Kucheria, R., P. Dasgupta, *et al.* Urinary tract infections: new insights into a common problem. Postgrad Med J, v.81, n.952, Feb, p.83-6. 2005.
- Kunkel, E. J., J. J. Campbell, *et al.* Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. J Exp Med, v.192, n.5, Sep 4, p.761-8. 2000.

- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.
- Larsen, R. A., M. G. Thomas, *et al.* Partial suppression of an Escherichia coli TonB transmembrane domain mutation (delta V17) by a missense mutation in ExbB. Mol Microbiol, v.13, n.4, Aug, p.627-40. 1994.
- Lee, H. K., J. Lee, *et al.* Two lipoproteins extracted from Escherichia coli K-12 LCD25 lipopolysaccharide are the major components responsible for Toll-like receptor 2-mediated signaling. J Immunol, v.168, n.8, Apr 15, p.4012-7. 2002.
- Lee, J., T. H. Chuang, *et al.* Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.11, May 27, p.6646-51. 2003.
- Lee, K. G., S. Xu, *et al.* Bruton's tyrosine kinase separately regulates NFkappaB p65RelA activation and cytokine interleukin (IL)-10/IL-12 production in TLR9-stimulated B Cells. J Biol Chem, v.283, n.17, Apr 25, p.11189-98. 2008.
- Lindvall, J. M., K. E. Blomberg, *et al.* Bruton's tyrosine kinase: cell biology, sequence conservation, mutation spectrum, siRNA modifications, and expression profiling. Immunol Rev, v.203, Feb, p.200-15. 2005.
- Lis, H. e N. Sharon. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. Chem Rev, v.98, n.2, Apr 2, p.637-674. 1998.
- Macpherson, A. J. e N. L. Harris. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. Nat Rev Immunol, v.4, n.6, Jun, p.478-85. 2004.
- Marolda, C. L., M. A. Valvano, *et al.* Flanking and internal regions of chromosomal genes mediating aerobactin iron uptake systems in enteroinvasive Escherichia coli and Shigella flexneri. J Gen Microbiol, v.133, n.8, Aug, p.2269-78. 1987.
- Matsumoto, M., K. Funami, *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. J Immunol, v.171, n.6, Sep 15, p.3154-62. 2003.
- Mchugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, *et al.* Global iron-dependent gene regulation in Escherichia coli. A new mechanism for iron homeostasis. J Biol Chem, v.278, n.32, Aug 8, p.29478-86. 2003.
- Mcwilliams, M., J. M. Phillips-Quagliata, *et al.* Mesenteric lymph node B lymphoblasts which home to the small intestine are precommitted to IgA synthesis. J Exp Med, v.145, n.4, Apr 1, p.866-75. 1977.
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol, v.1, n.2, Nov, p.135-45. 2001.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. Mol Cell, v.2, n.2, Aug, p.253-8. 1998.

Mokady, D., U. Gophna, *et al.* Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. Int J Med Microbiol, v.295, n.6-7, Oct, p.455-62. 2005.

Montes, C. L., E. V. Acosta-Rodriguez, *et al.* Polyclonal B cell activation in infections: infectious agents' devilry or defense mechanism of the host? J Leukoc Biol, v.82, n.5, Nov, p.1027-32. 2007.

Morrison, D. C. e D. M. Jacobs. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. Immunochemistry, v.13, n.10, Oct, p.813-8. 1976.

Mouricout, M. Interactions between the enteric pathogen and the host. An assortment of bacterial lectins and a set of glycoconjugate receptors. Adv Exp Med Biol, v.412, p.109-23. 1997.

Mowat, A. M. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat Rev Immunol, v.3, n.4, Apr, p.331-41. 2003.

Nagai, Y., S. Akashi, *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. Nat Immunol, v.3, n.7, Jul, p.667-72. 2002.

Neilands, J. B. Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30). Can J Microbiol, v.38, n.7, Jul, p.728-33. 1992.

Neutra, M. R., N. J. Mantis, *et al.* Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. Nat Immunol, v.2, n.11, Nov, p.1004-9. 2001.

O'Neill, L. A. e A. G. Bowie. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, v.7, n.5, May, p.353-64. 2007.

Palsson-Mcdermott, E. M. e L. A. O'Neill. Building an immune system from nine domains. Biochem Soc Trans, v.35, n.Pt 6, Dec, p.1437-44. 2007.

