

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Biologia Celular

***REGULAÇÃO DA BIOLOGIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
HUMANAS POR *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA (UPEC)***

ELANE PRISCILA MACIEL

Brasília, DF

2017

***REGULAÇÃO DA BIOLOGIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS
HUMANAS POR Escherichia coli UROPATOGÊNICA (UPEC)***

ELANE PRISCILA MACIEL

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Microbiana.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cecília Beatriz Fiuza Favali

Brasília, DF

2017

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Elane Priscila Maciel

REGULAÇÃO DA BIOLOGIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS POR *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA (UPEC)

Universidade de Brasília

Programa de Pós Graduação em Biologia Microbiana

Data da defesa da dissertação

26 de maio de 2017

Banca Examinadora

Profa. Dr^a Cecília Beatriz Fiuza Favali - Universidade de Brasília

(Presidente)

Tatiana Karla Borges – Universidade de Brasília

(Membro Externo)

Beatriz Dolabela de Lima – Universidade de Brasília

(Membro Interno)

Tatiana Amabile de Campos– Universidade de Brasília

(Suplente)

*“Ninguém ignora tudo.
Ninguém sabe tudo. Todos
nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma
coisa. Por isso aprendemos
sempre.”*

Paulo Freire

A meu pai Maciel, que em vida me ensinou o valor dos pequenos prazeres da vida. E não mais aqui entre nós, me ensina com sua passagem, ainda mais coisas pequenas, como a simples falta de um abraço, mas que nos fazem valer a existência.

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao universo, por me permitir esta existência com tantas oportunidades de crescimento do meu espírito.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cecília Beatriz Fiuza Favali, que me aceitou, me orientou, e que mais importante ainda, não desistiu de mim em tantas adversidades.

À Dra. Sarah Falcão companheira de laboratório e peça fundamental na realização deste trabalho.

Ao financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Apoio e Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

Aos companheiros da madrugada e finais de semana no bloco da citometria, Daniela, Giulia e Lucas, com vocês, tudo foi mais divertido.

A todos os companheiros do laboratório LABIOGENE, Agenor, Agnelo (melhor pessoa...) e todos os demais.

À Fabiana por me ouvir chorar, fazer todos os meios que eu precisava e muito mais... Comer muito chocolate e por fim, me mostrar meios melhores de lidar com minhas emoções.

À professora Dra. Beatriz Dolabela por toda a parceria e paciência com as mil perguntas que faço toda vez que a vejo.

À professora Dra. Tatiana Amabile e Laura, por todos os ensinamentos e tamanha ajuda.

À minha família todinha... E meus irmãos, que são meus companheiros de jornada, que entenderam minha ausência e estão sempre dispostos a me aguentar...

À minha amiga Luciana, por toda parceria além deste.

Ao meu companheiro de vida, Leonardo, que deu até seu sangue por este projeto, mas que, principalmente, me deu apoio incondicional, pagou

todos os preços junto comigo, e me aguentou falar de assuntos que ele nem fazia ideia, mas que escutava para me acalantar. Amo-te.

À turma de Imunologia, Andréia, Gisele, Herdson, Hilda, Jéssica, Leandro, Luciana, Pedro, Shirley, Tâmara, Tamires e Tatiane, que até hoje me lembro da nossa luta e total cumplicidade.

São tantas as pessoas que eu gostaria de agradecer aqui, porém não caberiam... Então muito obrigada por todos aqueles que passaram pela minha vida e deixaram sementes de aprendizado...

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sítios de colonização das linhagens de <i>E. coli</i> patogênica	3
Figura 2 – Fatores de virulência de <i>E. coli</i> patogênica	4
Figura 3 – Marcadores de maturação de DCs	10
Figura 4 – Microscopia óptica de DCs controle negativo e infectadas com as cepas V27 e J96 de <i>E. coli</i>	28
Figura 5 – Figura representativa da estratégia de análise da expressão de moléculas de superfície	30
Figura 6 – Taxa de recuperação de UFC	31
Figura 7 – Expressão percentual de CD11c, CD1a e CD83 em DCs infectadas com <i>E. coli</i>	33
Figura 8 – Média de intensidade de fluorescência de CD11c, CD1a e CD83 em DCs infectadas com <i>E. coli</i>	34
Figura 9 – Expressão percentual de CD62L, CCR7 e CD209 na presença de <i>E. coli</i>	36
Figura 10 – Média de intensidade de fluorescência de CD62L, CCR7 e CD209 em DCs infectadas com <i>E. coli</i>	37
Figura 11 – Expressão percentual de moléculas co-estimuladoras HLA-DR, CD86, CD80, CD40 e CD274 em DCs infectadas por <i>E. coli</i>	40
Figura 12 – Média de intensidade de fluorescência de HLA-DR, CD86, CD80, CD40 e CD274 em DCs infectadas com <i>E. coli</i>	41
Figura 13 – Análise de morte celular em DCs 24 horas após infecção com <i>E. coli</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Célula apresentadora de antígenos

CCL19: *Chemokine (C-C motif) ligand 19*

CCL21: *Chemokine (C-C motif) ligand 21*

CCL3: *Chemokine (C-C motif) ligand 3*

CCL4: *Chemokine (C-C motif) ligand 4*

CCL5: *Chemokine (C-C motif) ligand 5*

CCR7: Receptor de quimiocina tipo 7

CD: *Cluster of differentiation*

cDCs: Células dendríticas convencionais

CLR: Receptor de lectina tipo C

CR1: Receptor do complemento tipo 1

CR3: Receptor do complemento tipo 3

CTL: Linfócito T citotóxico

DAMPs: Padrões moleculares associados ao perigo

DC: Célula dendrítica

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FOXP3: *Forkhead box P*

GM-CSF: Fator estimulador de colônias de macrófagos e monócitos

IFN tipo I: Interferon tipo I

IFN α : Interferon alfa

IFN γ : Interferon gama

IgM: Imunoglobulina M

IL -15: Inteleucina 15

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Inteleucina 12

IL-18: Interleucina 18

IL1 β : Interleucina 1 β
IL-2: Interleucina 2
IL-4: Interleucina 4
IL-6: Interleucina 6
imDCs: Células dendríticas imaturas
IP-10: Proteína de 10kD induzida por interferon
IRF3: Fator regulador de interferon tipo 3
IRF7: Fator regulador de interferon tipo 7
LBP: Proteína ligadora de LPS
LCs: Células de Langerhans
LPS: Lipopolissacarídeo
MAC-1: *Macrophage integrin*
MBL: Lectina ligadora de manose
MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade
MIP-1 α : Proteína inflamatória de macrófago tipo 1 α
MLNS: Nódulos linfáticos mesentéricos
moDCs – Células dendríticas derivadas de monócitos
MR: Receptor fucose-manose
MSR: Receptor de fagocitose em macrófago tipo scavenger
MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NALP3: *NLR family, pyrin domain containing 3*
NALP1: *NLR family, pyrin domain containing 1*
NALP2: *NLR family, pyrin domain containing 2*
NF κ B: Fator nuclear κ B
NK: *Natural killer*
NO: Óxido nítrico
NOD: *Nucleotide-binding oligomerization domain receptors*
ODM: Objetivos Desenvolvimento do Milênio
OMS: Organização Mundial de Saúde
ONU: Organização das Nações Unidas
OX40: Receptor da família de necrose tumoral
OX40L: Ligante de OX40

PAMPs: Padrões moleculares associados à patógenos

PBMC: Células mononucleares do sangue periférico

PBS: Salina Tamponada Fosfatada

pDCs: Células dendríticas plasmocitóides

PE: Ficoeritrina

PI: Iodeto de propídeo

PPRs: Receptores de reconhecimento padrão

RANTES: *Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*

RIG-I: *Retinoic acid-inducible gene 1*

SAP: Amilóide P sérico

SBF: Soro fetal bovino

T reg: Linfócitos T reguladores

TCLE: Termo de consentimento livre esclarecido

TGF- β : Fator de crescimento transformante β

Th1: Linfócito T auxiliar 1

Th17: Linfócito T auxiliar 17

Th2: Linfócito T auxiliar 2

TLR: Receptor tipo "Toll"

TNF- α : Fator de necrose tumoral α

TRIF: *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

TSLP: Linfopoiatina do estroma tímico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 <i>Escherichia coli</i> Uropatogênica	01
1.2 Fatores de virulência das UPECs	04
1.3 Células Dendríticas (DCs).....	07
1.4 Migração e maturação de DCs.....	09
1.5 Receptores das células dendríticas e apresentação de antígenos	12
1.6 Interação Patógeno Hospedeiro.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. HIPÓTESE	18
4. OBJETIVO	19
4.1 Objetivo Geral	19
4.2 Objetivos Específicos	19
5. METODOLOGIA	20
5.1 Desenho Experimental	20
5.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC).....	21
5.3 Obtenção de monócitos	21
5.4 Geração de células dendríticas a partir de monócitos.....	22
5.5 Cultura das bactérias UPECs.....	23
5.6 Infecção das DCs com as bactérias UPECs	23

5.7 Caracterização fenotípica das moléculas de superfície por citometria de fluxo	24
5.8 Detecção de morte celular em DCs	25
5.9 Quantificação da infecção das DCs por UPECs	25
5.10 Análise estatística	26
6. RESULTADOS	27
6.1 Caracterização morfológica das células dendríticas	27
6.2 Caracterização de DCs obtidas a partir de monócitos	29
6.3 Recuperação de colônias.....	31
6.4 Caracterização de moléculas de superfície de DCs após contato com <i>E. coli</i>	32
6.5 Perfil de expressão de moléculas relacionadas à fagocitose e migração celular	35
6.6 Perfil de moléculas co-estimulatórias e inibição de DCs	38
6.7 Detecção de morte celular	42
7. DISCUSSÃO	44
8 CONCLUSÃO	51
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
10. APÊNDICE	62
10.1 Autorização para fornecimento de hemocomponente para a indústria (FHB)	62

RESUMO

As infecções do trato urinário são uma das principais causas de busca por atendimento médico, se definem como a invasão microbiana de qualquer órgão do trato urinário, que tem natureza estéril, desde a uretra até os rins. *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa, comensal aos humanos, é o agente mais comum isolado em torno de 75 a 95% das infecções urinárias agudas de origem bacteriana. As células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), essenciais nos eventos iniciais da infecção por atuarem como sentinelas e servirem de ponte entre a resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. Assim, realizamos experimentos para entender a interação de DCs e UPECs. Para tal, DCs foram obtidas de monócitos do sangue periférico de doadores saudáveis, cultivadas na presença de IL-4 e GM-CSF e infectadas com as cepas V27 e J96 de UPECs por 24 horas. Observamos a capacidade das UPECs em infectar as DCs. Então as células foram analisadas por citometria de fluxo para avaliação da expressão de moléculas de superfície CD11c, CD1a, CD83, CD62L, CCR7, CD209, HLA-DR, CD86, CD80, CD40 e CD274. Após a interação DCs-UPECs observou-se diminuição de CD11c, diminuição de CD209 (DC-SIGN), tendência à diminuição da porcentagem e MFI da expressão de HLA-DR, aumento de CD80 e diminuição da média de expressão de CD86. A avaliação de morte celular demonstra que aparentemente a cepa V27 induz a morte por apoptose ou um processo de apoptose mais tardio nas DCs. Já a cepa J96 parece estimular uma tendência à morte por necrose ou apoptose tardia. Em conclusão, as UPECs regulam negativamente a expressão de DC-SIGN, moléculas co-estimulatórias como o CD86, além de regularem de forma diferente, a sobrevivência dessas células.

Palavras chave: UPEC, células dendríticas, moléculas de superfície.

ABSTRACT

Urinary tract infections are one of the main causes of seeking medical attention, defined as the microbial invasion of any organ of the urinary tract, which has a sterile nature, from the urethra to the kidneys. *Escherichia coli*, a gram-negative bacterium commensal to humans, is the most common agent isolated in 75-95% of acute urinary tract infections of bacterial origin. Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells (APCs), essential in the early events of the infection by acting as sentinels and bridging the innate and adaptive immune response of the host. Thus, we perform experiments to understand the interaction of DCs and UPECs. To that end, DCs were obtained from peripheral blood monocytes from healthy donors cultured in the presence of IL-4 and GM-CSF and infected with the VEC and J96 strains of UPECs for 24 hours. We observed the ability of UPECs to infect DCs. Cells were then analyzed by flow cytometry to evaluate the expression of surface molecules CD11c, CD1a, CD83, CD62L, CCR7, CD209, HLA-DR, CD86, CD80, CD40 and CD274. After the DCs-UPECs interaction, CD11c decreased, CD209 (DC-SIGN) decreased, tendency to decrease in percentage and MFI of HLA-DR expression, increase of CD80 and decrease in mean CD86 expression. Evaluation of cell death demonstrates that apparently the V27 strain induces death by apoptosis or a later apoptosis process in DCs. On the other hand, strain J96 seems to stimulate a tendency towards death by necrosis or late apoptosis. In conclusion, UPECs negatively regulate the expression of DC-SIGN, costimulatory molecules such as CD86, in addition to regulating the survival of these cells differently.

Keywords: UPECs, dendritic cells, surface molecules.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli* Uropatogênica

As infecções do trato urinário (ITUs) são uma das principais causas de busca por atendimento médico, afetam cerca de 150 milhões de pessoas por ano em todo o mundo, apenas nos Estados Unidos, são gastos US \$ 3,5 bilhões por ano com estas infecções. UTIs são uma causa significativa de morbidade em meninos infantis, homens mais velhos e fêmeas de todas as idades. As sequelas graves incluem recidivas freqüentes, pielonefrite com sepse, dano renal em crianças pequenas, parto pré-termo e complicações causadas por uso anti-microbiano freqüente, como resistência antibiótica de alto nível e colíti de *Clostridium difficile* (FLORES-MIRELES et al., 2015a; NORRIS; YOUNG, 2008).

As ITUs caracterizam-se com a invasão microbiana de qualquer órgão do trato urinário, que tem natureza estéril, desde a uretra até os rins. O trato urinário pode ser invadido por uma grande diversidade de organismos como bactérias, vírus e fungos, sendo a maioria das ITUs causadas por bactérias gram negativas. Organismos tais como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter baumannii*, *Morganella morganii*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Enterococcus* spp, são relevantes no contexto das infecções do trato urinário. Dentre tais agentes, podemos destacar a *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa (LO et al., 2013; TOTSIKA et al., 2012a). A *Escherichia coli* é o agente mais comum isolado em cerca de 75 a 95% das infecções urinárias agudas de origem bacteriana (FLORES-MIRELES et al., 2015a; NORRIS; YOUNG, 2008; WHO, 2014).

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, da família *Enterobacteriaceae*, colonizadora do trato

gastrointestinal, que estabelece comensalismo com alguns animais e humanos por toda a vida. O gênero *Escherichia* faz referência ao pesquisador que o descreveu, Theodor Escherich, em 1885 e a espécie se refere ao habitat, o cólon (DOYLE et al., 2011). Esta relação de comensalismo é afetada em indivíduos imunocomprometidos, quando a bactéria consegue romper a barreira gastrointestinal, permitindo que clones fortemente adaptados com diferentes fatores de virulência, colonizem outros sítios causando largo espectro de infecções, sendo agora uma relação não mais comensal (CROXEN; FINLAY, 2009).

A *E. coli* está correlacionada diretamente com as ITUs. As infecções provocadas por essa espécie de bactéria estão entre as mais frequentes infecções bacterianas nos humanos, principalmente entre as mulheres, sendo estas altamente susceptíveis, apresentando pelo menos uma infecção durante toda sua vida (TOTSIKA et al., 2012b). Em estudo recente de resistência microbiana, a *E. coli* figura entre os nove microrganismos de interesse global por causar infecções em diferentes contextos (WHO, 2014).

No âmbito hospitalar, as ITUs são causa frequente e agravante de infecções hospitalares em pacientes usuários de cateteres urinários. As ITUs podem ser divididas em infecção inferior que atinge a bexiga, como a cistite e infecção superior que acomete os rins como a pielonefrite. A sintomatologia varia de queixas mais leves na cistite, até sérios danos com o risco de 30% de septicemia na pielonefrite. Tem comumente foco inicial de infecção na bexiga, podendo ascender para os rins causando pielonefrite e falência renal (ANDERSEN et al., 2012; ULETT et al., 2013).

