

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

**A PROTEÍNA PIC PRODUZIDA POR *Escherichia coli* INDUZ
SEPSE LETAL EM MODELO MURINO**

ITAYNARA LOBATO DUTRA

São Luís
2018

ITAYNARA LOBATO DUTRA

**A PROTEÍNA PIC PRODUZIDA POR *Escherichia coli* INDUZ
SEPSE LETAL EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior

São Luís
2018

Dutra, Itaynara Lobato.

A PROTEÍNA PIC PRODUZIDA POR *Escherichia coli* INDUZ
SEPSE LETAL EM MODELO MURINO / Itaynara Lobato Dutra. -
2018.

78 f.

Orientador(a): Afonso Gomes Abreu.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2018.

1. *Escherichia coli*. 2. Pic. 3. Sepsis. 4.
Serinaprotease. I. Abreu, Afonso Gomes. II. Título.

ITAYNARA LOBATO DUTRA

**A PROTEÍNA PIC PRODUZIDA POR *Escherichia coli*
INDUZ SEPSE LETAL EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Junior (Presidente)
Universidade CEUMA / Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Valério Monteiro Neto
Universidade CEUMA / Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Luís Cláudio Nascimento da Silva
Universidade CEUMA

Profa. Dra. Marcia Cristina Gonçalves Maciel
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me sustentado e guiado nessa trajetória e por sempre estar presente em todos os momentos;

À minha família (Isaias S. Dutra, Imaran L. Dutra, Isamara L. Dutra, Michael J. C. Santos) por estarem sempre ao meu lado, de mim cuidando nos momentos de necessidade, incentivando nos momentos de dificuldade e tolerando nos momentos de desespero. Por tudo isso e muito mais, vós também sois participantes desta conquista;

Ao meu orientador, professor Dr. Afonso Gomes Abreu Junior, pela oportunidade de ingressar neste programa de mestrado, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e exemplo de determinação, profissionalismo e companheirismo. Além de orientador, um grande amigo!!!

Às profas. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento e Dra. Marcia Cristina Gonçalves Maciel pela avaliação na banca de qualificação do mestrado, pelas valiosas correções, discussões científicas e grande aprendizado;

Aos componentes da banca defesa do mestrado pelo aceite do convite e pelas contribuições de cunho científico com este trabalho;

Aos colaboradores deste projeto de pesquisa (André Á. M. Vale; Eduardo M. Sousa; Flávia R. F. Nascimento; Johnny R. Nascimento; Liana de O. Trovão; Lucilene A. Silva; Márcia C. G. Maciel; Patrícia C. S. Alves; Raissa G. Assunção; Yago A. Lima), sem os quais a execução deste trabalho seria bem mais difícil. Obrigada pelo tempo e esforço dedicado ao nosso experimento;

À família do Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da UFMA por todo apoio técnico operacional e instruções científicas. Muito obrigada pelo acolhimento e auxílio. Em especial, agradeço aos lifianos e colegas de mestrado (Aluísio da S. Oliveira, André Á. M. Vale, Jefferson M. Brito, Liana de O. Trovão, Lillian N. Gomes, Luis Douglas M. Silva, Patricia C. S. Alves) os quais me socorreram em vários momentos e sempre estavam dispostos a ajudar/ensinar. Vocês são profissionais excelentes e diferenciados; o sucesso é o destino de vocês!!!

Aos amigos que conquistei neste mestrado, em especial aqueles com quem convivi mais de perto (Antonia C. D. Brito, Carla C. Rocha, Francisco F. M. Júnior, Maria Gabriela S. Lira, Ranielly A. Nogueira, Uiara R. S. Lima). Agradeço pelo companheirismo, apoio e bons momentos compartilhados;

Aos colegas de profissão, os profissionais do Laboratório de Estudos Genômicos e Histocompatibilidade (LEGH-HUUFMA) pela amizade, suporte e compreensão em momentos de difícil conciliação entre as atividades laboral e do mestrado;