Poltorak, A., X. He, *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. Science, v.282, n.5396, Dec 11, p.2085-8. 1998.

Popi, A. F., L. C. Godoy, *et al.* B-1 cells facilitate *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice via IL-10 secretion. Microbes Infect, v.10, n.7, Jun, p.817-24. 2008.

Posey, J. E. e F. C. Gherardini. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. Science, v.288, n.5471, Jun 2, p.1651-3. 2000.

Pridmore, R. D., B. Berger, *et al.* The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.8, Feb 24, p.2512-7. 2004.

Pron, B., C. Boumaila, *et al.* Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. Cell Microbiol, v.3, n.5, May, p.331-40. 2001.

- Qureshi, S. T., L. Lariviere, *et al.* Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). J Exp Med, v.189, n.4, Feb 15, p.615-25. 1999.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, *et al.* Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell, v.118, n.2, Jul 23, p.229-41. 2004.
- Ratledge, C. e L. G. Dover. Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev Microbiol, v.54, p.881-941. 2000.
- Raymond, K. N., E. A. Dertz, *et al.* Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.7, Apr 1, p.3584-8. 2003.
- Reina-San-Martin, B., A. Cosson, *et al.* Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. Parasitol Today, v.16, n.2, Feb, p.62-7. 2000.
- Rhee, K. J., P. Sethupathi, *et al.* Role of commensal bacteria in development of gut-associated lymphoid tissues and preimmune antibody repertoire. J Immunol, v.172, n.2, Jan 15, p.1118-24. 2004.
- Riva, S., M. L. Nolli, *et al.* Bacteria and bacterial cell wall constituents induce the production of regulatory cytokines in dendritic cell clones. J Inflamm, v.46, n.2, p.98-105. 1996.
- Roberts, M., K. G. Wooldridge, *et al.* Inhibition of biological activities of the aerobactin receptor protein in rough strains of Escherichia coli by polyclonal antiserum raised against native protein. J Gen Microbiol, v.135, n.9, Sep, p.2387-98. 1989.
- Rutz, M., J. Metzger, *et al.* Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. Eur J Immunol, v.34, n.9, Sep, p.2541-50. 2004.
- Satterthwaite, A. B. e O. N. Witte. The role of Bruton's tyrosine kinase in B-cell development and function: a genetic perspective. Immunol Rev, v.175, Jun, p.120-7. 2000.
- Sauer, F. G., M. A. Mulvey, *et al.* Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. Curr Opin Microbiol, v.3, n.1, Feb, p.65-72. 2000.
- Schell, M. A., M. Karmirantzou, *et al.* The genome sequence of Bifidobacterium longum reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.22, Oct 29, p.14422-7. 2002.
- Schmidt, N. W., V. T. Thieu, *et al.* Bruton's tyrosine kinase is required for TLR-induced IL-10 production. J Immunol, v.177, n.10, Nov 15, p.7203-10. 2006.
- Shapiro, L. The bacterial flagellum: from genetic network to complex architecture. Cell, v.80, n.4, Feb 24, p.525-7. 1995.
- Sharon, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. Biochim Biophys Acta, v.1760, n.4, Apr, p.527-37. 2006.
- Sharon, N. e H. Lis. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Glycobiology, v.14, n.11, Nov, p.53R-62R. 2004.

Shreedhar, V. K., B. L. Kelsall, *et al.* Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. Infect Immun, v.71, n.1, Jan, p.504-9. 2003.

Sonnenburg, J. L., J. Xu, *et al.* Glycan foraging in vivo by an intestine-adapted bacterial symbiont. Science, v.307, n.5717, Mar 25, p.1955-9. 2005.

Soto, G. E. e S. J. Hultgren. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. J Bacteriol, v.181, n.4, Feb, p.1059-71. 1999.

St Geme, J. W., 3rd. Bacterial adhesins: determinants of microbial colonization and pathogenicity. Adv Pediatr, v.44, p.43-72. 1997.

Steiner, T. S. How flagellin and toll-like receptor 5 contribute to enteric infection. Infect Immun, v.75, n.2, Feb, p.545-52. 2007.

Steiner, T. S., J. P. Nataro, *et al.* Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. J Clin Invest, v.105, n.12, Jun, p.1769-77. 2000.