As linhagens de *E. coli* que são patogênicas são divididas em enteropatogênicas (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroagregativa (EAEG), enteroinvasiva (EIEC) e a difusamente aderente (DEAC), todas essas causando danos intestinais. Há ainda as linhagens extra-intestinais que são a *E. coli* uropatogênica (UPEC) e a causadora de meningite neonatal (MNEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004) (Figura 1).

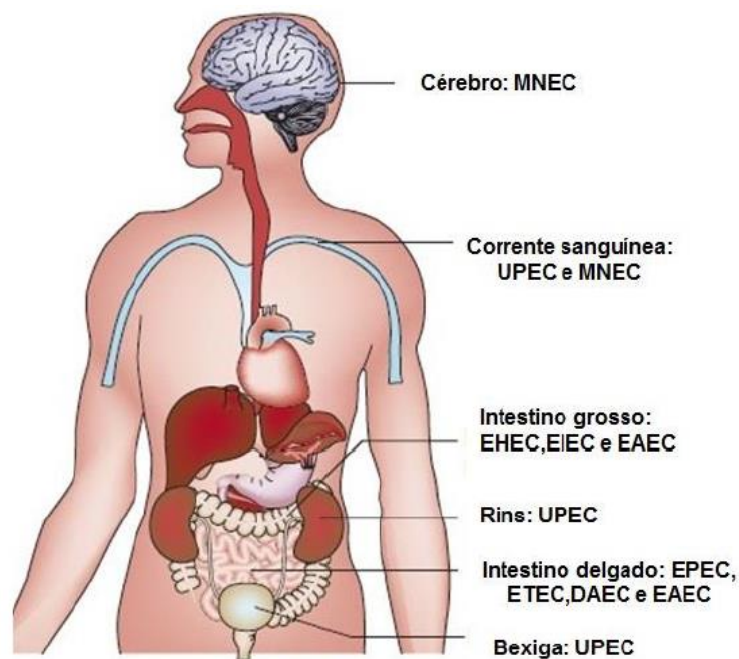


Figura 1: Sítios de colonização das linhagens de *E. coli* patogênicas. Adaptado de: CROXEN & FINALY, 2010.

As linhagens de *E. coli* responsáveis por ITUs e quadros de septicemia associados a este tipo de infecção são denominadas UPECs (*Escherichia coli* Uropatogênicas – *Uropathogenic Escherichia coli*). Como dinâmica da infecção, as UPECs migram do trato intestinal para a zona periuretral, conseqüentemente infectando a uretra e a bexiga. Estas infecções podem ser recorrentes e por cepas iguais ou diferentes, habitando intestino e trato urinário. A UPEC é um patógeno intracelular, que ao adentrar a célula do hospedeiro, forma comunidades intracelulares, com características semelhantes aos biofilmes, que a protege dos componentes do sistema imune, colaborando para o sucesso da infecção que pode se tornar crônica e de repetição (CROXEN; FINLAY, 2009; RILEY, 2014).

Bactérias *E. coli* normalmente colonizam o trato gastrointestinal de humanos, no cólon intestinal, com relacionamento comensal entre patógeno e hospedeiro (CHEN et al., 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Porém, em situações de comprometimento do sistema imune, clones com fatores de virulência específicos, como as UPECs, causam infecção – (DUELL et al., 2012).

1.2 Fatores de Virulência das UPECs

Os fatores de virulência conferem a algumas estirpes de UPECs a capacidade de colonizar e causar infecção (ANDERSEN et al., 2012; FLORES-MIRELES et al., 2015b; LUTHJE; BRAUNER, 2014; TOTSIKA et al., 2012a). A figura 2 mostra a localização de alguns fatores na estrutura bacteriana. As *E. coli* podem ser classificadas em quatro grandes linhagens filogenéticas A, B1, B2 e D. As cepas de UPECs pertencem ao grupo B2 que tem a característica de expressar mais fatores de virulência e menos genes de resistência (GIRARDINI et al., 2012).

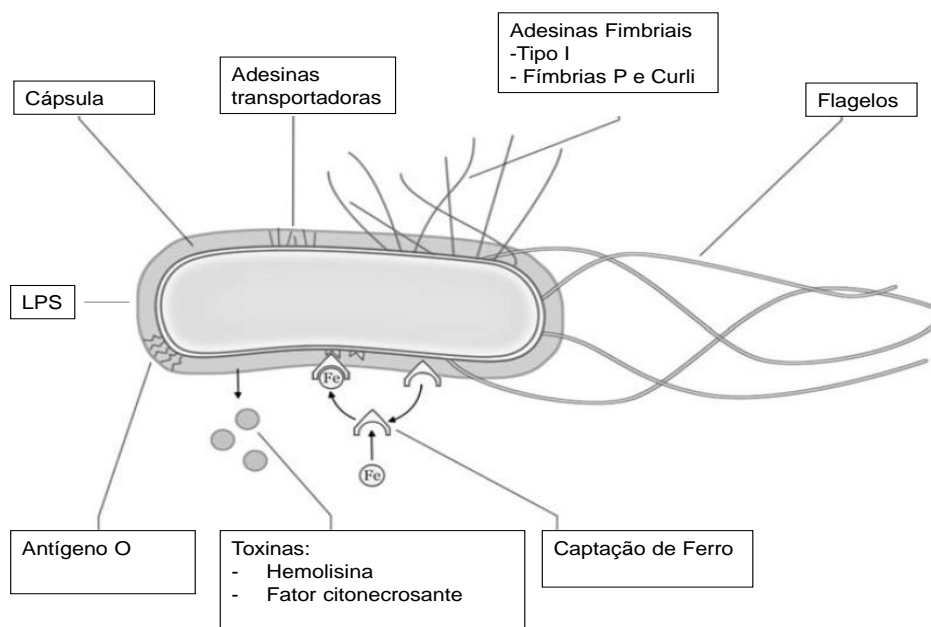


Figura 2: Fatores de virulência de *E. coli* patogênicas. *Adaptado de:* TOTSIKA ET AL., 2012.

No trato urinário a eliminação da urina é um sistema que remove as bactérias que tentam ascender à uretra até a bexiga. A adesão então é o processo inicial para o sucesso da infecção. A adesão às células pode ser mediada por adesinas fimbriais e adesinas não fimbriais ou afimbriais, que são compostas de subunidades menores que se aderem às células através de receptores, como por exemplo, o FimH que se liga a glicoproteínas (HANNAN et al., 2013; LUTHJE; BRAUNER, 2014). Grande parte de

adesinas não-fimbriais pertencem ao grupo de proteínas autotransportadoras que executam o seu próprio transporte através das membranas bacterianas (LUTHJE; BRAUNER, 2014).

As UPECs também expressam outros tipos de adesinas, tais como a amilóide e adesina afimbrial que também promovem a adesão e invasão dentre outras funções, como mobilidade (FLORES-MIRELES et al., 2015a).

As fímbrias do tipo 1 são primordiais para a invasão e colonização em camundongos e humanos. Um tipo de fímbria denominado fímbria P está associado à pielonefrite, enquanto que a fímbria tipo 1 está associada à cistite e infecções renais (Chen et al., 2013; Lüthje & Brauner, 2014).

A fímbria curli, composta por subunidades que fazem o transporte através da membrana celular, representa o principal componente do biofilme. A fímbria curli reduz seu metabolismo em baixos níveis de oxigênio, o que permite resistência bacteriana e sobrevivência fora do hospedeiro (LUTHJE; BRAUNER, 2014). Além disso, a fímbria curli induz forte resposta imune e sua interação com proteínas plasmáticas pode acarretar a urosepticemia. Seu reconhecimento acontece via receptores celulares do tipo Toll TLR2/TLR1 e há o início da resposta inflamatória. Por tais características, a fímbria curli vem sendo alvo de muitos estudos quanto à sua função e interação com o sistema imune (DUELL et al., 2012).

O antígeno 43 (Ag43), uma adesina, também promove a invasão e formação de biofilme. Proteínas denominadas de autotransporte uropatogênica, foram descritas recentemente e também promovem o biofilme. Os biofilmes formam uma matriz celular com natureza proteica ou polissacarídica, chamada de glicocálice, que protege a comunidade da desidratação e mantêm o ambiente com altíssimo teor de água. Esta capacidade dos microrganismos produtores de biofilme é altamente proficiente, protegendo-os da desidratação, da ação de bacteriófagos, do estresse oxidativo e também confere resistência aos antimicrobianos (COSTERTON, J. W. et al., 1995; GOTO et al., 1999; LUTHJE; BRAUNER, 2014).

O ferro é um fator essencial para o metabolismo das UPECS, entretanto na urina a oferta é muito baixa. Como estratégia de sobrevivência, as UPECs desenvolveram formas de suprir esta demanda de ferro capturando-o do hospedeiro. As UPECs então liberam moléculas de baixo peso molecular chamadas de sideróforos, que captam ferro por afinidade, e após esta ligação, os captura de volta agora carregados de ferro. Além disso, bactérias com genes relacionados com o sequestro de ferro estão presentes em estirpes que causam infecções recorrentes (TOTSIKA et al., 2012a; ULETT et al., 2013).

A hemolisina-a é uma toxina secretada que causa a formação de poros em eritrócitos e células nucleadas, além de estimular a produção de citocinas inflamatórias e esfoliação de células do trato urinário. Assim, está correlacionada com o desenvolvimento de hemorragias e pielonefrite (NAGAMATSU et al., 2015). A atividade hemolítica das UPECs também está correlacionada à presença de Fator Necrosante Citotóxico 1 (CTLF-1) que induz alterações celulares no citoesqueleto, promovendo a internalização bacteriana (FLORES-MIRELES et al., 2015a).

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na parede bacteriana de gram-negativas, sendo constituído de lipídeos e polissacarídeo. É considerada um dos maiores imunógenos existentes, por sua forte capacidade de indução da resposta inflamatória (FLORES-MIRELES et al., 2015b). O LPS das UPECs é reconhecido via TLR4, induz a secreção de citocinas e quimiocinas nas células epiteliais e aumenta o recrutamento de neutrófilos, entretanto, nas UPECs outros fatores também induzem resposta via TLR4, como as fímbrias, citadas anteriormente (DUELL et al., 2012; LUTHJE; BRAUNER, 2014; PARK; LEE, 2013).

Uma estirpe isolada de um episódio de pielonefrite humana chamada de J96 expressa fatores de virulência como fímbrias do tipo I e pili sensíveis á receptores de manose, uma outra cepa, a V27 oriunda de urosepse huamana expressa fatores para aquisição de ferro. (JOHNSON et al., 2000; NORMARK et al., 1983).

1.3 Células Dendríticas (DCs)

As DCs e macrófagos são células mononucleares derivadas de precursores da medula óssea. As DCs foram descritas inicialmente em camundongos, por Steinman e Cohn, em 1973, e desde então, são alvo de diversos estudos em imunologia. Esta população de células está presente em quase todos os tecidos do corpo que entram em contato com microrganismos e antígenos, fazendo o processamento e apresentação destes para linfócitos. Assim, tem papel fundamental na ativação da imunidade para antígenos não próprios, bem como a manutenção da tolerância, na resposta aos antígenos próprios (STEINMAN, 2003).

As DCs formam uma família de células heterogênea, de morfologia única, possuem longas porções membranosas e capacidade de fagocitar além de apresentar antígenos de forma profissional e eficiente (STEINMAN, 2007). Tais células fagocitam os patógenos, pois reconhecem padrões moleculares de microrganismos via receptores que se diferem das células do hospedeiro mamífero, processam e apresentam antígenos para as células do sistema imune adaptativo, sendo assim, chamadas de células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) (LICHTMAN; PILLAI, 2012; GEGINAT et al., 2015; STEINMAN, 2003, 2007).

Existem dois grandes subgrupos de DCs: as DCs plasmocitóides (pDCs) e as DCs convencionais (cDCs), dentre outros subtipos. A classificação de subtipos ou subpopulações é realizada de acordo com a expressão de marcadores celulares que são moléculas expressas na superfície das células e, também de acordo com suas funções biológicas em diferentes tecidos (GEGINAT et al., 2015).

As cDCs ou DCs mielóides estão situadas no sistema circulatório, tecidos periféricos e órgãos linfóides. Expressam marcadores mielóides como CD11c, CD33, CD13, altos níveis de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade - MHC de classe I e MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras CD86 constitutivamente e CD80 quando ativada. As cDCs

se dividem em grupos de acordo com sua localização. Por exemplo, as células de *Langerhans* situadas na epiderme, expressam marcadores como CD1a, CD11c e CD32. Já as DCs dérmicas expressam CD14 e induzem a diferenciação de células B em plasmócitos via CD40 (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; STEINMAN, 2007).

As pDCs estão situadas no sangue periférico, timo e alguns tecidos linfoides. Tem como característica morfológica, alta quantidade de retículo endoplasmático, expressão de CD123 e CD68, níveis baixos de CD11c, o que as difere sumariamente das DCs convencionais. Após contato com vírus e produtos bacterianos, as pDCs secretam interferons do tipo I e II, citocinas com propriedade antiviral potente, passam a expressar moléculas do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC-II) em grande quantidade, aumentam a capacidade de ativar células T virgens e células NK (CHEONG et al., 2011; DASGUPTA et al., 2014; GEGINAT et al., 2015).

De notória relevância para este trabalho, destacamos as DCs derivadas de monócitos (moDC) que podem diferenciar-se pela ação de mediadores inflamatórios *in vivo* e também pelo uso de citocinas recombinantes em protocolos *in vitro*. Dados na literatura demonstram que monócitos estimulados com fator estimulador de crescimento de colônia (GM-CSF) e a citocina IL-4 em cultura diferenciaram-se em DCs com total capacidade de apresentação de antígenos, incluindo apresentação cruzada, produzindo citocinas inflamatórias, ativando células T virgens (KUHN; YANG; RONCHESE, 2015; SAID; WEINDL, 2015; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). Antes de qualquer estímulo de maturação (contato com molécula antigênica), estas moDCs apresentam fenótipo de DCs imaturas expressando altos níveis de CD11c, CD1a e baixos níveis de expressão de moléculas de MHC-II (APCs profissionais), CD40 (co-estimuladoras), CD80 e CD86 (B7-1 e B7-2, co-estimuladoras), sendo especialistas em processamento de antígenos (ELKORD et al., 2005; KUHN; YANG; RONCHESE, 2015; SAID; WEINDL, 2015)

1.4 Migração e maturação de DCs

As DCs chamadas de imaturas estão em constante trânsito pelos tecidos periféricos, cumprindo exaustivamente seu papel de sentinelas do sistema imune, capturam antígenos por reconhecimento de receptores de famílias diferentes, tais como: receptores do tipo C das lectinas (CLRs), que reconhecem glicoproteínas, receptor de reconhecimento padrão (PRRs) que reconhecem os TLRs e porção Fc do anticorpo que reconhece epítomos de diferentes antígenos, receptores ácido retinóico gene induzível I (RIG-I) e receptores de reconhecimento de células em apoptose (ACRs). Esta variedade de receptores permite que as DCs reconheçam um número díspar de antígenos (HARRISON et al., 2012; STEINMAN, 2003, 2007).

As DCs presentes na pele, mucosa e no parênquima dos órgãos, na forma imatura, ao entrarem em contato com um microrganismo reconhecendo os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), são ativadas, diminuem a sua capacidade de fagocitose e aumentam expressão de MHC de classe I e II, assim como as moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80, CD83, CD86 e CD54 (Figura 3). Em seguida, diferentes quimiocinas e citocinas também são produzidas, recrutando outras células, tendo papel essencial na ativação de células T. Tais moléculas co-estimuladoras são marcadores da ativação de DCs em experimentos *in vitro* (AERTS-TOEGAERT et al., 2007; KUHN; YANG; RONCHESE, 2015; SAID; WEINDL, 2015).