À minha chefia imediata Karina Fook por sempre apoiar e incentivar este propósito, flexibilizar meus horários de trabalho e pela compreensão com a qual sempre nos lidera;

À FAPEMA, Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento científico e tecnológico do Maranhão, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1.	Introdução	13
2.	Referencial teórico.....	15
2.1	<i>Escherichia coli</i>	15
2.2	Sepse	16
2.2.1	Definição e epidemiologia	16
2.2.2	Fisiopatologia	18
2.2.2.1	Infecção e Resposta imune inicial	18
2.2.2.2	Desregulação da resposta imune e inflamação sistêmica	21
2.3	Proteases	24
2.4	Pic (proteína envolvida na colonização)	26
3.	Objetivos.....	28
3.1	Objetivo Geral.....	28
3.2	Objetivos específicos.....	28
4.	Resultados	
	CAPÍTULO I. The serinaprotease Pic secreted by <i>Escherichia coli</i> induces an intense immune response and death in a murine model of sepsis.....	29
5.	Considerações finais	66
6.	Conclusões	67
	Referências Bibliográficas	68
	ANEXOS.....	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
CBA	Cytometric Bead Array
CEUA	Comissão de Ética no Uso Animal
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas
DIC	Coagulação intravascular disseminada
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESICM	European Society of Critical Care Medicine
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinal
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ip.	Intraperitoneal
iKB	Inibidor do fator Kappa B
IL	Interleucina
INF	Interferon
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de ataque à membrana

MC	MacConkey
MCP	Proteína quimiotática de monócitos
MFI	Intensidade mediana de fluorescência
MIF	Fator inibitório de migração de neutrófilos
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NaOH	Hidróxido de Sódio
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NF-kB	Fator nuclear kB
NK	Natural <i>killer</i>
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução tamponada com fosfato
Pic	Proteína envolvida na colonização
PMA	Acetato Miristato de Forbol
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
qSOFA	Quick Sequential Organ Failure Assessment
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SPATE	Serina protease autotransportadora de Enterobacteriaceae
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga
TLR	Receptores tipo <i>toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TSB	Caldo de soja tripticase
CFU	Unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escore SOFA	17
Tabela 2. Painel de marcadores para células do baço	50
Tabela 3. Painel de marcadores para células do lavado peritoneal	50
Tabela 4. Avaliação histopatológica do baço, fígado e rins dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Hipóteses para os mecanismos de ação e contribuições de Pic na sepse	14
Figura 02. Estrutura geral das proteínas autotransportadoras	25
Figura 03. Curva de sobrevivência dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica	52
Figura 04. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) das amostras do sangue e lavado peritoneal dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica	53
Figura 05. Contagem de UFCs das amostras do baço, fígado e pulmão dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica	54
Figura 06. Contagem diferencial das células sanguíneas dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica	55
Figura 07. Contagem do número total de células da medula óssea dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica	56
Figura 08. Contagem do número total de células do peritônio dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle	57
Figura 9. Intensidade mediana de fluorescência (MFI) da molécula CD28 em linfócitos T CD4+ oriundos do baço	58

Figura 10. Intensidade mediana de fluorescência (MFI) das moléculas CD80 e CD86 em macrófagos oriundos da cavidade peritoneal.....	59
Figura 11. Intensidade mediana de fluorescência (MFI) da enzima oxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos CD80+ e CDD86+ oriundos da cavidade peritoneal	60
Figura 12. Concentração de citocinas no soro dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica	61
Figura 13. Concentração de citocinas no lavado peritoneal dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle	62
Figura 14. Produção de Óxido Nítrico no sangue dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica	63
Figura 15. Mecanismos que justificam a falha no controle bacteriano no grupo F5	64
Figura 16. Síntese dos processos envolvidos na indução de sepse letal por bactérias produtoras de Pic	65