Suzuki, K., S. A. Ha, *et al.* Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. Semin Immunol, v.19, n.2, Apr, p.127-35. 2007.

Sweeney, N. J., P. Klemm, *et al.* The *Escherichia coli* K-12 gntP gene allows *E. coli* F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. Infect Immun, v.64, n.9, Sep, p.3497-503. 1996.

Tachikawa, S., T. Kawamura, *et al.* Appearance of B220low autoantibody-producing B-1 cells at neonatal and older stages in mice. Clin Exp Immunol, v.153, n.3, Sep, p.448-55. 2008.

Takeda, K. e S. Akira. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol, v.17, n.1, Jan, p.1-14. 2005.

Takeuchi, O., T. Kawai, *et al.* Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. Int Immunol, v.13, n.7, Jul, p.933-40. 2001.

Takeuchi, O., S. Sato, *et al.* Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J Immunol, v.169, n.1, Jul 1, p.10-4. 2002.

Thiriot, A., A. M. Drapier, *et al.* The Bw cells, a novel B cell population conserved in the whole genus *Mus*. J Immunol, v.179, n.10, Nov 15, p.6568-78. 2007.

Tumang, J. R., W. D. Hastings, *et al.* Peritoneal and splenic B-1 cells are separable by phenotypic, functional, and transcriptomic characteristics. Eur J Immunol, v.34, n.8, Aug, p.2158-67. 2004.

- Van Der Heijden, P. J., W. Stok, *et al.* Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. Immunology, v.62, n.4, Dec, p.551-5. 1987.
- Varki, A., R. D. Cummings, *et al.* Essentials of Glycobiology. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2008. 784 p.
- Watanabe, K., H. Kumada, *et al.* The induction of polyclonal B-cell activation and interleukin-1 production by the 75-kDa cell surface protein from Porphyromonas gingivalis in mice. Arch Oral Biol, v.41, n.8-9, Aug-Sep, p.725-31. 1996.
- Weinberg, E. D. The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. Perspect Biol Med, v.40, n.4, Summer, p.578-83. 1997.
- Williams, P. H. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of Escherichia coli. Infect Immun, v.26, n.3, Dec, p.925-32. 1979.
- Williams, P. H., W. Rabsch, *et al.* Catecholase receptor proteins in Salmonella enterica: role in virulence and implications for vaccine development. Vaccine, v.24, n.18, May 1, p.3840-4. 2006.
- Won, W. J. e J. F. Kearney. CD9 is a unique marker for marginal zone B cells, B1 cells, and plasma cells in mice. J Immunol, v.168, n.11, Jun 1, p.5605-11. 2002.
- Wooldridge, K. G. e P. H. Williams. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev, v.12, n.4, Nov, p.325-48. 1993.
- Wyant, T. L., M. K. Tanner, *et al.* Potent immunoregulatory effects of Salmonella typhi flagella on antigenic stimulation of human peripheral blood mononuclear cells. Infect Immun, v.67, n.3, Mar, p.1338-46. 1999a.
- _____. Salmonella typhi flagella are potent inducers of proinflammatory cytokine secretion by human monocytes. Infect Immun, v.67, n.7, Jul, p.3619-24. 1999b.
- Xu, J., M. K. Bjursell, *et al.* A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. Science, v.299, n.5615, Mar 28, p.2074-6. 2003.
- Yamamoto, M., S. Sato, *et al.* Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. J Immunol, v.169, n.12, Dec 15, p.6668-72. 2002.
- Yarovinsky, F. e A. Sher. Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii. Int J Parasitol, v.36, n.3, Mar, p.255-9. 2006.
- Yarovinsky, F., D. Zhang, *et al.* TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. Science, v.308, n.5728, Jun 10, p.1626-9. 2005.
- Zhang, D., G. Zhang, *et al.* A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. Science, v.303, n.5663, Mar 5, p.1522-6. 2004.