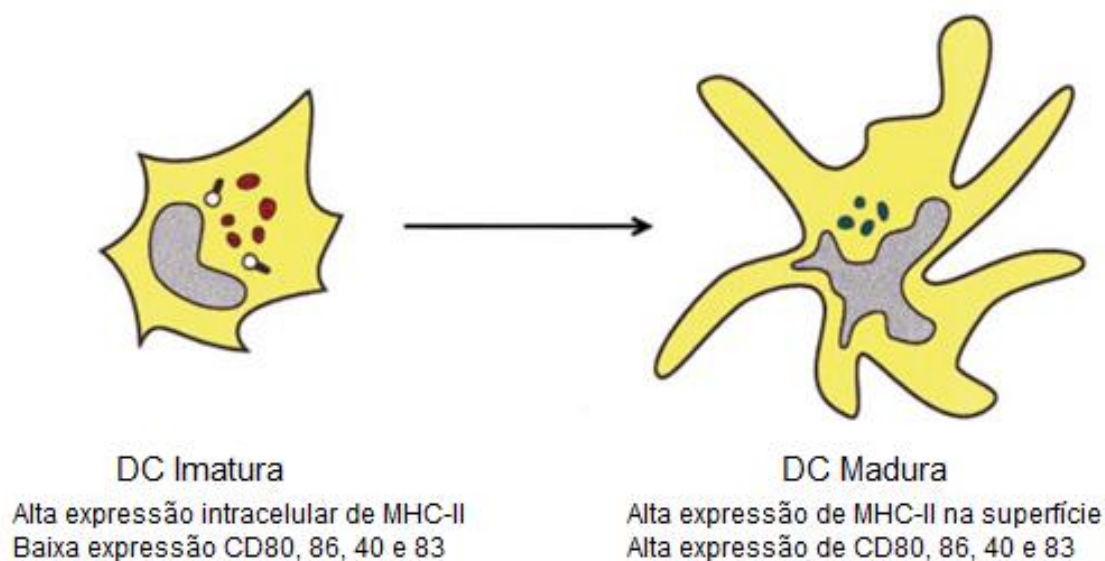


Figura 3: Marcadores de maturação de DCs. *Adaptado de:* BANCHEREAU; STEINMAN, 1998.

Esta ativação de sinais provoca a migração para os gânglios linfáticos, onde apresentam o antígeno às células T. Semelhante às células T, as DCs expressam uma L-selectina de membrana, a CD62L, uma glicoproteína de adesão, que permite o rolamento de células ao longo das paredes de vasos sanguíneos, até o sítio de infecção e linfonodos. Assim, apresentam antígenos e desempenham um papel fundamental como ponte entre a imunidade inata e adquirida, com função efetora em ambas as imunidades (SETH et al., 2011; STEINMAN, 2007).

Ao entrar em contato com o antígeno, podendo ser proveniente de microrganismos ou moléculas advindas do processo inflamatório, as DCs além do aumento das moléculas co-estimuladoras, também aumenta receptores de quimiocinas como CCR5 e CCR7, este último sendo um receptor de quimiocina responsável por seu direcionamento para o linfonodo. Ainda, aumentam a produção de citocinas como TNF- α , IL-12, IL-18. Este processo de maturação é dependente do estímulo antigênico (HARRISON et al., 2012). As DCs chegam aos órgãos linfoides maduras, apresentando antígenos via as moléculas de MHC e os apresentam para as células T, e auxiliam na ativação de células B e células NK (BATISTA; HARWOOD, 2010; FERLAZZO; MORANDI, 2014), conectando imunidade inata e

adaptativa. Em seu estado maduro, as DCs expressam CCR7 e CD83, diminuem seu poder de fagocitose e processamento de antígenos, porém exercem uma excelente capacidade de ativar e estimular a resposta de linfócitos (GEGINAT et al., 2015; HARRISON et al., 2012; STEINMAN, 2007).

Para apresentação do antígeno capturado, as DCs após o processamento, convertem essas proteínas em peptídeos que se associam às moléculas de MHC e são apresentados ao linfócito T. Via de regra, os antígenos do citosol, são apresentados via MHC de classe I que são reconhecidos por células T CD8, enquanto que os antígenos internalizados em vesículas são apresentados via MHC de classe II, que são reconhecidos por células T CD4. Porém, algumas DCs tem a capacidade única de realizar esta apresentação de forma cruzada, quando fagocitam células infectadas por vírus, ativando a via de T CD8 (FONTENEAU et al., 2003).

Em sua forma imatura, tem alta capacidade de fagocitar antígenos e, quando maduras, elevada apresentação de antígenos e secreção de citocinas, que ativam fortemente a resposta imune (STEINMAN, 2003, 2007). As cDCs após a maturação induzida pelo reconhecimento do antígeno, expressa receptores de quimiocinas, em exemplo o CCR7, permitindo que se movam a partir dos tecidos periféricos para os tecidos linfóides secundários, o que lhes confere uma elevada e rápida capacidade migratória. Ao migrarem para os linfonodos, as cDCs podem conduzir as respostas de células T, tanto em estado estacionário (para induzir tolerância ou anergia) quanto durante a infecção, que dependendo do estímulo, são capazes de diferenciar células T virgens em células Th1, Th2, Th17 ou células T reguladoras. As citocinas produzidas no processo de maturação, também recrutam e ativam células B e células "*natural killer*", que são células "assassinas naturais" (HARRISON et al., 2012; STEINMAN, 2003).

Ao entrar em contato com o antígeno, podendo ser proveniente de microrganismos ou moléculas advindas do processo inflamatório, as DCs denominadas imaturas, migram para os órgãos linfóides periféricos, iniciando sua maturação que implica em um aumento da expressão de

moléculas co-estimuladoras tais como CD54, CD80, CD86 e CD83 e CCR7, este último sendo um receptor de quimiocina responsável por seu direcionamento para o linfonodo (RANDOLPH; ANGELI; SWARTZ, 2005; STEINMAN, 2007). Ainda, aumentam a produção de citocinas como TNF- α , IL-12, IL-18, além do aumento na expressão das moléculas de MHC. Este processo de maturação é dependente do estímulo antigênico (HARRISON et al., 2012). As DCs chegam aos órgãos linfoides maduras, apresentando antígenos via moléculas de MHC para as células T, células B e células NK, conectando imunidade inata e adaptativa. Em seu estado maduro, as DCs expressam CCR7 e CD83, diminuem seu poder de fagocitose e processamento de antígenos, porém exercem uma excelente capacidade de ativar e estimular a resposta de linfócitos T, iniciando a resposta imune adaptativa, para o controle e homeostasia deste processo a expressão de CD274 (ou PD-L1), antagonista de CD80, é fundamental na inibição de ativação de células T e citocinas (GEGINAT et al., 2015; HARRISON et al., 2012; SHARPE et al., 2007; STEINMAN, 2007).

1.5 Receptores das células dendríticas e apresentação de antígenos

Para realizarem o reconhecimento dos antígenos, as DCs expressam em sua superfície vários receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem PAMPS de diversos microrganismos, como os receptores semelhantes ao Toll (TLRs), receptores de lectina do tipo C (CLRs), como por exemplo, o CD209 (DC-SIGN) que se liga em ICAM-3/CD50 da célula T em repouso para sua ativação, além disso, é utilizado como marcador de maturação e ativação de DCs, receptores ácido retinóico gene induzível I (RIG-I), *like receptors* (RLRs), domínio de oligomerização (NOD), *like receptors* (NLRs) – que reconhecem subcomponentes de peptidoglicana ou outras moléculas bacterianas – receptores de reconhecimento de células em

apoptose (ACRs) e receptores Fcy (FcγRs) (CHEONG et al., 2011; GEGINAT et al., 2015; ORTIZ et al., 2009).

Os receptores do tipo Toll (*Toll-like* - TLR) reconhecem diversos PAMPS que são moléculas básicas dos grandes grupos de microrganismos, tais como LPS de bactérias, zimozan dos fungos, LPG de protozoários e RNA de vírus. Os TLRs podem ser divididos em dois grupos: os TLRs expressos na superfície celular que compreendem os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6, que tem a função do reconhecimento de componentes de bactérias, fungos, protozoários, e os TLRs situados em compartimentos endossomais, os TLRs 3, 7, 8, 9, que reconhecem ácidos nucléicos (KONO; BACCALA; THEOFILOPOULOS, 2013).

Nas DCs os TLRs 2, 3, 4, 5 e 8 estão expressos nas cDCs e os TLRs 7 e 9 nas pDCs. Já se admite o TLR10, mas suas funções são desconhecidas e parecem ser semelhantes a TLRs 1 e 6 (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). É importante ressaltar que TLRs 3 e 4, reconhecem RNA viral e LPS, um lipolisacárideo presente na parede de bactérias gram negativas (CISSE et al., 2008).

1.6 Interação Patógeno Hospedeiro

Considerando as infecções causadas por UPECs, estudos demonstram que a infecção tem seu início com a colonização do intestino com uma estirpe uropatogênica que coloniza a área periuretral e ascende da uretra para a bexiga (ANDERSEN et al., 2012).

A colonização do trato urinário pelas UPECs é iniciada pela fímbria tipo 1, que liga-se aos receptores de manose das células epiteliais transitórias da bexiga, provocando apoptose e esfoliação destas células, iniciando a invasão celular (ANDERSEN et al., 2012; CHEN et al., 2013). Esse evento causa alterações no citoesqueleto, com a formação de protuberâncias compostas por uma matriz polissacarídica intracelular, conhecidas como “comunidades bacterianas intracelulares” (*Intracellular*

Bacterial Communities - IBCs), estruturas semelhantes a biofilmes (*biofilm-like*) compostas por 104 a 105 organismos. Nesta comunidade, as bactérias estão protegidas da ação de antibióticos e do sistema imune, porém são transitórias. Após maturação as UPECs saem das células hospedeiras e invadem mais células dando continuidade à infecção (AZEVEDO et al., 2016; ROSEN et al., 2007).

As primeiras linhas de defesa do sistema imune do hospedeiro são: a barreira epitelial, microbiota comensal, o pH ácido do trato urinário, células do sistema inato e posteriormente interação destas células ativando a resposta imune adaptativa. Durante a resposta inata estão presentes na barreira epitelial um grande número de variedades de fagócitos, onde podemos destacar as células dendríticas (DCs) e os macrófagos. Há o reconhecimento dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRR) presentes em células fagocitárias. Entretanto, bactérias desenvolveram cápsulas que protegem seus PAMPs como uma forma de escape. O LPS presente nas bactérias ativa o sistema complemento, que por sua vez, leva ao aumento da opsonização e, portanto, a fagocitose destas bactérias por macrófagos residentes, que secretam citocinas pró-inflamatórias (PILLAI, 2012; SEITZ et al., 2014). O PRR de maior relevância é o receptor do tipo Toll 4 (TLR4) que reconhece o LPS. Este reconhecimento recruta e ativa fagócitos para os sítios de infecção (FISCHER et al., 2006; OLSON; HUNSTAD, 2016; PARK; LEE, 2013).

A infecção por bactérias induz uma forte resposta pró- inflamatória, com neutrófilos executando a eliminação bacteriana (ANDERSEN et al., 2012). Contudo, as UPECs podem ter a capacidade de suprimir esta resposta inflamatória, escapando do reconhecimento imunológico, através da invasão celular e formação de biofilme (TOTSIKA et al., 2012b). As UPECs também desenvolveram a capacidade de escapar do sistema complemento, um eficiente sistema de proteínas de defesa da resposta imune humoral, tanto inata quanto adaptativa (DUELL et al., 2012).

Estudos de transcriptoma em camundongos demonstraram que a inflamação da bexiga em resposta a UPEC é rápida, patógeno-específica e envolve a ativação de genes que direcionam vias canônicas como a da produção das citocinas IL-10 e IL-17, sinalização TLR e NOD e genes associados ao movimento, morte, proliferação e maturação celular (FLORES-MIRELES et al., 2015a; ULETT et al., 2013). Estudos em camundongos com cistite demonstraram que a inflamação da bexiga como resposta à UPEC é rápida, específica e ampla, sugerindo que as UPECs promovem sua sobrevivência por utilizarem elementos da imunidade inata, para invasão celular e proliferação (DUELL et al., 2012).

Considerando a patogênese de outras espécies de bactérias, podemos citar a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* que tem a capacidade de impedir a atuação de células do sistema imune, tais como as células apresentadoras de antígeno como as DCs. Tal patógeno inibe a secreção de citocinas e a maturação de DCs. A apresentação de antígenos também é impedida pela ação de uma serino-hidrolase associada à membrana (Hip-1). Este efeito acontece via TLR2/TLR9 dependente de MyD88, restringindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, TNF-alfa e IL-1 beta. Os autores também observaram uma diminuição na expressão de CD40 e CD86, dependente de Hip-1. Assim, confirmaram que *M. tuberculosis* impede as funções de DCs, alterando a natureza da resposta de células T (MADAN-LALA et al., 2014).

Outros microrganismos também são capazes de evadir-se da resposta imune inata, como a *Salmonella* sp, que modula a expressão de MHC de classe II nas DCs, não permitindo a apresentação de antígenos. Consequentemente, não há ativação das células T, mecanismo essencial para ativação da resposta imune adaptativa, que juntamente com a inata, fazem uma resposta mais abrangente e eficiente (LAPAQUE et al., 2009).

A subversão do processo apoptótico celular, também pode ser um mecanismo de escape de patógenos, preservando a célula do hospedeiro. Foi demonstrado que *Staphylococcus aureus* aumenta a expressão gênica de fatores anti-apoptóticos, colaborando para a formação de IBCs e

sobrevivência da célula hospedeira (KOZIEL et al., 2009). Por outro lado, os patógenos também podem induzir a morte por apoptose, para infectar novas células e facilitar sua propagação. Dentre vários microrganismos podemos citar *Mycobacterium tuberculosis* e *Leishmania aethiopica*, *Leishmania major* e *Leishmania tropica* que levam há um aumento da indução de apoptose por macrófagos humanos infectados (GETTI; CHEKE; HUMBER, 2008; SANCHEZ et al., 2009).

2. JUSTIFICATIVA

Nas infecções do trato urinário as UPECs figuram como principal agente, assim como nas bacteremias de pacientes internados em unidades hospitalares. É uma das bactérias mais comuns da sepse, evidenciando sua importância para o controle de infecções hospitalares.

O entendimento da interação do microrganismo com o hospedeiro é de extrema relevância para a descrição dos mecanismos de infecção e curso da patogênese da doença, atentando para os fatores que desencadeiam na doença grave e mecanismos de escape da bactéria do sistema imune. Assim, o estudo do comportamento das DCs frente à interação com a UPEC é essencial para a elucidação da patogênese uma vez que elas são essenciais para a ativação e regulação da resposta do hospedeiro. Além disso, tal estudo se torna relevante para o esclarecimento da interação da bactéria e seus mecanismos de evasão da resposta do hospedeiro. Por fim, são poucos os dados na literatura sobre o tema o que corrobora a importância do presente estudo.