RESUMO

Algumas linhagens de *Escherichia coli* são patógenos responsáveis por uma variedade de doenças e, embora usando mecanismos distintos de patogênese, têm em comum a produção da Proteína envolvida na colonização (Pic). Recentemente nosso grupo mostrou que Pic medeia a evasão do sistema imune pela clivagem direta de moléculas do sistema complemento, reduzindo a ativação deste em todas as três vias. O objetivo deste estudo foi investigar a ação de Pic em um modelo murino de sepse. Camundongos fêmeas da linhagem Swiss entre 6-8 semanas receberam um inóculo intraperitoneal de suspensões bacterianas contendo *E. coli* produtora de Pic (F5), o mutante F5 Δ pic, ou uma injeção de água apirogênica. A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 5 dias (n=6 animais/grupo). A outra parte dos animais (n=6 animais/grupo) foi eutanasiada 12 h após a infecção para obtenção das amostras de sangue, lavado peritoneal e órgãos. Os parâmetros avaliados foram: a quantidade de células do sangue, cavidade peritoneal e órgãos; produção de mediadores inflamatórios; determinação das unidades formadoras de colônias (UFCs); imunofenotipagem de células do baço e peritônio; e histopatologia dos órgãos. A inoculação intraperitoneal de bactérias produtoras de Pic induziu a morte de 100% dos animais em até 24h, diferente dos demais grupos entre os quais não foi observada mortalidade. A quantidade de UFCs dos órgãos foi mais alta no grupo F5 que nos outros grupos. Além disso, apenas F5 permaneceu viável na corrente sanguínea. O hemograma mostrou uma redução no número total de leucócitos, especialmente de linfócitos, nos animais do grupo F5 quando comparado aos demais grupos. Óxido nítrico, citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10) e a quimiocina MCP-1 foram detectadas no soro, bem como no lavado peritoneal (exceto IL-12) do grupo F5 de modo mais acentuado que nos demais grupos. A imunofenotipagem das células do baço e peritônio evidenciou que houve uma baixa expressão de co-receptores em linfócitos e macrófagos no grupo F5, indicando que a ativação e a função destes foi comprometida. Esses resultados demonstram que Pic representa um importante fator de virulência, permitindo a sobrevivência da bactéria na corrente sanguínea e vários órgãos, assim como induzindo a alta produção de mediadores pró-inflamatórios pelo hospedeiro, levando à sepse e morte.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; Pic; serinaprotease; sepse.

ABSTRACT

Some *Escherichia coli* strains are pathogens responsible for a variety of diseases, and albeit using distinct mechanisms of pathogenesis, have in common the production of Pic, or protein involved in colonization. We have recently shown that Pic mediates immune evasion by the direct cleavage of complement molecules, significantly reducing complement activation by all three pathways. The aim of this study was to investigate the action of Pic in a murine model of sepsis. Six to eight-week-old female Swiss mice were intraperitoneally inoculated with Pic-producing *E. coli* (F5), F5 Δ pic mutant or apyrogenic water (control). Animal survival was monitored for 5 days (n= 6 animals/group) and a subset of mice (n= 6 animals/group) was euthanized after 12 h for sample acquire from blood, peritoneal lavage and organs. The parameters evaluated were cellularity from blood, peritoneal cavity and organs; inflammatory mediators production; quantity of colony forming units (CFU's); immunophenotyping of cells from spleen and peritoneum; and histopathology of organs. Intraperitoneal inoculation of Pic-producing bacteria induced 100% death within 24 h, different from the other groups where no death was observed. The CFU count of bacteria in the organs was significantly higher in F5 than other groups. Besides, only F5 was viable on bloodstream. Hematological analysis showed a decrease of total leukocytes, mainly lymphocytes. NO and cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10 and MCP-1) were detected in serum, as well as on peritoneal lavage (excepting IL-12) of F5 group in significantly higher levels than other groups. Immunophenotyping of spleen and peritoneum cells revealed that there was a low expression of co-receptors on lymphocytes and macrophages in F5 group, indicating that the activation and function of these were compromised. Therefore, these results evidenced that Pic represents an important virulence factor, allowing the survival of the bacterium on bloodstream and several organs, as well as inducing a high production of pro-inflammatory mediators by the host, leading to a sepsis and death.

Keywords: *Escherichia coli*; Pic; serineprotease; sepsis.