7. ANEXO

7.1. Esquema de gates utilizado na citometria de fluxo

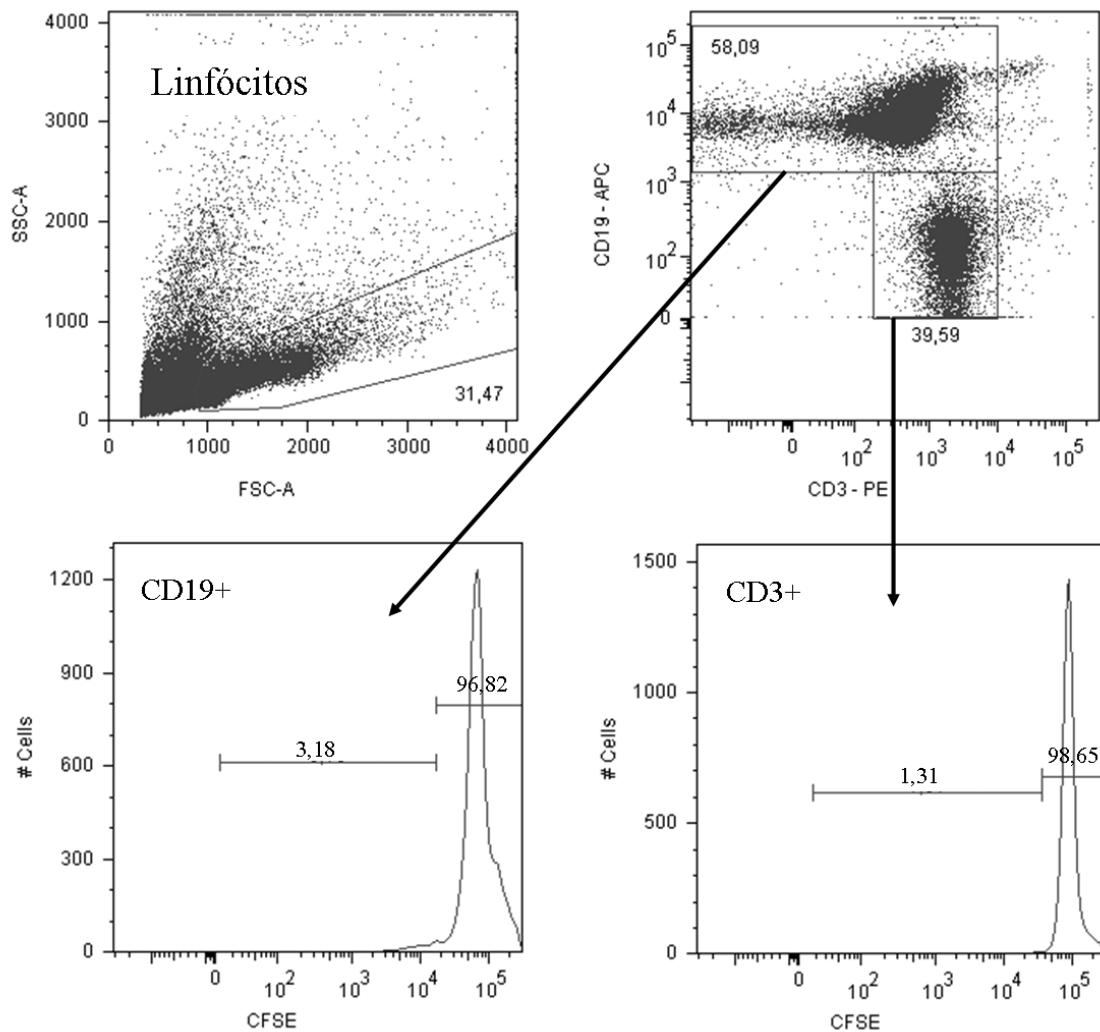


Figura I | Gráficos representativos da análise para determinar a proliferação de células T e B em células totais do baço cultivadas somente em meio de cultura. A região de linfócitos foi selecionada com base nos parâmetros (tamanho) FSC e (granularidade) SSC (painel superior esquerdo). Dentro desta região de linfócitos, a porcentagem de células CD3+ e CD19+ foi delimitada por duas *gates* com base na distribuição das populações no gráfico em *dot plot* (painel superior direito). Então, dentro destas regiões delimitadas, a porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma para as células B (CD19+ - painel inferior esquerdo) e para as células T (CD3+ - painel inferior direito).