3. HIPÓTESE

A infecção de células dendríticas humanas pela bactéria *Escherichia coli* Uropatogênica causa alteração na capacidade de apresentação de antígenos, por inibir a expressão de moléculas co-estimulatórias essenciais para o direcionamento para o linfonodo e a consequente ativação dos linfócitos. Além disso, as UPECs podem induzir a morte das células dendríticas como mecanismo de escape da resposta imune.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

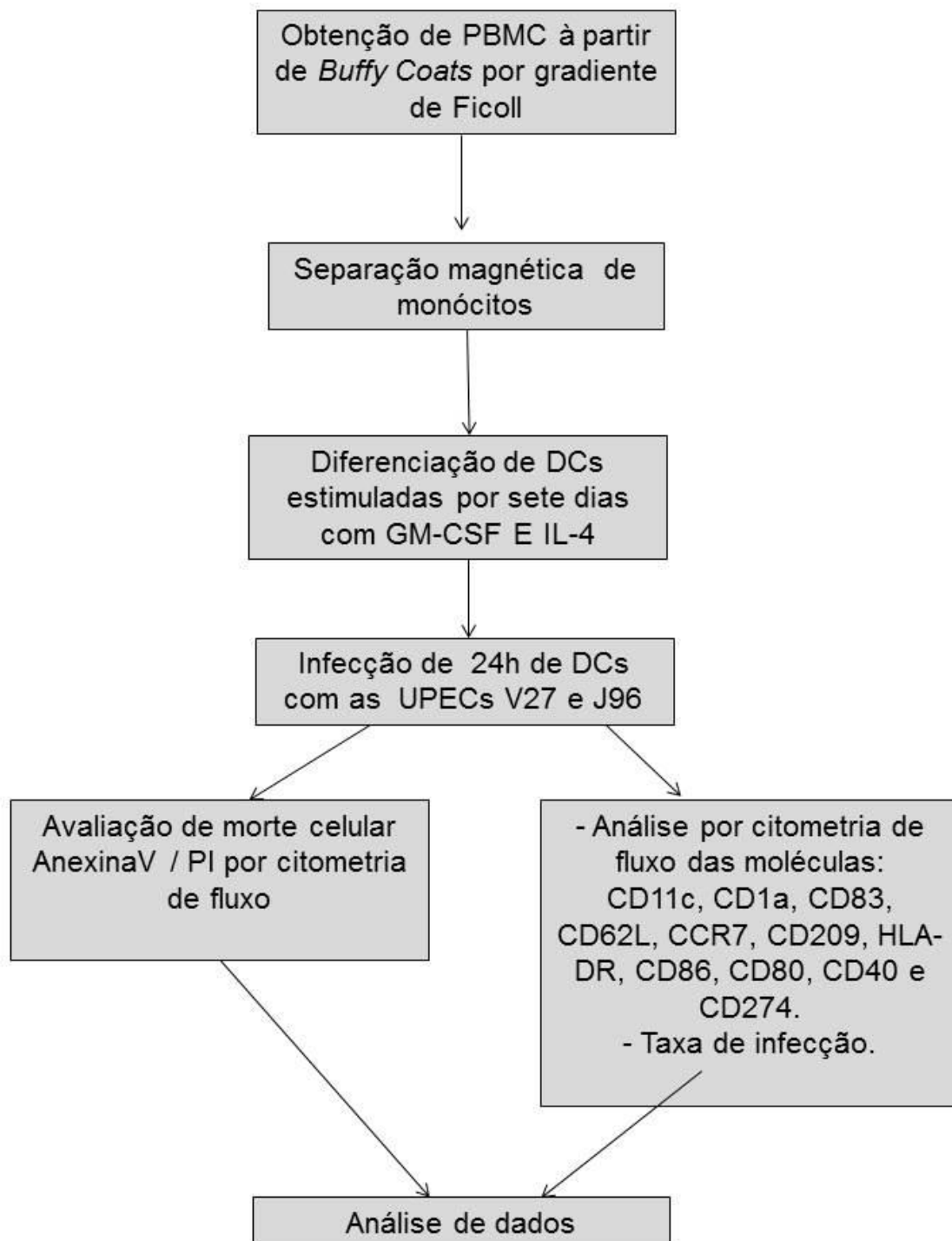
Estudar as interações *in vitro* entre das células dendríticas (DCs) humanas com duas cepas distintas de bactérias *Escherichia coli* Uropatogênica.

4.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a capacidade de infecção de UPECs em DCs.
- ✓ Definir a expressão de moléculas de superfície das células dendríticas após 24 horas de infecção com as UPECs.
- ✓ Analisar o perigo de morte/sobrevivência celular em DCs infectadas com as UPECs.

5. METODOLOGIA

5.1 Desenho experimental



5.2 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells - PBMC*)

As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas de doadores saudáveis, a partir de resíduos de bolsas de sangue “*buffy coats*”. O “*buffy coat*” é um concentrado de leucócitos e plaquetas obtido após a centrifugação para retirada do concentrado de hemácias e plasma, preparado pela Fundação Hemocentro de Brasília e cedida para pesquisa por convênio firmado com tal fundação. Os resíduos de “*buffy coats*” foram doados pelo Hemocentro após a liberação dos testes sorológicos, dentro do prazo de validade. Os resíduos das bolsas foram diluídos adicionando 5 mL de tampão fosfato salina (PBS) 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCL, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) para cada 5mL de sangue em um tubo falcon de 15 mL. A amostra diluída foi vertida lentamente sobre 3 mL de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Ltd.), em um outro tubo falcon de 15 mL para obtenção das células mononucleares por gradiente de densidade. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 583g por 25 min a 25°C. O PBMC obtido foi coletado, lavado três vezes com PBS 1X em velocidades decrescentes de centrifugação (400g, 300g e 200g) por 10 minutos a 4°C, para retirada do Ficoll residual e também das eventuais plaquetas. Após as lavagens, 10 µL das células foram diluídas em azul de tripan 0,4% (Sigma) e contadas em câmara de Neubauer (diluição 1:10 e 1:100). Durante a contagem foram consideradas apenas as células viáveis que não se coravam de azul.

5.3 Obtenção de monócitos

Após a separação e a quantificação do PBMC, os monócitos foram obtidos por separação magnética, utilizando um kit comercial. Microesferas conjugadas ao anticorpo anti-CD14 foram adicionadas aos PBMC (20 ul para

cada 10^7 células totais) e incubadas em tampão MACS (BSA 0,5%, EDTA 2mM em PBS 1X), de acordo com instruções do fabricante (Miltenyi biotec). Após serem ressuspensas em 500 μ L de tampão e marcadas com o anticorpo conjugado às microesferas, as células foram submetidas à separação magnética. Para tal, a coluna foi previamente umidificada com 500 μ L de tampão e em seguida as células marcadas foram adicionadas. As células marcadas ficam retidas na coluna magnética que fica presa a um ímã e a fração negativa elui da coluna. Foram realizadas 3 lavagens sucessivas com 500 μ L de tampão. Em seguida, a coluna foi retirada e a fração rica em CD14⁺ (fração positiva) que ficou retida na coluna foi lavada com 1mL de tampão e coletada num novo tubo. A fração coletada (monócitos) foi quantificada em câmara de Neubauer também com exclusão por azul de Trypan. As células obtidas foram ajustadas para 5×10^5 cel/ml e cultivadas para a diferenciação em células dendríticas (DCs).

5.4 Geração de células dendríticas a partir de monócitos

Os monócitos obtidos foram cultivados em placas de 24 poços, em 1mL/poço de meio RPMI completo suplementado com soro bovino fetal (Gibco) a 10%, citocinas IL-4 800 UI/mL (Peprotech) e GM-CSF 50 ng/mL (Peprotech) e 1% de penicilina-estreptomicina-L- glutamina 100X (Gibco), seguindo o protocolo de Sallusto e Lanzavechia (1994). No terceiro e sexto dias de cultura, foram retirados 200 μ L por poço de meio de cultura, adicionados 250 μ L por poço de meio novo suplementado com citocinas IL-4 e GM-CSF, nas mesmas concentrações iniciais e incubados a 37°C a 5% de CO₂. Após sete dias de cultura, as células foram coletadas com 3 lavagens sequenciais com 1mL de PBS 1X, quantificadas em câmara de Neubauer com azul de tripan 0,4% e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão de CD11c com marcador de diferenciação de DCs.

5.5 Cultura das bactérias UPECs

As cepas de *Escherichia coli* V27 isolada de urosepse humana e J96 isolada de pielonefrite humana, ambas gentilmente cedidas pela professora Tatiana Amabile de Campos, foram mantidas a -80°C . No momento do uso as cepas foram descongeladas e inoculadas em meio Luria-Bertani (LB – Sigma), mantidas sem agitação em estufa a 37°C até atingirem uma densidade óptica (OD) entre 0,4 e 0,6. A medida foi realizada por espectrofotometria em filtro de 600nm em 1 mL do volume total da cultura. Após a quantificação da densidade óptica, os volumes calculados por regra de três de cada cultura foram retirados a fim de se realizar infecção na proporção de 1 DC para cada 100 bactérias (1:100). Para realização da infecção, as bactérias foram opsonizadas com plasma humano, na proporção de 1:2 (volume:volume) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente, as bactérias foram lavadas com 1 mL de PBS 1X para retirada do meio de cultura e ressuspensas em meio RPMI incompleto de forma que a concentração adequada de bactérias necessárias para a infecção, estivesse num volume final de $20\mu\text{L}/\text{poço}$.

5.6 Infecção das DCs com as bactérias UPECs

Depois de diferenciadas as DCs foram coletadas e quantificadas para infecção pelas cepas V27 e J96. As DCs foram coletadas quantificadas em $5 \times 10^5/\text{ml}$, plaqueadas em meio RPMI incompleto, a cada poço foi adicionada a bactéria na proporção de 1:100 células-bactérias. A cultura foi incubada por 30 min em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e cultivadas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% (Gibco), 1% de penicilina-estreptomicina-L-glutamina 100X (Gibco) e 1% de gentamicina (Eurofarma) e, para a eliminação de bactérias no meio extracelular, posteriormente, incubadas a 37°C e 5% de CO_2 por 24h. Como controle positivo da expressão de moléculas de superfície, as DCs foram estimuladas com $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de LPS

(Sigma) e para controle positivo de morte celular utilizou-se 20 μ M/mL de etoposide (Sigma). Após 24h de incubação, as células foram coletadas e marcadas para caracterização da expressão de moléculas de superfície e avaliação da morte celular. As células foram observadas ao microscópio óptico invertido ainda na placa de cultura e fotografadas para visualização da morfologia antes e após a infecção de 30 min com as respectivas cepas.

5.7 Caracterização fenotípica das moléculas de superfície por citometria de fluxo

As DCs foram coletadas e caracterizadas fenotipicamente quanto à expressão das seguintes moléculas de superfície: CD1a, CD11c, CD40, CD62L, CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD209, PDL -1 e CCR7. Após 24h de infecção, as células infectadas, não infectadas (controle negativo) e as células expostas ao LPS ou etoposide (controles positivos) foram coletadas, quantificadas e transferidas para tubo *ependorf* de 1,5 mL, numa concentração de 10⁵ cél/mL por tubo. Posteriormente, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1X, centrifugadas por 10 min a 400g a 4°C e incubadas com 10 μ L de tampão FACS 1X (PBS 1X, albumina bovina (BSA) 1% e azida sódica 0,001%) por 10 min a 4°C para bloqueio da porção FcR. Em seguida, foram adicionados 20 μ L por amostra dos anticorpos anti-CD1a conjugado a FITC BD (BD Bioscience), anti- CD11C conjugado a APC (Imuno tools), anti-CD40 conjugado a APC (Imuno tools), anti-CD62 conjugado a APC (Imuno tools), anti-CD86 conjugado a PECY5 (BD Bioscience), anti-CD80 conjugado a PE (BD Bioscience), anti-CD83 conjugado a PE (BD Bioscience), anti-CD209 conjugado a PE (BD Bioscience), anti-CD274 (anti-PD-L1) conjugado a PE (BD Pharmagen), anti-CCR7 conjugado a PE (BD Pharmagen) e anti-HLA-DR conjugado a APC (BD Bioscience), diluídos 1:20 em tampão FACS e incubados a 4°C por 30 minutos ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram lavadas com 300 μ L de tampão FACS 1X e centrifugadas a 400g por 5 min a 4°C. O

sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspensão em 400 µL de tampão FACS 1X para aquisição no citômetro de fluxo (FACSVerse, BD ebioscience). As análises dos dados foram feitas no software *Flowjo* (Flowjo).

5.8 Detecção de morte celular em DCs

Após a exposição às bactérias, as células foram marcadas e analisadas por citometria de fluxo quanto à morte celular, realizada por marcação com anexina V e iodeto de propídeo (PI). As DCs não infectadas, infectadas, estimuladas com LPS e as DCs expostas ao etoposide 20 µM/mL (controle positivo) foram lavadas com tampão FACS e centrifugadas a 200g por 5 min a 4°C. Conforme indicação do kit de detecção de apoptose (Bioscience), as células foram ressuspensas em 195 µL de tampão de ligação 1X por tubo *ependorf* para cada 10^5 células, marcadas com 5 µL de anexina V e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram lavadas com PBS 1X, ressuspensas em 190 µL/tubo de tampão de ligação 1X e adicionado 10 µL de PI/tubo. Imediatamente após a adição do PI as células foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACSVerse, BD ebioscience) e analisados no software *Flowjo* (Flowjo).

5.9 Quantificação da infecção das DCs por UPECs

Após 24 horas de infecção, as células foram coletadas e transferidas para tubo *ependorf*, colocada em gelo e adicionado 1mL de PBS 1X com 10% de *tween* 20 gelado para lise das células. O lisado celular foi lavado com 1mL de PBS 1X, centrifugadas por 10 min a 400g, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensão e cultivado para recuperação das unidades formadoras de colônias (CFU) em placas de Petri com meio sólido Ágar Mac Conkey (Kasvi) por 18h em estufa à 37°C.

5.10 Análise estatística

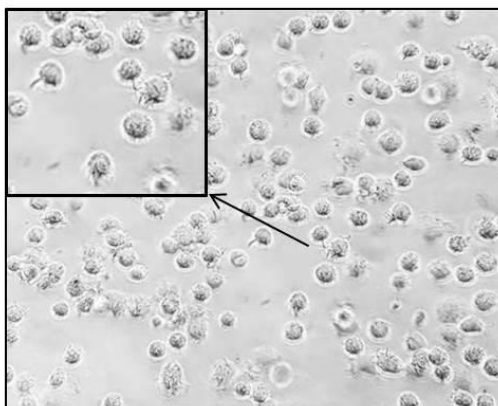
As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPadSoftware Inc). Os valores obtidos nas diferentes condições experimentais foram testados quanto à sua distribuição de normalidade e comparados pelo teste de Kruskal Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn nos dados de distribuição anormal. Na distribuição normal, os valores foram comparados pelo teste ANOVA, análise de variância a um critério e pós-teste de Tukey. Os dados de taxa de infecção foram analisados com teste t não pareado de Welch. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

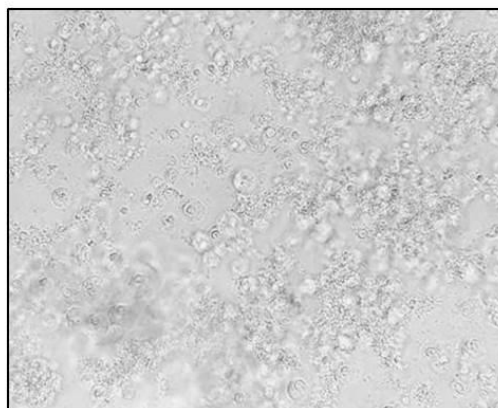
6.1 Caracterização morfológica das células dendríticas

As células dendríticas, diferenciadas por sete dias, foram coletadas e marcadas para classificação quanto aos marcadores de diferenciação em DCs. As células foram então quantificadas e distribuídas em placas para realização da infecção na proporção 1:100 célula:bactéria, após os 30 minutos da infecção as células foram colhidas e lavadas para retirada de bactérias no meio extracelular. O precipitado de células foi plaqueado novamente para posterior caracterização por citometria de fluxo. Durante a realização dessa etapa, foram observadas alterações morfológicas importantes ao compararmos as células controle (não infectadas) com aqueles que tiveram contato com as bactérias por trinta minutos. Observou-se uma drástica alteração morfológica após a infecção. As DCs não infectadas exibem morfologia característica com projeções citoplasmáticas semelhantes aos dendritos um atributo único das DCs (Figura 5A). Após a infecção de 30 minutos esta morfologia já muda sumariamente, com a perda das projeções citoplasmáticas, alteração no formato, adquirindo molde arredondado, presença de vacúolos, e uma distensão do citoplasma lateralizada (Figura 5B e 5C).

A



B



C

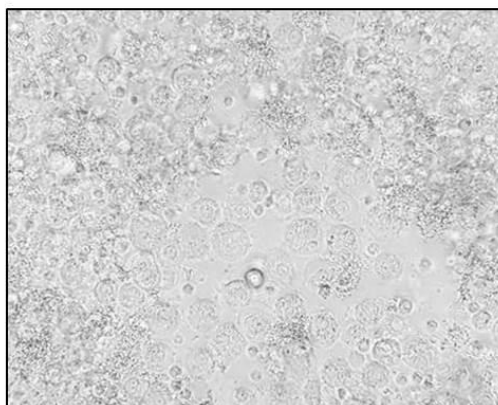


Figura 4 - Microscopia óptica de DCs controle negativo e infectadas com as cepas V27 e J96 de *E. coli*. DCs foram incubadas na (A) ausência de bactérias [controle negativo (CTR-)] onde se observa os dendritos nas DCs, morfologia habitual de DCs. DCs foram infectadas com as cepas de *E. coli* (B) V27 e (C) J96 por 30 min. Foi utilizada objetiva de aumento de 40X. Figura representativa de 1 doador.

6.2 Caracterização de DCs obtidas a partir de monócitos

As DCs geradas a partir de monócitos, após sete dias de cultura estimuladas pelas citocinas IL-4 e GM-CSF, foram coletadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo quanto a expressão de CD11c. Após tal análise, as células foram infectadas por 24h com as cepas V27, J96 e LPS como controle positivo. As células apenas com meio de cultura foram utilizadas como controles negativos.