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli patogênicas são responsáveis por uma variedade de doenças que afetam desde o trato gastrointestinal - a exemplo da diarreia que é a segunda causa de morte entre crianças menores de cinco anos em países em desenvolvimento - até focos extra-intestinais, como o trato urinário, a corrente sanguínea e o sistema nervoso central (CROXEN et al., 2013; World Health Organization, 2016). Essas cepas de *E. coli* são capazes de transpor a barreira epitelial, levando a invasão e migração bacteriana para o trato urinário, podendo também eventualmente alcançar a corrente sanguínea e se disseminar para os mais diversos tecidos do hospedeiro, causando bacteremia e sepse (ABREU; BARBOSA, 2017).

A sepse consiste em uma disfunção orgânica ameaçadora à vida, secundária à resposta desregulada do organismo a uma infecção (SINGER et al, 2016), representando um grave problema de saúde pública mundial, devido a sua alta taxa de mortalidade e em razão do seu difícil e oneroso tratamento (MIQUELIN; REIS, 2016; RULIM et al., 2017). Tanto bactérias Gram-positivas quanto as Gram-negativas podem estar envolvidas no processo de sepse, estando as cepas de *E. coli* entre as potenciais bactérias Gram-negativas causadoras de sepse (MAYR et al., 2014). Vários são os fatores de virulência produzidos por esta bactéria, dentre os quais pode-se destacar a produção de serinaproteases, a exemplo da Proteína envolvida na colonização (Pic). Essa proteína possui diversos papéis biológicos, incluindo hemaglutinação, atividade mucinolítica, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem tanto de glicoproteínas de superfície de leucócitos como de moléculas do sistema complemento (HENDERSON et al., 1999; RUIZ-PEREZ et al., 2011; ABREU et al., 2015).

Tais propriedades biológicas, especialmente a degradação de glicoproteínas superficiais de leucócitos e moléculas do sistema complemento, sugerem que essa serinaprotease habilita a bactéria que a produz a evadir-se do sistema imune, tornando esse patógeno um potencial agente causador de sepse (Figura 1). Tendo em vista que todas as propriedades biológicas de Pic foram observadas *in vitro*, este estudo buscou investigar se bactérias produtoras de Pic são capazes de induzir sepse letal em camundongos, assim como o cenário imunológico decorrente desta infecção utilizando um modelo de inoculação intraperitoneal de bactérias. Vale ressaltar que diante da

elevada capacidade dessas bactérias em causar doenças tão disseminadas em nosso meio, entender os mecanismos de patogenicidade desenvolvidos por esses microrganismos representa uma etapa indispensável para o desenvolvimento de inibidores proteicos, antibióticos e vacinas a serem utilizados na prevenção e/ou no tratamento de infecções graves.

Este trabalho gerou um artigo, submetido à revista *Frontiers in Immunology*, Qualis A1, Fator de impacto 6,429 (ANEXO I).