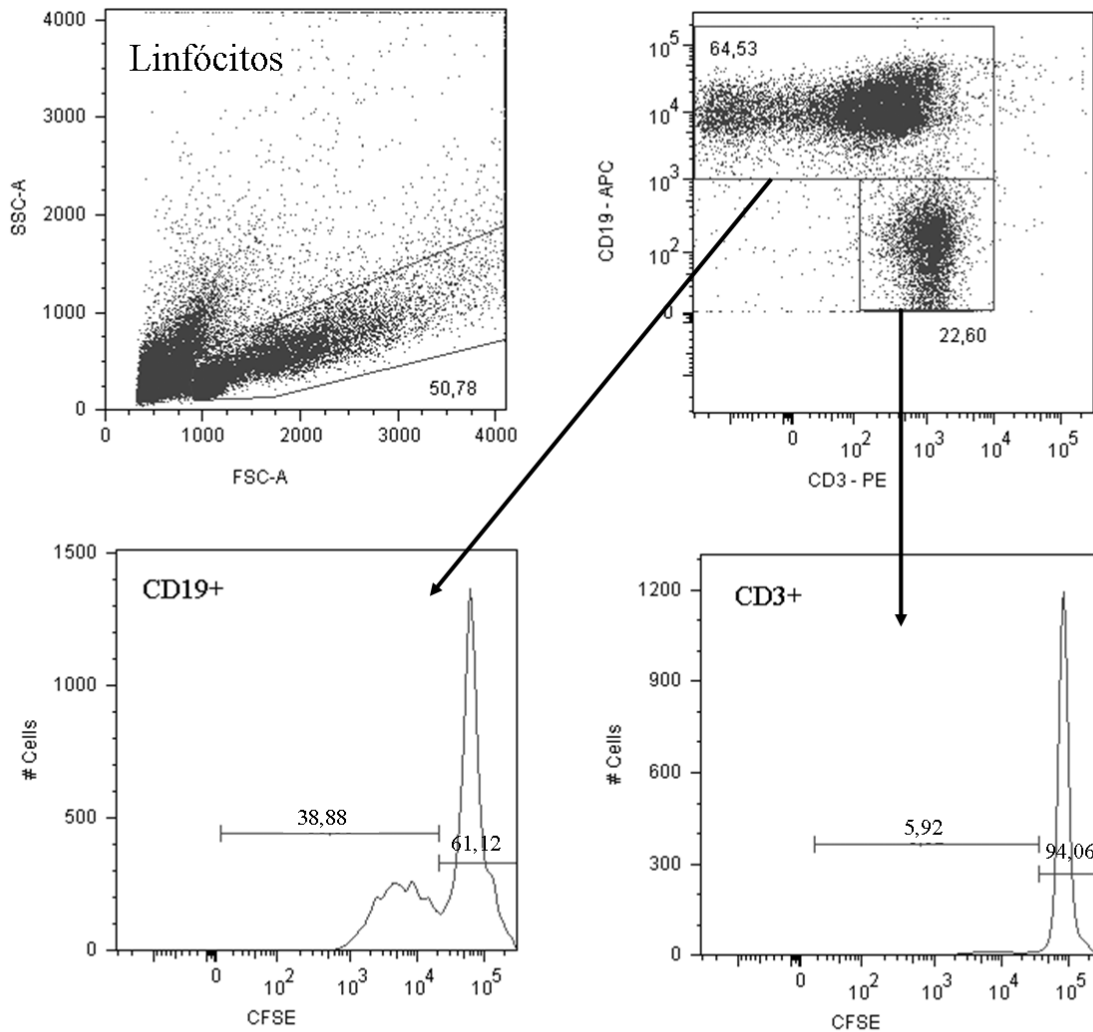


Figura II | Gráficos representativos da análise para determinar a proliferação de células T e B em células totais do baço cultivadas com o estímulo de 20µg/mL de IutA. A região de linfócitos foi selecionada com base nos parâmetros (tamanho) FSC e (granularidade) SSC (painel superior esquerdo). Dentro desta região de linfócitos, a porcentagem de células CD3+ e CD19+ foi delimitada por duas *gates* com base na distribuição das populações no gráfico em *dot plot* (painel superior direito). Então, dentro destas regiões delimitadas, a porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma para as células B (CD19+ - painel inferior esquerdo) e para as células T (CD3+ - painel inferior direito).