A figura 4 mostra uma figura representativa de *dot plot* de tamanho x granulabilidade (FSCx SSC) da análise por citometria de fluxo, mostrando a porcentagem de células obtidas nas condições controle negativo, controle positivo e com as duas cepas de UPECs. Foram adquiridas um grupo de células não marcadas utilizado como isotipo controle e um grupo marcado com fluorocromo (APC), para estabelecer a referência e descartar a autofluorescência. Podemos observar que a janela ou *gate* foi definida na população de maior tamanho e dentro dessa população, verificamos a expressão de CD11c marcador de diferenciação de DCS que variou de 94,1 a 99,8% demonstrados no *zebra plot*.

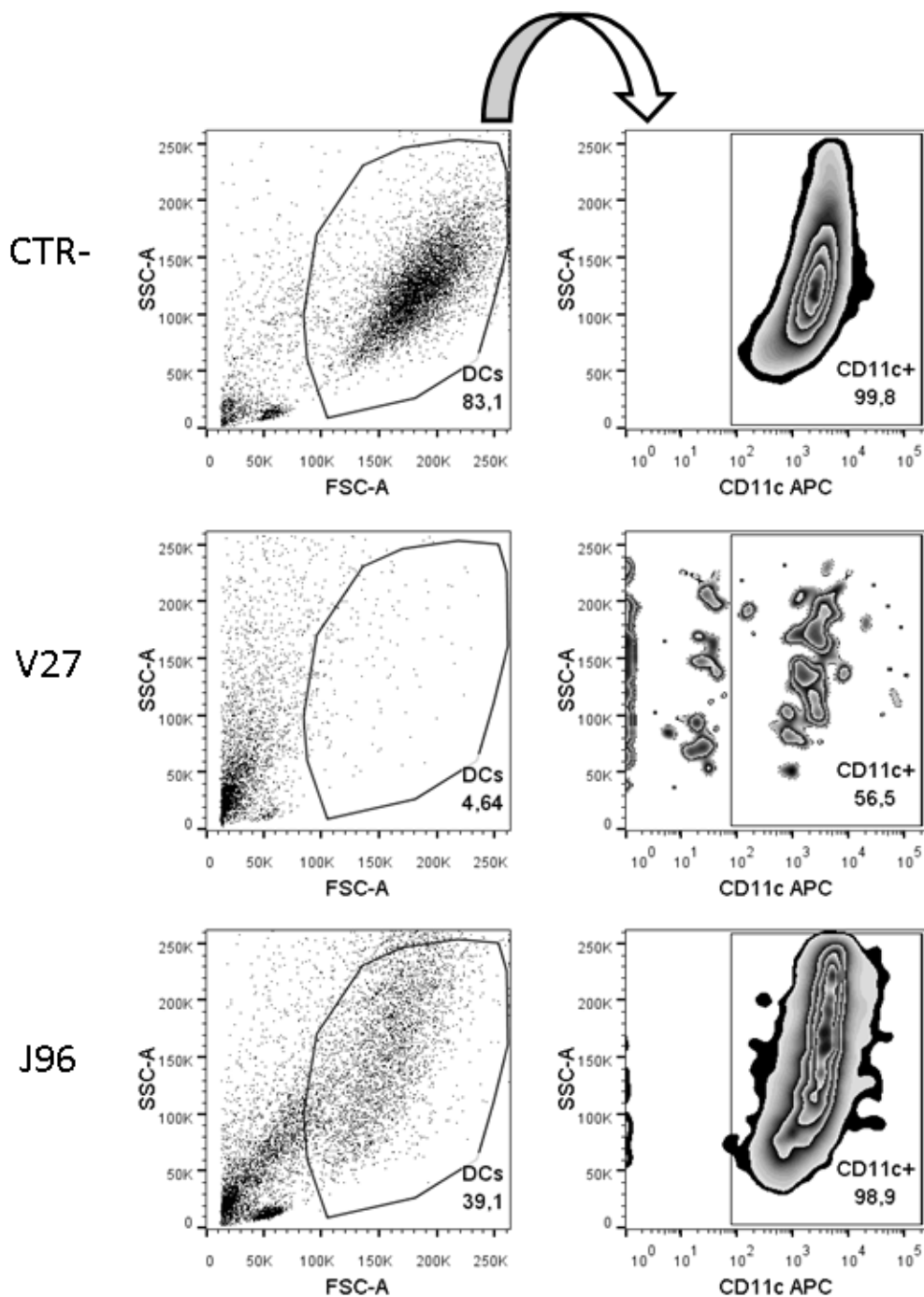


Figura 5 - Figura representativa da estratégia de análise da expressão de moléculas de superfície. DCs foram incubadas e infectadas com as cepas de *E. coli* V27 e J96 e na ausência de bactérias [controle negativo (CTR-)] por 24hs. A figura mostra a estratégia de análise utilizada para todas as marcações dos experimentos de expressão de molécula de superfície. DCs foram selecionados pelo *gate* no *dot plot* de tamanho (FSC – *Forward Scatter*) por granulicidade (SSC – *Side Scatter*), em seguida, células CD11c+ foram selecionadas por *gate* no gráfico de zebra *plot* de SSC e expressão de CD11c conjugado a APC em todas as condições. Figura representativa de 1 doador.

6.3 Recuperação de colônias

A capacidade das bactérias em infectar e sobreviver nas DCs foi avaliada por UFC em triplicata das células infectadas. Após a infecção, as DCs foram lisadas e as bactérias viáveis recuperadas após 24 horas de cultura em meio Mac Conkey. A taxa de média de recuperação de colônias foi de (74,55 +/-22,58) para a cepa V27 e de (153,6 +/-33,01) para a J96, não houve diferença significativa ao compararmos a capacidade de infecção e sobrevivência das duas cepas avaliadas (Figura 5).

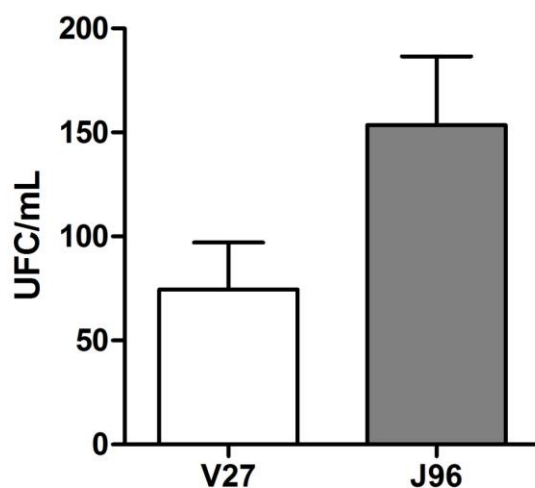


Figura 6 – Taxa de recuperação de UFC. DCs foram incubadas e infectadas com as cepas de *E. coli* V27 e J96. Após 24 horas, 5×10^5 células infectadas por foram lisadas e semeadas em placa de Petri para avaliação de taxa de infecção. Média +/- desvio padrão de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas das Dcs infectadas dos doadores avaliados (n=5).

6.4 Caracterização de moléculas de superfície de DCs após contato com *E. coli*

Após 24 horas de infecção, as células em todas as suas condições experimentais foram marcadas com CD11c e CD1a, marcadores característicos da diferenciação de DCs e CD83, marcador de maturação celular e analisadas por citometria de fluxo. A Figura 7A, demonstra a expressão percentual de CD11c nas células não infectadas, com média de 97,8 (+/-1,18) enquanto que após a infecção estes níveis diminuíram para 72,14 (+/-7,66) para a cepa V27 e 60,82 (+/-22,56) para a J96, mostrando diferença significativa apenas na presença de V27 em relação ao controle positivo 99,09 (+/-0,40) ($p < 0.05$). O marcador CD1a expressou uma média de 12,65 (+/-4,695) e 12,51 (+/-5,27) para os controles negativos e positivos respectivamente, e para as cepas V27 16,33 (+/-4,05) e J96 12,75 (+/-5,75), não havendo nenhuma diferença significativa entre as condições experimentais avaliadas (Figura 7B). Em CD83 a média foi de 6,60 (+/-2,78) e 19,11 (+/-11,03) nesta ordem, para as células não estimuladas e estimuladas com LPS, nas cepas V27 e J96 foi de 10,76 (+/-3,51) e 6,40 (+/-2,22), também nesta ordem, não apresentando diferença estatística de expressão de CD83 entre as condições (Figura 7C).

Em adicional às análises em expressão percentual dos marcadores, incluímos mais um parâmetro, o MFI (Média de Intensidade de Fluorescência). Assim, quanto ao MFI, não foi observada nenhuma diferença significativa em CD11c, com médias de 1522 (+/-1,18), 1223 (+/-7,66), 1185 (+/-22,56) 2045 (+/-0,40) para controle negativo, V27, J96 e controle positivo, nesta ordem. (Figura 8A). As análises de MFI também mostraram perfil semelhante para as moléculas CD1a e CD83, com médias de CD1a de 12,65(+/-4,69), 16,33 (+/-4,05), 12,75(+/-5,75) e 12,51 (+/-5,27) e CD83 6606 (+/-2,78) 10760 (+/-3,51) 6406 (+/-2,22) 19110 (+/-11,03) para controle negativo, V27, J96 e controle positivo, nesta ordem (Figuras 8B e 8C).

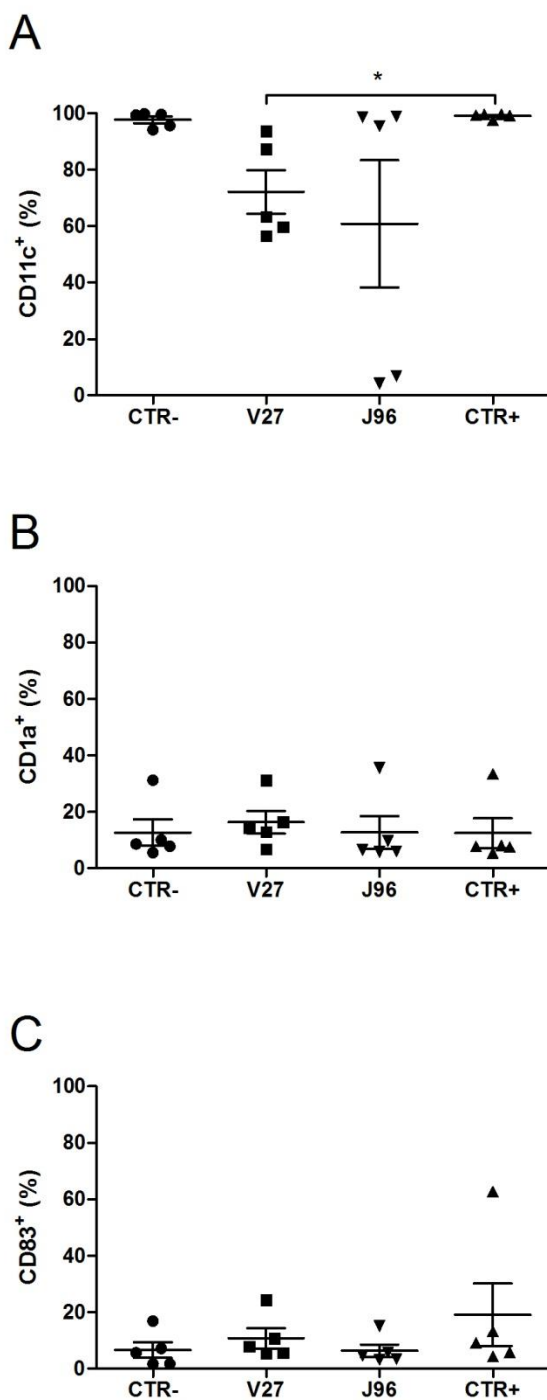


Figura 7 - Expressão percentual de CD11c, CD1a e CD83 em DCs infectadas com *E. coli*. Porcentagem da expressão (A) CD11c, (B) CD1a e (C) CD83 nas condições de controle negativo (CTR-) (círculo fechado), controle positivo (CTR+) (triângulo fechado), presença da cepa de *E. coli* V27 (V27) (quadrado fechado), cepa de *E. coli* J96 (J96) (triângulo invertido fechado) e controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado), Média +/- de desvio padrão, * $p < 0.05$, $n = 5$

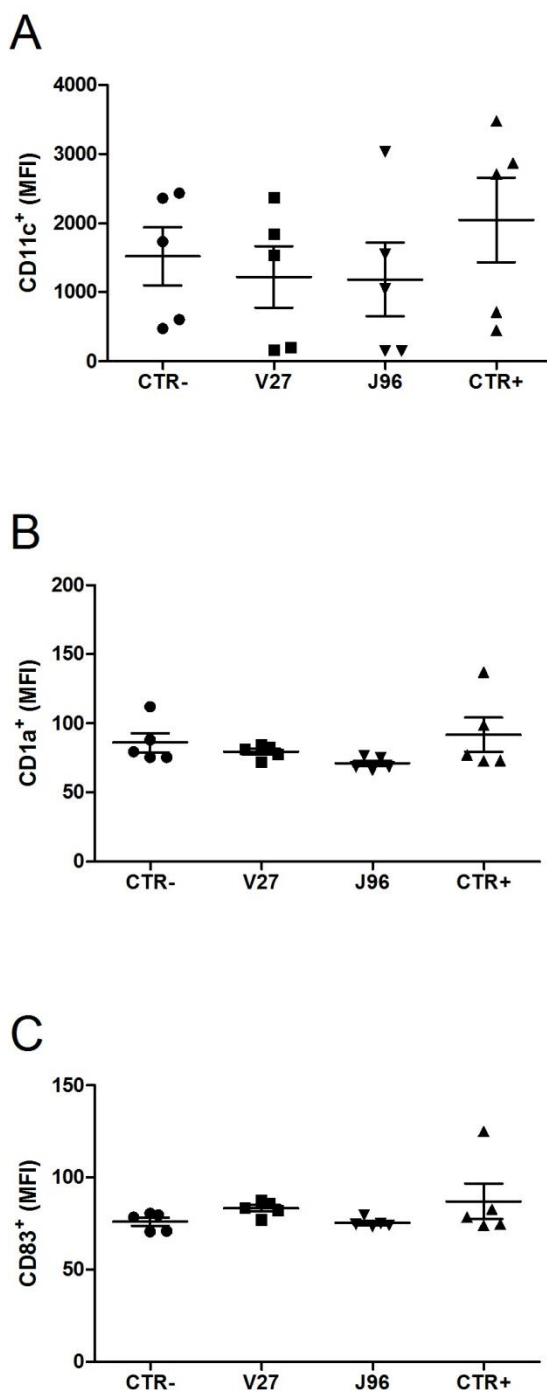


Figura 8 - Média de intensidade de fluorescência de CD11c, CD1a e CD83 em DCs infectadas com *E. coli*. Média de intensidade de fluorescência (MFI) de (A) CD11c, (B) CD1a e (C) CD83 nas condições de controle negativo (CTR-) (círculo fechado), controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado), na presença da cepa de *E. coli* V27 (V27) (quadrado fechado), cepa de *E. coli* J96 (J96) (triângulo invertido fechado) e controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado). Média +/- de desvio padrão, * $p < 0.05$, $n = 5$.

6.5 Perfil de expressão de moléculas relacionadas à fagocitose e migração celular

Admitindo que as bactérias infectem as DCs, avaliamos a ativação das DCs pelas bactérias, de moléculas que estimulam a fagócitos e migração ao linfonodo. Considerando as moléculas que atuam na migração de DCs, não houve diferença entre as células não infectadas e infectadas. Em termos de porcentagem de CD62L (L-selectina) e CCR7 (receptor de quimiocina responsável pelo direcionamento ao linfonodo) não houve diferença significativa. As médias de porcentagem de expressão de CD62L foram 33,22 (+/-10,33), 20,41 (+/-7,72), 12,99 (+/-5,16) e 39,10 (+/-11,91) para as condições controle negativo, estimuladas com as cepas V27, J96 e controle positivo, respectivamente (Figura 9A). Já o MFI foi de 135,4 (+/-12,61), 115,4 (+/-11,38) 96,0 (+/-3,26), 146,6 (+/-21,26) (Figura 10B). A análise de CCR7 demonstrou médias de porcentagens de 3,61 (+/-1,27), 4,65 (+/-1,34), 4,06 (+/-1,50) e 3,52 (+/-1,25) (Figura 9B) e MFI de 72,68 (+/-0,94), 81,06 (+/-4,24), 72,54 (+/-1,14) e 73,00 (+/-0,75), nas mesmas condições acima (Figura 10B).