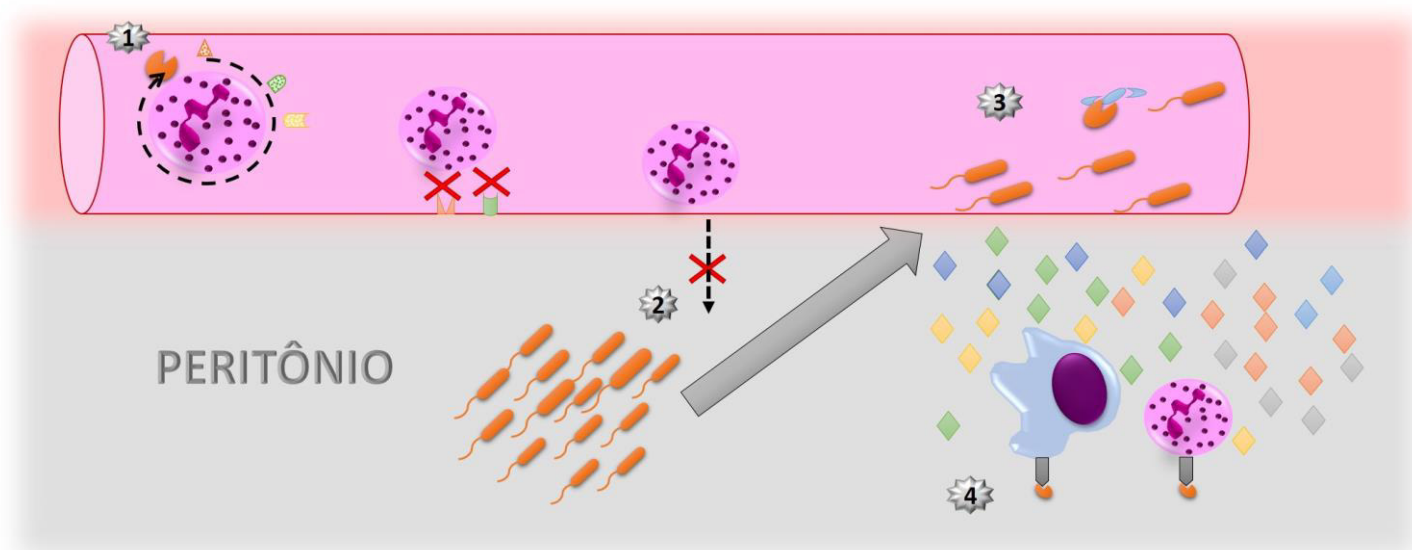


Figura 1. Hipóteses para os mecanismos de ação e contribuições de Pic na sepse. **1)** Pic possui a capacidade de clivar glicoproteínas da superfície de leucócitos, importantes no processo de adesão, rolamento e transmigração dessas células para o foco infeccioso (RUIZ-PEREZ et al., 2011). **2)** A redução no número de leucócitos recrutados para o peritônio dificultaria a eliminação da bactéria, permitindo que o patógeno prolifere e caia na corrente sanguínea (hipótese). **3)** Pic também possui a capacidade de clivar moléculas pertencentes às três vias do sistema complemento (ABREU et al., 2015), o que possibilitaria à bactéria evadir-se da morte mediada pelo complemento, sobreviver na corrente sanguínea e se disseminar para outros sítios no corpo do hospedeiro (hipótese). **4)** Tal infecção disseminada ativaria a produção exacerbada de mediadores inflamatórios, característica da sepse, o que desregularia a homeostase do organismo, gerando inúmeros danos ao hospedeiro e culminando na sua morte (hipótese).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Escherichia coli*

Caracterizada como um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* é uma espécie bacteriana amplamente distribuída, comumente encontrada no intestino grosso de humanos e animais de sangue quente (VILA et al., 2016). Ela é facilmente isolada de amostras fecais por meio do cultivo em meios de cultura seletivos onde a mudança do pH, devido à fermentação da lactose presente no meio, pode diferenciar cepas fermentadoras ou não de lactose. É capaz de crescer em ambientes aeróbicos e anaeróbicos, preferencialmente a 37°C, podendo ser móvel ou não (CROXEN et al., 2013).

Embora a maioria das linhagens colonize o intestino e raramente cause doenças em indivíduos saudáveis, algumas linhagens são capazes de gerar distúrbios intestinais e extra-intestinais tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto nos imunocompetentes (KAPER et al., 2004). A diarreia, um exemplo de distúrbio gastrointestinal que pode ser desencadeado via infecção por *E. coli*, representa um grave problema de saúde pública, sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em crianças menores que cinco anos em todo o mundo (World Health Organization, 2016).

As cepas de *E. coli* associadas a infecções intestinais são denominadas *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e podem ser classificadas em seis distintos patótipos, de acordo com seu sítio de colonização preferencial no hospedeiro, mecanismos de virulência e sintomas clínicos subsequentes à infecção. Os patótipos de DEC são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* produtora da toxina Shiga (STEC) e *E. coli* que adere difusamente em culturas de células epiteliais (DAEC) (GOMES et al., 2016).