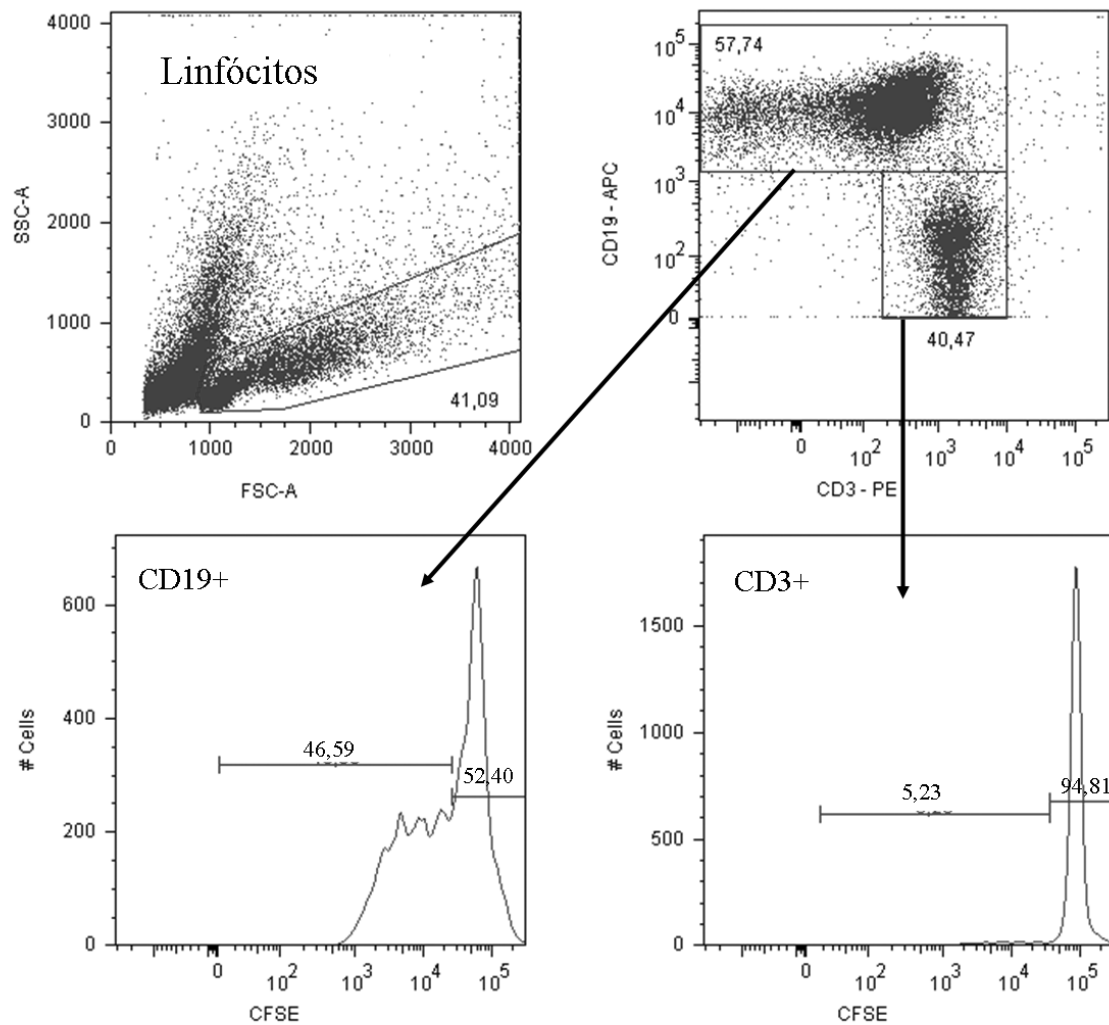


Figura III | Gráficos representativos da análise para determinar a proliferação de células T e B em células totais do baço cultivadas com o estímulo de 25µg/mL de LPS. A região de linfócitos foi selecionada com base nos parâmetros (tamanho) FSC e (granularidade) SSC (painel superior esquerdo). Dentro desta região de linfócitos, a porcentagem de células CD3+ e CD19+ foi delimitada por duas *gates* com base na distribuição das populações no gráfico em *dot plot* (painel superior direito). Então, dentro destas regiões delimitadas, a porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma para as células B (CD19+ - painel inferior esquerdo) e para as células T (CD3+ - painel inferior direito).