Diferente dos indicadores de migração, obtivemos uma diminuição na expressão de CD209 (DC-SIGN), um receptor de superfície relacionado ao processo de fagocitose. Ao avaliarmos as DCs após a infecção com a cepa J96, houve uma diminuição significativa para 16,70 (+/-5,89) em relação ao controle negativo 67,56 (+/-6,89) ($p < 0.05$). Nas demais condições experimentais não houve diferença significativa, com médias de 33,80 (+/-13,43) para V27 e 61,88 (+/-7,72) para controle positivo. Entretanto em MFI, tivemos relevante diminuição das médias de V27 103,8 (+/-8,87) e J96 98,92 (+/-3,81) quando comparadas ao controle negativo 191,8 (+/-45,05) ($p < 0.05$). O controle positivo não demonstrou diminuição considerável 160,6 (+/-35,53) (Figura 9C e 10C).

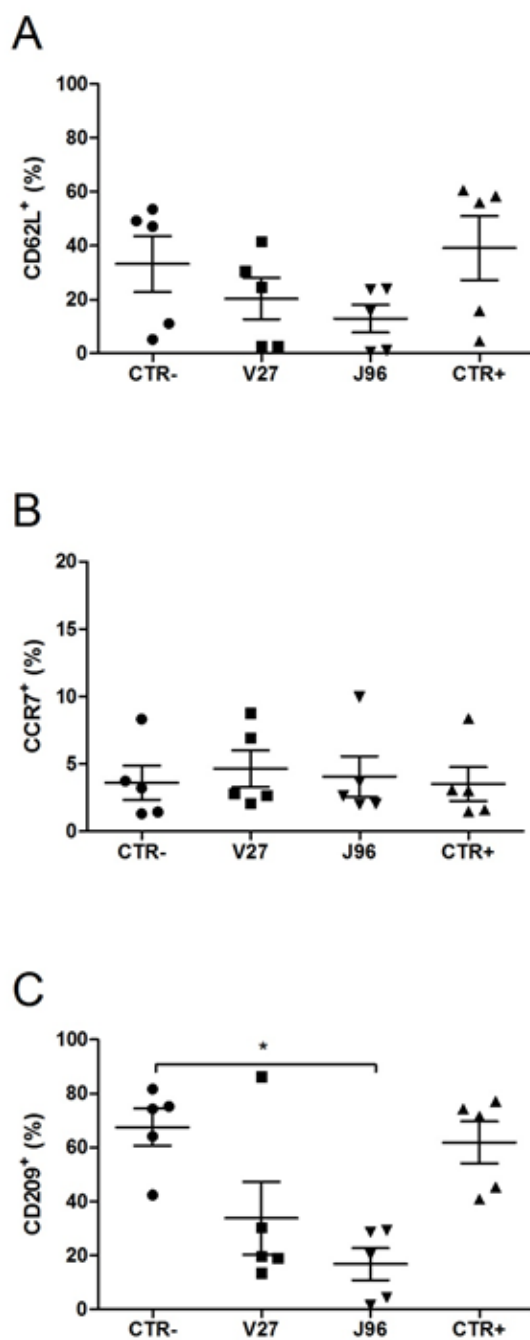


Figura 9 – Expressão percentual de CD62L, CCR7 e CD209 na presença de *E. coli*. Expressão percentual de (A) CD62L, (B) CCR7 e (C) CD209, nas condições de controle negativo (CTR-) (círculo fechado), controle positivo (CTR+) (triângulo fechado), na presença da cepa de *E. coli* V27 (V27) (quadrado fechado), cepa de *E. coli* J96 (J96) (triângulo invertido fechado) e controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado), Média +/- de desvio padrão, *p<0.05, n=5

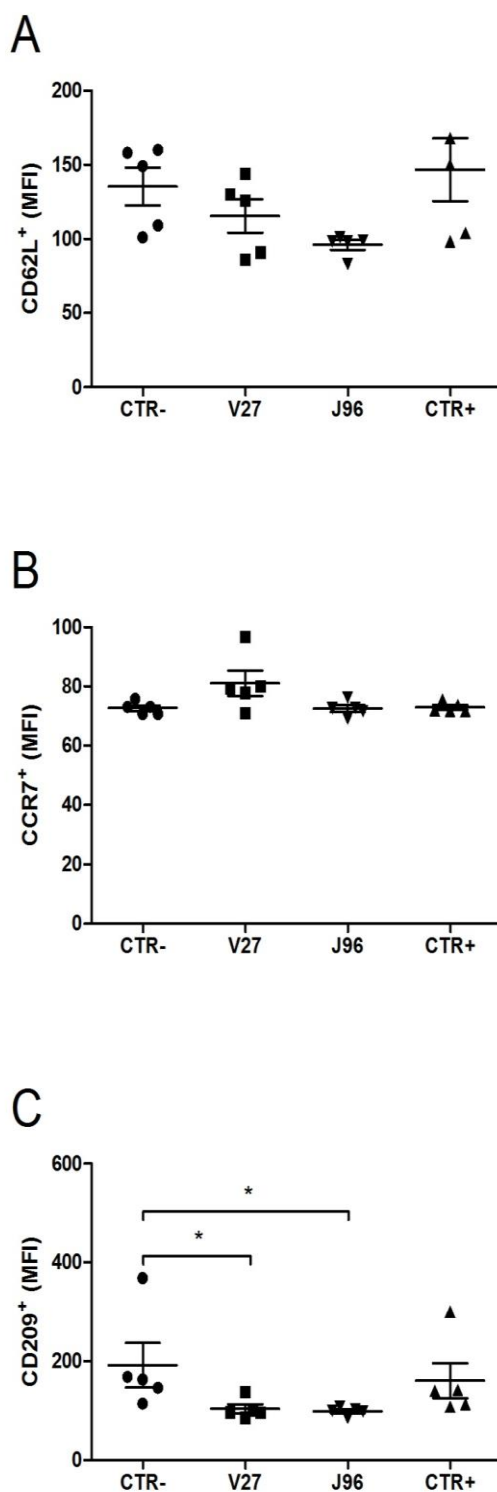


Figura 10 – Média de intensidade de fluorescência de CD62L, CCR7 e CD209 em DCs infectadas com *E. coli*. Média de intensidade de fluorescência (MFI) de (A) CD62L, (B) CCR7 e (C) CD209, nas condições de controle negativo (CTR-) (círculo fechado), controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado), na presença da cepa de *E. coli* V27 (V27) (quadrado fechado), cepa de *E. coli* J96 (J96) (triângulo invertido fechado) e controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado). Média +/- de desvio padrão, * $p < 0.05$, $n = 5$.

6.6 Perfil de moléculas co-estimuladoras e inibição em DCs

Observando então a capacidade de infectar as DCs das bactérias UPECs, levantou-se a hipótese de que a infecção por 24h com a bactéria alterava a expressão de moléculas co-estimuladoras importantes no processo de apresentação, ativação das células. Assim, as DCs foram avaliadas quanto à expressão das moléculas de superfície HLA-DR, CD86, CD80, CD40, e de regulação negativa o CD274.

Observou-se uma diminuição da expressão de porcentagem de HLA-DR das células expostas à cepa V27 86,32 (+/-2,61) em relação ao controle positivo 98,48 (+/-0,55), porém não ao controle negativo 96,78 (+/-1,34), nem a cepa J96 86,32 (+/-20,14), os resultados demonstram uma tendência de diminuição da expressão de HLA-DR, uma molécula exclusiva em APCs como as DCs para apresentação de antígenos no contexto de MHC de classe II, (Figura 11A). Não houve nenhuma diferença relevante com médias de 1052 (+/-250,0), 2604 (+/-1004), 1976 (+/-877,30) e 1773 (+/-521,50) para as condições controle negativo, V27, J96 e controle positivo, nesta ordem (Figura 12A). Houve também um decréscimo de expressão da porcentagem de CD86 uma molécula co-estimulatória (B7) nas células que ficaram em contato com as cepas V27 39,46 (+/-14,60) e J96 52,47 (+/-20,22) quando comparadas ao controle positivo 98,42 (+/-0,59) (Figura 11B). Com relação ao MFI, os resultados das médias foram de 199,7 (+/-62,91), 192,9 (+/-63,17) e 1324(+/-529,6) respectivamente e sem diferença para o controle negativo com média de 85,88 (+/-3,54) para porcentagem e 419,8 (+/-165,9) de MFI (Figura 12B). Já para expressão de porcentagem e MFI de CD80 (B7) não houve diferença significativa entre as condições controle negativo com média de porcentagem de 6,09 (+/-3,66), V27 7,47 (+/-3,29), J96 9,24 (+/-6,39) e controle positivo 24,79 (+/-10,83) (Figura 11C) e nas porcentagens e médias para MFI de 78,50 (+/-2,50), 77,30 (+/-3,40), 78,56 (+/-11,83) e 96,26 (+/-11,83) na mesma ordem das condições da porcentagem antes descrita (Figura 12C). Já quanto à molécula CD40, um ligante de ativação de células T, houve uma diminuição da porcentagem de

expressão nas células em contato com a cepa V27 84,32 (+/-5,11) em relação ao controle positivo 99,38 (+/-0,11) ($p < 0.05$), (Figura 11D), não consoante com MFI que teve média de 2139 (+/-951,7) e 2746 (+/-809,6), na mesma ordem (Figura 12D). Entretanto nas condições controle negativo e J96 não houve diferença relevante, com médias de 98,30 (+/-0,97) e 61,23 (+/-22,56) e MFI de 1253 (+/-323,2) e 1544 (+/-696,2) respectivamente às estas condições (Figura 11D e 12D). Por fim, medimos a expressão de CD274 (PDL1/2), uma molécula de inibição da ativação de células T. Somente a infecção com a cepa J96 promoveu diminuição relevante da porcentagem deste marcador de 9,20 (+/-3,72) comparado a média de 70,04 (+/-14,96) do controle positivo ($p < 0.05$) (Figura 11E), resultados compatíveis foram encontrados em MFI com média de 87,12 (+/-2,11) e 227,9 (+/-93,88) na mesma ordem ($p < 0.05$) (Figura 12E). Nas demais condições controle negativo 27,01 (+/-15,19) e V27 12.75 (+/-6,19) de médias de porcentagem e 105,1 (+/-15,42) e 99,46 (+/-8,26) de MFI respectivamente aos valores de porcentagens, não tiveram relevância estatística (Figura 11E e 12E).

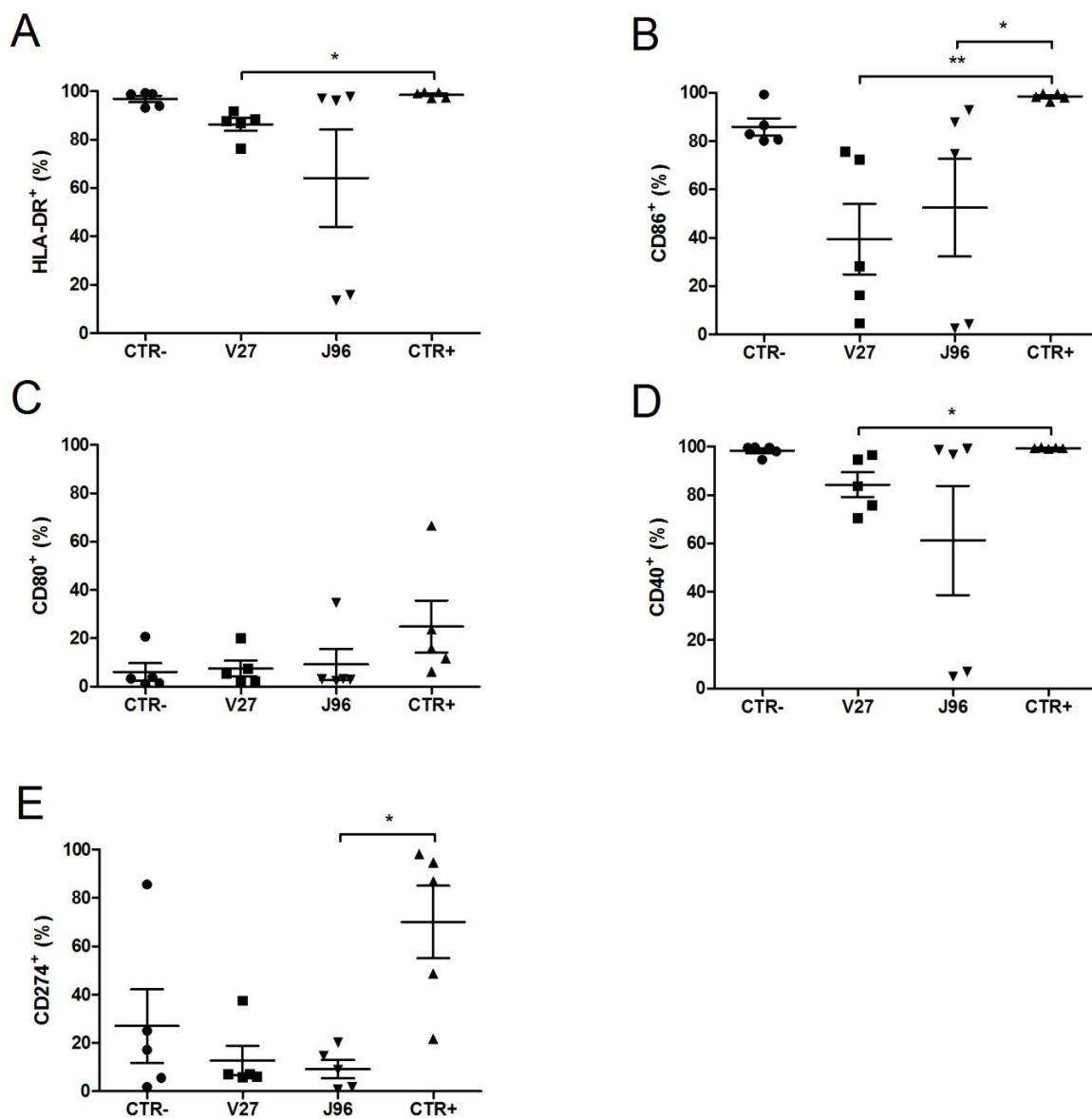


Figura 11 – Expressão percentual de moléculas co-estimuladoras HLA-DR, CD86, CD80, CD40 e CD274 em DCs infectadas por *E. coli*. Expressão percentual das moléculas co-estimuladoras (A) HLA-DR, (B) CD86, (C) CD80, (D) CD40 e (E) CD274, nas condições de controle negativo (CTR-) (círculo fechado), controle positivo (CTR+) (triângulo fechado), na presença da cepa de *E. coli* V27 (V27) (quadrado fechado), cepa de *E. coli* J96 (J96) (triângulo invertido fechado) e controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado), Média +/- de desvio padrão, * $p < 0.05$, $n = 5$.