Sob certas circunstâncias - como por exemplo ruptura da barreira gastrointestinal, imunocomprometimento do hospedeiro, ou aquisição de novos fatores de virulência que possibilitem adaptação a novos nichos - cepas restritas ao intestino (comensais ou não) podem causar infecções em focos extra-intestinais, a exemplo do trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso. Essas linhagens com habilidade especial para causar

doenças fora do intestino são denominadas *E. coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000).

Ampla é a gama de fatores de virulência produzidos por ExPEC que as habilitam a colonizar superfícies mucosas do hospedeiro, evitar ou subverter os mecanismos de defesa local ou sistêmica do hospedeiro, adquirir nutrientes essenciais, tal como ferro, invadir o hospedeiro e estimular a resposta inflamatória (MAINIL, 2013). Os fatores de virulência característicos de ExPEC incluem diversas adesinas, polissacarídeos (incluindo cápsula e lipopolissacarídeos), toxinas, sideróforos, proteases, invasinas e proteínas de resistência ao soro (JOHNSON; RUSSO, 2002). Esses fatores de virulência são codificados por genes constituintes de ilhas de patogenicidade restritas às *E. coli* patogênicas, estando ausentes em bactérias comensais, tornando esses microrganismos agentes etiológicos de infecções no trato urinário, meningites em neonatos e sepse (KOGA et al., 2014).

As infecções do trato urinário são causadas por uma ampla gama de patógenos, estando *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) entre seus agentes etiológicos mais comuns, sendo responsável por mais de 80% de todas as infecções urinárias (ULETT et al., 2013). UPECs possuem um arsenal de fatores de virulências que contribuem com sua habilidade em causar doença, incluindo fimbrias, adesinas, toxinas, flagelo, proteínas autotransportadoras e sistema de aquisição de ferro (NIELUBOWICZ; MOBLEY, 2010).

Infecções da corrente sanguínea (bacteremia) também têm sido relacionadas às várias linhagens de *E. coli* (WISPLINGHOFF et al., 2004; LAUPLAND et al., 2008; de KRAKER et al., 2013). As cepas que causam bacteremia possuem distintos fatores de virulência, incluindo fatores envolvidos na adesão, evasão do sistema imune, aquisição de ferro e toxinas, sendo também resistentes à ação bactericida do soro e de leucócitos (MIAJLOVIC et al., 2016). A presença desses fatores de virulência pode garantir a persistência dessas bactérias no sangue e disseminação pelo organismo, podendo consequentemente desencadear uma severa resposta inflamatória resultando em sepse (HERZOG et al., 2014; MORA-RILLO et al., 2015).

2.2 Sepse

2.2.1 Definição e epidemiologia

De acordo com a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e a *European Society of Critical Care Medicine* (ESICM), a sepse é definida como uma disfunção orgânica ameaçadora à vida decorrente de uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Tal disfunção é diagnosticada por meio da variação de dois ou mais pontos no escore *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) (SINGER et al., 2016), o qual avalia um conjunto de alterações na respiração, na coagulação, na função cardíaca, no fígado, no sistema nervoso central e nos rins (Tabela 1).

Tabela 1. Escore SOFA

Sistema	Escore				
	0	1	2	3	4
Respiração					
PaO ₂ / FIO ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26,7) com suporte respiratório	<100 (13,3) com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas x10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Cardiovascular					
	PAM ≥70 mmHg	PAM <70 mmHg	Dopamina <5 ou Dobutamina, qualquer dose	Dopamina 5,1-15 ou Epinefrina ≤0,1 ou Norepinefrina ≤0,1	Dopamina >15 ou Epinefrina >0,1 ou Norepinefrina >0,1
Fígado					
Bilirrubina mg/dL (μmol/L)	<1,2 (20)	1,2 - 1,9 (20 - 32)	2,0 - 5,9 (33 - 101)	6,0 - 11,9 (102 - 204)	>12,0 (204)
SNC					
Escala de coma de Glasgow	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
Renal					
Creatinina, mg/dL (μmol/L) ou Débito urinário (mL/d)	<1,2 (110)	1,2 - 1,9 (110 - 170)	2,0 - 3,4 (171-299)	3,5 - 4,9 (300-440) <500	>5 (440) <200

Adaptado de Singer et al., 2016.