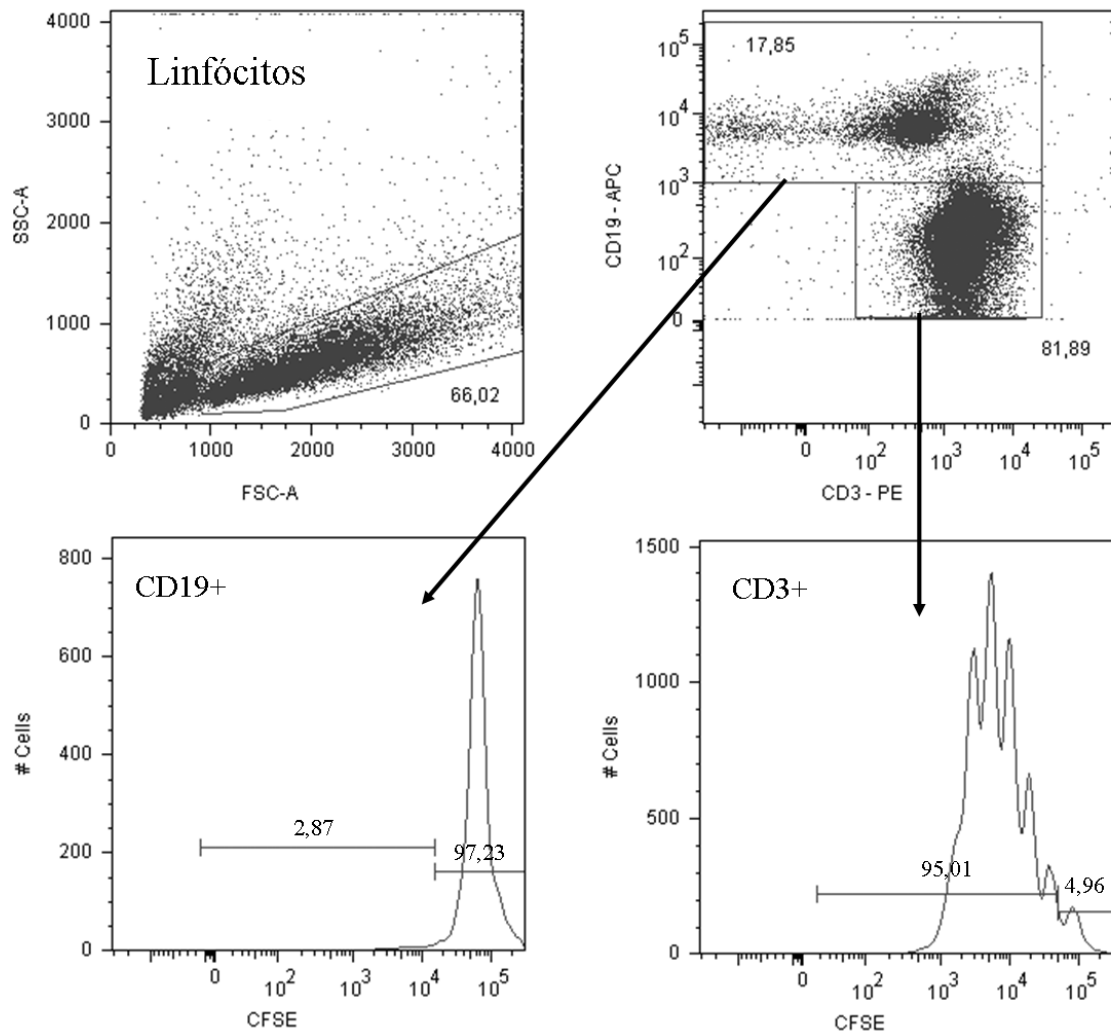


Figura IV | Gráficos representativos da análise para determinar a proliferação de células T e B em células totais do baço cultivadas com o estímulo de 10 μ g/mL de ConA. A região de linfócitos foi selecionada com base nos parâmetros (tamanho) FSC e (granularidade) SSC (painel superior esquerdo). Dentro desta região de linfócitos, a porcentagem de células CD3+ e CD19+ foi delimitada por duas *gates* com base na distribuição das populações no gráfico em *dot plot* (painel superior direito). Então, dentro destas regiões delimitadas, a porcentagem de células que proliferaram foi determinada por histograma para as células B (CD19+ - painel inferior esquerdo) e para as células T (CD3+ - painel inferior direito).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)