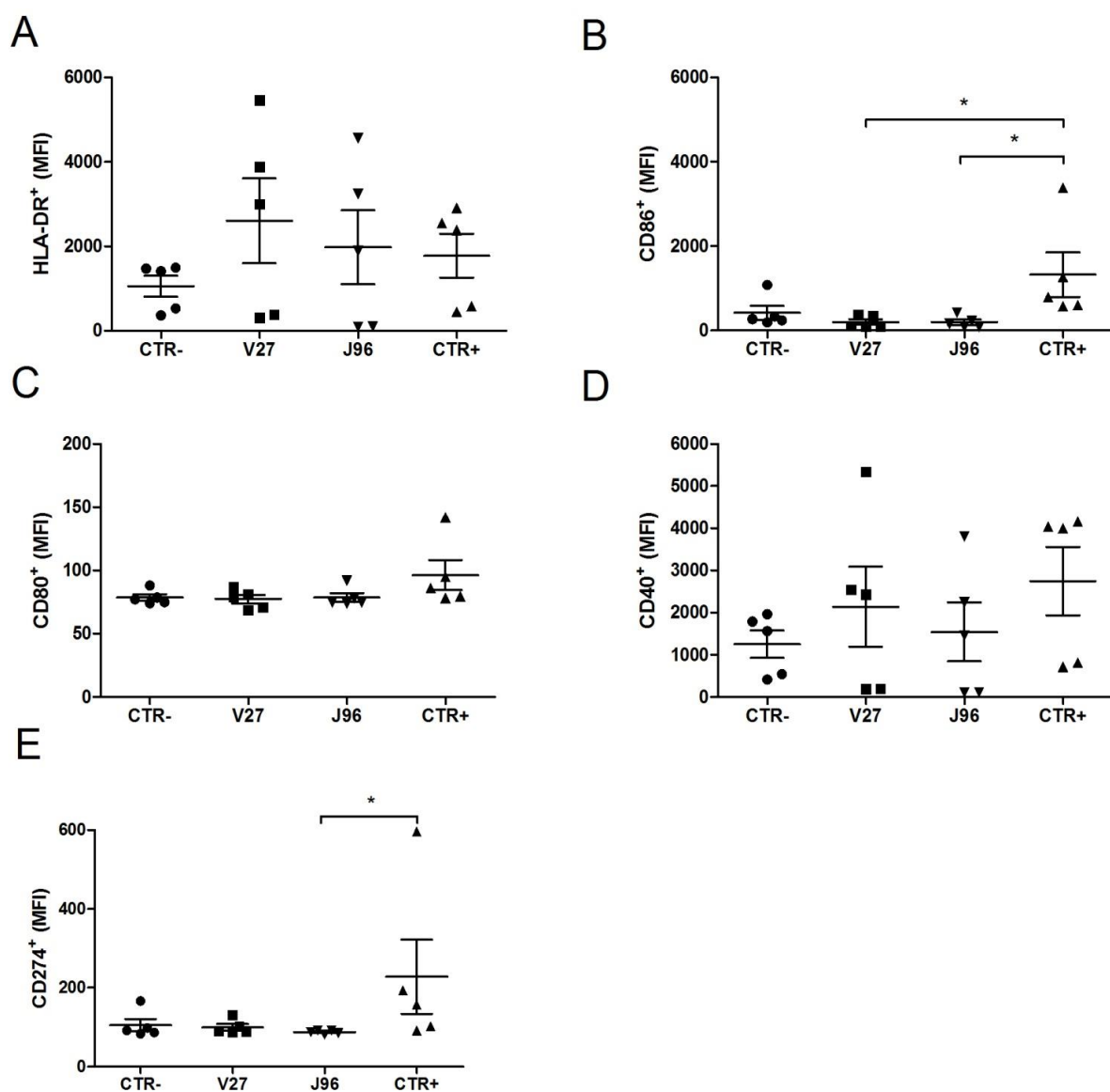


Figura 12 - Média de intensidade de fluorescência de HLA-DR, CD86, CD80, CD40 e CD274 em DCs infectadas com *E. coli*. Média de intensidade de fluorescência (MFI) de HLA-DR (A), CD86 (B), CD80 (C), CD40 (D) e CD274 (E), nas condições de controle negativo (CTR-) (círculo fechado), controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado), na presença da cepa de *E. coli* V27 (V27) (quadrado fechado), cepa de *E. coli* J96 (J96) (triângulo invertido fechado) e controle positivo (CTR+) na presença de LPS (triângulo fechado). Média +/- de desvio padrão, * $p < 0.05$, $n = 5$.

6.7 Detecção de morte celular

Diante da observação de alterações morfológicas drásticas das células infectadas em microscopia óptica, durante a cultura, decidimos avaliar a possibilidade das bactérias induzirem morte celular por apoptose. Para tal avaliação, após a infecção, as DCs foram coletadas e marcadas com Anexina V e PI. Vale ressaltar que para este experimento um controle foi acrescido, o etoposide, para validar o processo de morte celular.

Assim, podemos observar que a cepa V27 parece induzir a morte por apoptose ou um processo de apoptose mais tardia das células dendríticas analisadas uma vez que a porcentagem de células anexina V+ passou de 16,41 (+/-15,42) no controle negativo para 30,38 (+/-4,51) após a interação com a bactéria (+/-4,51) (Figura 13A) e PI⁺ passou de 1,15 (+/-0,19) para 2,49 (+/-1,03) na presença das bactérias 24 horas após a infecção, tendo diferença significativa em na porcentagem de anexina V apenas em relação ao controle positivo 7,714 (+/-1,492) (Figura 13B).

Por outro lado, os experimentos com a cepa J96 parecem demonstrar uma tendência à morte por necrose ou apoptose tardia, com aumento da porcentagem de células dendríticas anexina PI⁺ após 24 horas de infecção. Há um aumento do controle negativo de 1,15 (+/-0,19) para 6,70 (+/-2,40) após a interação com a bactéria, o que não se observa para anexina V+ com médias de 16,41 (+/-9,36) e para o controle negativo, 13,57 (+/-3,31) (Figura 13A).

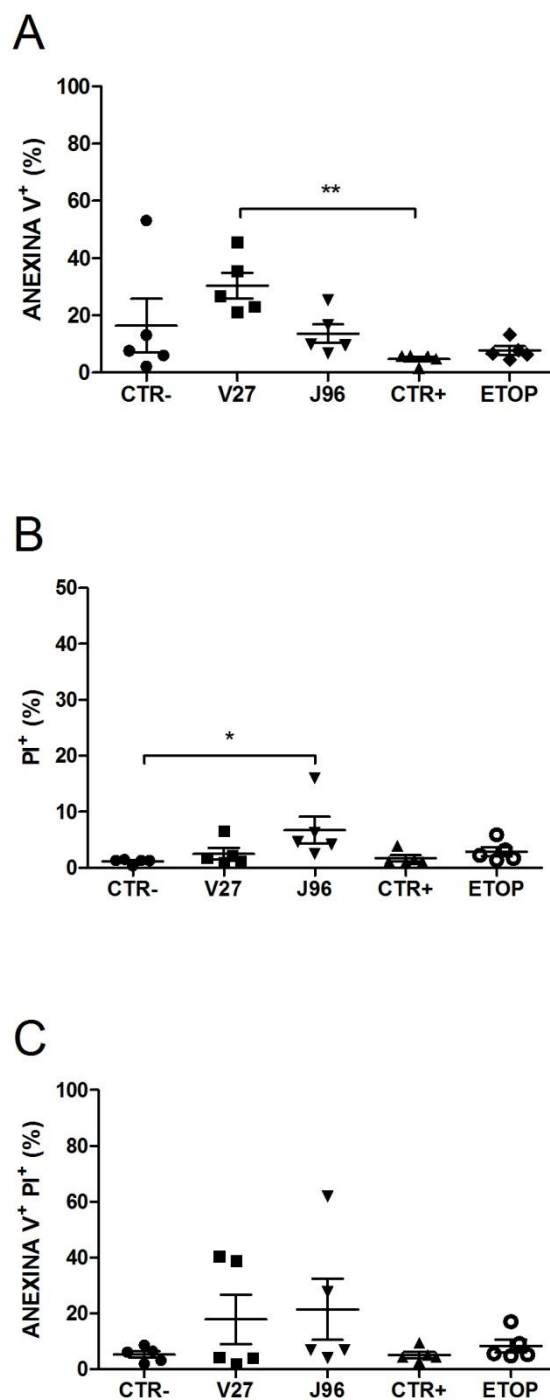


Figura 13 – Análise de morte celular em DCs 24 horas após infecção com *E. coli*. Percentual de marcação de (A) anexina V+, (B) PI+ e Anexina V+PI+ de DCs, nas condições de controle negativo (CTR-) (círculo fechado), na presença da cepa de *E. coli* V27 (V27) (quadrado fechado), cepa J96 (J96) (triângulo invertido fechado) e controle positivo de morte celular (CTR+) com estímulo de etoposide (círculo aberto). Média +/- de desvio padrão, **p<0.05, n=5.

7. DISCUSSÃO

Para a ativação e polarização efetiva das respostas imunes inata e adaptativa, as DCs são APCs essenciais. (SAID; WEINDL, 2015). O estudo da interação de DCs e UPECs assim como suas consequências para a resposta imune do hospedeiro é de extrema relevância para uma melhor compreensão da patogênese dos diferentes espectros de doenças causadas por tais microrganismos. É sabido que nas mucosas temos a presença de diferentes subpopulações de DCs que estão prontas para responder à invasão de patógenos por esta porta de entrada a qualquer momento (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; FISCHER et al., 2006). Diversos estudos comprovam o papel relevante das DCs na resposta a diferentes patógenos bem como mecanismos de escape que envolvem a modulação da biologia de tais células. Assim, neste trabalho procuramos iniciar a elucidação de tais mecanismos, focando na interação inicial entre DCs humanas e duas cepas de UPECs.

Para tal abordagem, utilizamos DCs humanas geradas *in vitro* a partir de monócitos estimulados com IL-4 e GM-CSF e infectadas com cepas diferentes de bactérias *E. coli* uropatogênicas. Após os 30 minutos de interação entre DCs e bactérias, a morfologia habitual das DCs foi drasticamente alterada pelas bactérias (Figura 4A, B e C). As MoDCs tem morfologia única caracterizada pela presença de estruturas semelhantes a dentritos (BOYETTE et al., 2017). Também foi possível verificar a capacidade das duas cepas em infectar as DCs humanas com recuperação de colônias após infecção de 24h (Figura 6).

Há ausência de trabalhos que estudem a interação de DCs e cepas de *E. coli* uropatogênicas, porém outros trabalhos descrevem bactérias que também são intracelulares, tais como a *Salmonella*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Bordetella pertussis* (HOVINGH et al., 2017; LAPAQUE et al., 2009; MADAN-LALA et al., 2014), também apresentam tal capacidade de

interação com DCs humanas. Além disso as UPECs tem como processo característico da patogênese a invasão celular e criação de comunidades intracelulares, utilizando-se de vários fatores de virulência para a instalação e êxito da infecção (ANDERSEN et al., 2012; AZEVEDO et al., 2016; CROXEN; FINLAY, 2009; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TOTSIKA et al., 2012b; ULETT et al., 2013).

Após a infecção das DCs pelas UPECs, partimos para a caracterização fenotípica das DCs após tal contato. Assim, foi realizada primeiramente a detecção da expressão de CD1a na superfície celular por citometria de fluxo. No entanto, a expressão deste marcador somente foi satisfatória nos primeiros dois doadores, excluídos desta análise, por terem sido parte do estabelecimento do protocolo. Foi utilizado um segundo marcador fenotípico de diferenciação de DCs mielóides, o CD11c (BANCHEREAU; STEINMAN, 1998; HARRISON et al., 2012; SAID; WEINDL, 2015; STEINMAN, 2003). Assim, identificamos populações de DCs expressando níveis acima de 90% de marcador CD11c (Figura 5). Vale ressaltar que a aquisição deste marcador demandou tempo e quando foi possível utilizá-lo, já findava o prazo de execução dos experimentos. Porém, novos doadores serão realizados para a elaboração do artigo.

Logo após a caracterização das DCs e infecção com as bactérias, fomos avaliar se a infecção com as UPECs interferia nos marcadores de diferenciação e maturação celular (Figura 8), as porcentagens de CD11c (Figura 8A) apresentaram diminuição em todos os doadores e perda celular na células infectadas com a cepa V27 . Já a molécula CD1a permanece com valores aproximados, apesar da expressão baixa, após a infecção em todas as condições, resultados já encontrados pelo grupo, com outro patógeno intracelular do gênero *Leishmania* (FALCÃO et al., 2016). O comportamento da média de intensidade de fluorescência comparou-se as porcentagens de expressão (Figura 8A, B, e C)

Para avaliarmos a maturação das DCs humanas após a infecção com as duas cepas de *E. coli*, processo este fundamental para a apresentação de

antígenos, medimos então expressão de CD83. As DCs em estágio imaturo têm uma maior habilidade em executar a fagocitose, enquanto que as DCs maduras têm a habilidade em processar e apresentar antígenos. Esta maturação é induzida diretamente pelo reconhecimento e internalização de antígenos, que dispara dentre outros processos a expressão de moléculas de superfície, que permite que as DCs ativem linfócitos T virgens (HARRISON et al., 2012; STEINMAN, 2007). A porcentagem deste marcador revela uma tendência de aumento em todos os doadores e no controle positivo (Figura 7C), corroborando com estudos realizados com *Lactobacillus reuteri*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus gordonii*, nos quais os autores observaram que, após interação com DCs humanas, houve aumento relativo da expressão de CD83, caracterizando uma ativação do processo de maturação de DCs por estas bactérias (HAILESELASSIE et al., 2016; KO et al., 2017).

Considerando a capacidade de reconhecer e internalizar antígenos, uma via importante depende de receptores de lectina tipo C (CLR), já bem estabelecido na literatura. Tais receptores possuem domínios de reconhecimento de hidratos de carbono que lhes permitem ligar-se a estruturas presentes na superfície de muitos patógenos, reconhecendo e permitindo adesão e internalização desses microrganismos. Considerando especificamente a família dos CLRs, o DC-SIGN (CD209) é expresso especificamente por DCs (KOPPEL et al., 2005; ORTIZ et al., 2009).

Nossos experimentos relativos ao CD209 em células não estimuladas, mostraram média de porcentagem de expressão acima de 60%, valor satisfatório para DCs. Estes valores exibem uma tendência à diminuição após infecção com as duas cepas de bactérias analisadas, apesar de somente a cepa J96 apresentar diferença estatística na porcentagem de expressão (Figura 9C), enquanto no MFI as duas cepas apresentam valores diminuídos de CD209 (Figura 10C). Esta diminuição pode sugerir a fagocitose das bactérias via CD209, uma vez que estes receptores podem ser internalizados junto com o microrganismo fagocitado. Resultados

semelhantes foram encontrados com *Lactobacillus reuteri* infectando DCs diferenciadas a partir de monócitos, *Helicobacter pylori* infectando monócitos e posteriormente levados a diferenciação em DCs também apresentou regulação negativa em DC-SIGN (FEHLINGS et al., 2012; HAILESELASSIE et al., 2016).

Após reconhecimento e internalização, os antígenos serão processados e apresentados às células T. Assim, as DCs precisam migrar da periferia até o linfonodo, processo este dependente de CCR7 e CD62L como demonstrado DCs no modelo murino (CHEONG et al., 2011; OHL et al., 2004). Nossos níveis de expressão de CD62L exibiram tendência à diminuição após a infecção com as duas cepas (Figura 9A). Já as médias de expressão de CCR7 demonstram leve aumento quando estimulamos as DCs com as bactérias (Figura 9B). Esses dados estão em contraste com estudos nos quais a expressão de CCR7 é aumentada em DCs humanas interagindo com *L. reuteri*, *S. aureus* e *H. pylori* (FEHLINGS et al., 2012; HAILESELASSIE et al., 2016). Resultados semelhantes em estudos com *Salmonella* reafirmam o papel de CCR7 na migração de DCs para o linfonodo (CARDEN et al., 2017; FEHLINGS et al., 2012; HAILESELASSIE et al., 2016).

Outra característica das DCs maduras é a expressão de altos níveis de MHC e de moléculas co-estimulatórias, aumentando sua habilidade em apresentar antígenos e também de estimular as células T virgens, após a entrada no linfonodo drenante. Como mecanismo de escape, alguns microrganismos inibem a apresentação via moléculas de MHC para escapar do sistema imune adaptativo (FONTENEAU et al., 2003; SALLUSTO; LANZAVECCHIA, 1994). É descrito que *T. cruzi* modula especificamente a sua infecção através de um mecanismo desconhecido de pós-transcrição que inibe a expressão dos componentes da via de MCH de classe I em células HeLa (CAMARGO et al., 2014). Nossos resultados mostram uma tendência à diminuição da porcentagem e MFI da expressão de HLA-DR (Figura 11A e 12A), que nos leva a levantar a hipótese que as UPECs

subvertem a ativação da resposta imune adaptativa. Um estudo com DCs plasmocitoides reforça o papel essencial de MHC-II na apresentação de antígenos (DASGUPTA et al., 2014). *E. coli* modificada infectando DCs derivadas de DCs bovinas, apresentou uma menor expressão de HLA-DR (HAJAM et al., 2015). O mesmo padrão se repete em *L. infantum* infectando DCs humanas, onde os autores observaram uma diminuição de HLA-DR (FALCÃO et al., 2016).

O reconhecimento de antígenos via MHC então é o primeiro sinal de ativação de linfócitos, um segundo sinal é essencial para esta ativação: as moléculas co-estimulatórias. Dentre essas moléculas estão vários membros da superfamília B7, tais como B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que estimulam ou inibem a ativação de células T, respectivamente, após a ligação com CD28 ou CTLA-4 nas células T. A interação CD40/CD40L aumenta a potência de ativação do sistema imune das APCs (ABBAS ABUL K.; LICHTMAN;; PILLAI, 2012; FONTENEAU et al., 2003; STEINMAN, 2003). Assim, avaliamos então a expressão de CD80, CD86 e CD40 de DCs infectadas com as UPECs. Obtivemos resultados com tendência de aumento de CD80 (11C e 12C) e diminuição da média de expressão de CD86 (Figura 11B e 12B), já para CD40 houve uma grande variação com apenas dois doadores diminuindo células expressando CD40 após a infecção com as UPECs (Figura 11D e 12D). Resultado semelhante foi encontrado com CD80 em DCs humanas colocadas em contato com *Escherichia coli* K12, *Lactobacillus rhamnosus* e *M. capsulatus*, mostrando uma indução no aumento da expressão de CD80 e CD40 (INDRELID et al., 2017),. Tais dados diferem de resultados encontrados com *Leishmania amazonensis*, onde os achados foram inversamente proporcionais (FAVALI et al., 2007), Por outro lado, estudos em DCs bovinas infectadas com *E. coli* modificada, as duas populações expressando CD80 e CD83 estão aumentadas (HAJAM et al., 2015). Estes achados terão que ser repetidos, uma possível solução seria utilizarmos doadores conhecidos em triplicatas, para descartarmos uma possível variação genética. A avaliação de expressão de CD274 (PDL1/2), uma molécula de inibição da ativação de células T teve suas expressões

bastante variadas, ora aumentado, ora diminuindo. Dados com *H. pylori* interagindo com DCs humanas, porém mostram um aumento de células expressando PDL1. (FEHLINGS et al., 2012). Achados semelhantes foram também encontrados com DCs humanas e *Neisseria gonorrhoeae*, onde se confirmou aumento de PDL1 e conseguinte inibição de células T (ZHU et al., 2012).

Além de seu papel na resposta imune inata, as DCs ajudam na depuração de células apoptóticas na periferia. Após a absorção de células em apoptose ou corpos apoptóticos, as DCs mantêm um fenótipo imaturo e induzem efeitos imunomoduladores. Estas DCs regulam negativamente a expressão de moléculas co-estimulatórias como CD80 e CD86 e produzem TGF- β , uma citocina necessária para a diferenciação de células T virgens para T reguladoras (SAID; WEINDL, 2015). Em contraste, a captação de células necróticas estimula a maturação e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Para o reconhecimento e captura de uma célula em apoptose é necessário o reconhecimento de moléculas que sinalizem a necessidade de eliminação e receptores de fagocitose. Uma das principais moléculas sinalizadoras é a fosfatidilserina (PS) que é translocada para a face externa da membrana plasmática de células apoptóticas. PS pode ser reconhecida por vários receptores (LI; HE, 2012), sua ligação com anexina V permite a avaliação do processo de apoptose por citometria de fluxo. Quando analisada em conjunto com a marcação por PI, caracterizando células viáveis, em apoptose inicial e células não viáveis devido a morte celular por necrose.

Como já citado anteriormente, alguns patógenos desenvolveram estratégias que induzem apoptose em Dcs, interferindo na apresentação de antígenos bem como na ativação de linfócitos T. Diante da observação de alterações morfológicas tais como: morfologia totalmente alterada, perda severa do número de células do poço. A avaliação da morte celular foi de suma importância na tentativa de entendimento da dinâmica da infecção pelas cepas V27 e J96. Assim, as células foram classificadas de acordo com

a marcação em células em apoptose (AnexinaV+/PI-), em necrose (AnexinaV-/PI+) e apoptose tardia/necrose (AnexinaV+/PI+). Nossos dados demonstram que aparentemente a cepa V27 induz a morte por apoptose ou um processo de apoptose mais tardia das DCs (Figura 11A). Já a cepa J96 parece mostrar uma tendência à morte por necrose ou apoptose tardia, (Figura 11A). O processo de apoptose celular pelas UPECs é bem descrito na patogênese da infecção e na interação com hospedeiros humanos em células epiteliais (TOTSIKA et al., 2012b; ULETT et al., 2013). Dentre diversos estudos do processo de morte celular, podemos citar a *Salmonella* induzindo morte celular por apoptose em células epiteliais (KNODLER; FINLAY; STEELE-MORTIMER, 2005), o mesmo efeito de indução de apoptose e necrose regulada por caspase-2, em DCs de murinos foi relatado com a bactéria *Brucella abortus* (LI; HE, 2012).

8 Conclusão

As cepas de UPECs J96 e V27 são capazes de infectar *in vitro* células dendríticas humanas derivadas de monócitos no estado imaturo, regulando negativamente a expressão de DC-SIGN, moléculas co-estimulatórias como o CD86, além de regularem de forma diferente, porém comprometendo a sobrevivência dessas células. Assim, temos aqui o primeiro relato científico das alterações geradas pelas interações iniciais de UPECs e DCs que podem comprometer a resposta imune inata e conseqüentemente a resposta adaptativa em humanos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS-TOEGAERT, C. et al. CD83 expression on dendritic cells and T cells: Correlation with effective immune responses. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 3, p. 686–695, 2007.

ANDERSEN, T. E. et al. Escherichia coli uropathogenesis In vitro: Invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 5, p. 1858–1867, 2012.

AZEVEDO, M. et al. Trade-Offs of Escherichia coli Adaptation to an Intracellular Lifestyle in Macrophages. **Plos One**, v. 11, n. 1, p. e0146123, 2016.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. v. 392, n. March, p. 245–252, 1998.

BATISTA, F.; HARWOOD, N. Antigen presentation to B cells. **F1000 Biology Reports**, v. 2, n. December, p. 3–7, 2010.

BOYETTE, L. B. et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0176460, 2017.

CAMARGO, R. et al. Trypanosoma cruzi infection down-modulates the immunoproteasome biosynthesis and the MHC class I cell surface expression in HeLa cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–12, 2014.

CARDEN, S. E. et al. Pseudogenization of the Secreted Effector Gene *ssel* Confers Rapid Systemic Dissemination of *S. Typhimurium* ST313 within Migratory Dendritic Cells. **Cell Host & Microbe**, v. 21, n. 2, p. 182–194, 2017.

CHEN, S. L. et al. Genomic diversity and fitness of *E. coli* strains recovered from the intestinal and urinary tracts of women with recurrent urinary tract infection. **Science translational medicine**, v. 5, n. 184, p. 184ra60, 2013.

CHEONG, C. et al. NIH Public Access. v. 143, n. 3, p. 416–429, 2011.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R., & LAPPIN SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711–745, 1995.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. January, 2009.

DASGUPTA, S. et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 4, p. 413–23, 2014.

DOYLE, M. P. et al. *E. coli*: Good, Bad, & Deadly. **American Academy of Microbiology**, p. 1–16, 2011.

DUELL, B. L. et al. Innate Transcriptional Networks Activated in Bladder in Response to Uropathogenic *Escherichia coli* Drive Diverse Biological Pathways and Rapid Synthesis of IL-10 for

Defense against Bacterial Urinary Tract Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 781–792, 2012.

ELKORD, E. et al. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. **Immunology**, v. 114, n. 2, p. 204–212, 2005.

FALCÃO, S. DE A. C. et al. Leishmania infantum and Leishmania braziliensis: Differences and similarities to evade the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2016.

FAVALI, C. et al. Leishmania amazonensis infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 6, p. 1401–6, 2007.

FEHLINGS, M. et al. Comparative analysis of the interaction of Helicobacter pylori with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 8, p. 2724–2734, 2012.

FERLAZZO, G.; MORANDI, B. Cross-talks between natural killer cells and distinct subsets of dendritic cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. APR, p. 1–7, 2014.

FISCHER, H. et al. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 267–277, 2006.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options.

Nature Reviews Microbiology, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015a.

FLORES-MIRELES, A. L. et al. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 269–284, 2015b.

FONTENEAU, J. F. et al. Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4448–4455, 2003.

EGINAT, J. et al. Immunity to pathogens taught by specialized human dendritic cell subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. OCT, p. 1–13, 2015.

GETTI, G. T.; CHEKE, R. A; HUMBER, D. P. Induction of apoptosis in host cells: a survival mechanism for Leishmania parasites? **Parasitology**, v. 135, n. 12, p. 1391–9, 2008.

GIRARDINI, L. K. et al. Phylogenetic and pathotype analysis of Escherichia coli swine isolates from Southern Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 374–378, 2012.

GOTO, T. et al. Bacterial biofilms and catheters in experimental urinary tract infection. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 11, n. 3–4, p. 227–231, 1999.

HAILESELASSIE, Y. et al. Lactobacillus reuteri and Staphylococcus aureus differentially influence the generation of monocyte-derived dendritic cells and subsequent autologous T cell responses. **Immunity, inflammation and disease**, v. 4, n. 3, p. 315–26, 2016.

HAJAM, I. A. et al. Bacterial Ghosts of *Escherichia coli* Drive Efficient Maturation of Bovine Monocyte-Derived Dendritic Cells. p. 1–15, 2015.

HANNAN, T. J. et al. NIH Public Access. v. 36, n. 3, p. 616–648, 2013.

HARRISON, O. J. et al. Dendritic Cells : Arbiters of Immunity and Immunological Tolerance Dendritic Cells : Arbiters of Immunity and. 2012.

HOVINGH, E. S. et al. Emerging *bordetella pertussis* strains induce enhanced signaling of human pattern recognition receptors tlr2, nod2 and secretion of il-10 by dendritic cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–21, 2017.

INDRELID, S. et al. The Soil Bacterium *Methylococcus capsulatus* Bath Interacts with Human Dendritic Cells to Modulate Immune Function. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. February, p. 1–13, 2017.

JOHNSON, J. R. et al. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 3040–3047, 2000.

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

KNODLER, L. A.; FINLAY, B.; STEELE-MORTIMER, O. The

Salmonella effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 10, p. 9058–9064, 2005.

KO, E. B. et al. Serine-Rich Repeat Adhesins Contribute to Streptococcus gordonii-Induced Maturation of Human Dendritic Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. March, p. 1–10, 2017.

KONO, D. H.; BACCALA, R.; THEOFILOPOULOS, A. N. TLRs and interferons: A central paradigm in autoimmunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 720–727, 2013.

KOPPEL, E. A. et al. Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 157–165, 2005.

KOZIEL, J. et al. Phagocytosis of Staphylococcus aureus by macrophages exerts cytoprotective effects manifested by the upregulation of antiapoptotic factors. **PLoS ONE**, v. 4, n. 4, 2009.

KUHN, S.; YANG, J.; RONCHESE, F. Monocyte-Derived Dendritic Cells Are Essential for CD8+ T Cell Activation and Antitumor Responses After Local Immunotherapy. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. November, p. 1–14, 2015.

LUTHJE, P.; BRAUNER, A. Virulence Factors of Uropathogenic E. coli and Their Interaction with the Host. **Advances in Microbial Physiology**, v. 65, p. 337–372, 2014.

LAPAQUE, N. et al. Salmonella regulates polyubiquitination and surface expression of MHC class II antigens. **Proceedings of the**

National Academy of Sciences of the United States of America, v. 106, n. 33, p. 14052–7, 2009.

LI, X.; HE, Y. Caspase-2-dependent dendritic cell death, maturation, and priming of T cells in response to *Brucella abortus* infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

LO, D. S. et al. Community-acquired urinary tract infection: age and gender-dependent etiology. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 2, p. 93–98, 2013.

MADAN-LALA, R. et al. Mycobacterium tuberculosis impairs dendritic cell functions through the serine hydrolase Hip1. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 192, n. 9, p. 4263–72, 2014.

NAGAMATSU, K. et al. Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201500374, 2015.

NORMARK, S. et al. Genetics of diagalactoside-binding adhesin from a uropathogenic *Escherichia coli* strain. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 942–949, 1983.

NORRIS, D. L.; YOUNG, J. D. Urinary Tract Infections: Diagnosis and Management in the Emergency Department. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 413–430, 2008.

OHL, L. et al. CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions. **Immunity**, v. 21, n. 2,

p. 279–288, 2004.

OLSON, P.; HUNSTAD, D. Subversion of Host Innate Immunity by Uropathogenic *Escherichia coli*. **Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 2, 2016.

ORTIZ, M. et al. NIH Public Access. **Genes Immun.**, v. 9, n. 6, p. 483–492, 2009.

PARK, B. S.; LEE, J.-O. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. **Experimental & molecular medicine**, v. 45, n. 12, p. e66, 2013.

RANDOLPH, G. J.; ANGELI, V.; SWARTZ, M. A. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. **Nature reviews. Immunology**, v. 5, n. 8, p. 617–28, 2005.

RILEY, L. W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 380–390, 2014.

ROSEN, D. A. et al. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. **PLoS Medicine**, v. 4, n. 12, p. 1949–1958, 2007.

SAID, A.; WEINDL, G. Regulation of Dendritic Cell Function in Inflammation. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, 2015.

SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 4, p. 1109–18, 1994.

SANCHEZ, A. et al. Mycobacterium tuberculosis 38-kDa lipoprotein is apoptogenic for human monocyte-derived macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 2009.

SEITZ, M. et al. Role of capsule and suilysin in mucosal infection of complement-deficient mice with Streptococcus suis. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 6, p. 2460–2471, 2014.

SETH, S. et al. CCR7 Essentially Contributes to the Homing of Plasmacytoid Dendritic Cells to Lymph Nodes under Steady-State As Well As Inflammatory Conditions. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 6, p. 3364–3372, 2011.

SHARPE, A. H. et al. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. **Nature immunology**, v. 8, n. 3, p. 239–45, 2007.

STEINMAN, R. M. The control of immunity and tolerance by dendritic cells. **Pathologie Biologie**, v. 51, n. 2, p. 59–60, 2003.

STEINMAN, R. M. Dendritic cells: Understanding immunogenicity. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 53–60, 2007.

TOTSIKA, M. et al. Uropathogenic Escherichia coli mediated urinary tract infection. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 11, p. 1386–1399, 2012a.

TOTSIKA, M. et al. Uropathogenic Escherichia coli mediated urinary tract infection. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 11, p. 1386–1399, 2012b.

ULETT, G. C. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 100–107, 2013.

WHO. Antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–94, 2014.

ZHU, W. et al. *Neisseria gonorrhoeae* suppresses dendritic cell-induced, antigen-dependent CD4 T cell proliferation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

10. APÊNDICE

10.1 Apêndice 1


MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA
COORDENAÇÃO GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS

AUTORIZAÇÃO PARA FORNECIMENTO DE HEMOCOMPONENTES PARA A INDÚSTRIA

Nº Autorização: 008	Data: 24/04/2012
Instituição Favorecida: Fundação Hemocentro de Brasília	
<p>Em atendimento ao Art. 26, § 2º da Portaria nº 1353, de 14/06/2011, a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados foi notificada pela Fundação Hemocentro de Brasília - que estará fornecendo 100 bolsas de concentrado de leucócitos, que serão utilizadas em projetos de pesquisa em imunologia, pelo Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.</p> <p>Destacamos a necessidade de atendimento ao Art. 199, § 4º, da Constituição: "a lei disporá sobre as condições e os requisitos que facilitem a remoção de órgãos, tecidos e substâncias humanas para fins de transplante, pesquisa e tratamento, bem como a coleta, processamento e transfusão de sangue e seus derivados, sendo vedado todo tipo de comercialização."</p>	
<p>Lista de documentos analisados:</p> <p>1. Cadastro: (X) Sim () Não</p> <p>2. Alvará da empresa: ()</p> <p>3. Autorização da Anvisa: ()</p>	
Técnico responsável pela análise: Lydia Marcia de Melo França - CGSH/DAE/SAS/MS	Vigência da autorização: 19/04/2012 a 19/04/2013.

Atenciosamente,


GUILHERME GENOVEZ
 Coordenador Geral de Sangue e Hemoderivados

*79 PDDA
 por 100 leucócitos
 - análise 27/4/2012*

*2012
 Fundação Hemocentro de Brasília
 Direção Especializada*

Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados
 Brasília, 27 de Abril de 2012 - Sala 201 CEP: 70076-600 Brasília DF
 Telefone: (61) 3315-6100 e Fax: (61) 3315-6101
 www.sa.gov.br

27/4/2012 14:50
 Nome: *SB* Nº: 1401971
 Presidência