Abreviações: FIO₂, fração inspirada de O₂; PAM, pressão arterial média; PaO₂, pressão parcial de O₂.

Para identificar rapidamente pacientes mais propensos a evoluírem para um desfecho desfavorável, criou-se também um escore SOFA simplificado, denominado “quick SOFA” (qSOFA). Essa ferramenta acusa a gravidade do paciente quando este

apresenta pelo menos dois dos seguintes critérios clínicos: frequência respiratória >22/incursões por minuto, alteração do nível de consciência (escore segundo a Escala de Coma de Glasgow inferior a 15), ou pressão arterial sistólica de <100 mmHg (SEYMOUR et al., 2016).

O termo choque séptico, também empregado no contexto da sepse, refere-se a um subgrupo dos pacientes com sepse que apresentam acentuadas anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas associadas com um risco de morte maior quando comparado à sepse isoladamente. O critério diagnóstico de choque séptico é a necessidade de vasopressor para manter uma pressão arterial média acima de 65 mmHg após a infusão adequada de fluidos, associada a nível sérico de lactato acima de 2 mmol/L (SHANKAR-HARI et al., 2016).

Nas últimas décadas a sepse tem recebido atenção por ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva, com opções terapêuticas limitadas (HUTTUNEN, AITTONIEMI, 2011; CHALUPKA; TALMOR, 2012). No Brasil, a taxa de mortalidade por sepse ainda se mostra elevada apesar dos crescentes avanços referentes ao seu tratamento e diagnóstico. No transcorrer de quase uma década, pode-se observar um tênue declínio dessas taxas, visto que em 2006 a mortalidade entre os pacientes sépticos era de 46,6% e no ano de 2015 seu percentual ainda alcançou 45,3% dos 110.049 pacientes internados nesse período em decorrência de sepse, o que acarretou um gasto maior que R\$ 400.000.000 com esses pacientes. No Maranhão, foram registradas cerca de 2 mil internações no ano de 2015, o que gerou um ônus de aproximadamente seis milhões de reais com o tratamento desses pacientes com septicemia, culminando em uma taxa de mortalidade de 42,18% (MIQUELIN; REIS, 2016).

2.2.2 Fisiopatologia

2.2.2.1 Infecção e Resposta imune inicial

A invasão de microrganismos indesejados desencadeia no hospedeiro uma série de respostas por parte do sistema imune deste. Após ultrapassarem as barreiras mecânicas (como o tecido epitelial), químicas (a exemplo dos ácidos graxos da pele) e biológicas

(exemplificadas pela microbiota intestinal), os patógenos induzem a resposta de várias células do sistema imune inato, tais como macrófagos e neutrófilos, desencadeando um quadro de inflamação local (WIERSINGA et al., 2014).

Os macrófagos residentes nos tecidos são as primeiras células que respondem à infecção via fagocitose e produção de substâncias bactericidas, como radicais livres de oxigênio além de proteases e hidrolases (lisozimas, elastase, collagenase, etc). Após a ativação, macrófagos também produzem uma série de mediadores inflamatórios que agem em outras células (polimorfonucleares, células endoteliais, fibroblastos, plaquetas e monócitos) amplificando a resposta inflamatória (FORTIN et al., 2010).

Além dos macrófagos, os neutrófilos também são fagócitos importantes na defesa inata do hospedeiro, sendo as primeiras células recrutadas ao local da injúria, atuando na eliminação dos patógenos via fagocitose, liberação de grânulos citoplasmáticos, produção de espécies reativas de oxigênio e produção de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Atraídos por quimiocinas, os neutrófilos migram da corrente sanguínea para o foco infeccioso com o auxílio de selectinas e integrinas (LERMAN; KIM, 2015).

O reconhecimento dos patógenos pelas células do sistema imune ocorre por intermédio de moléculas denominadas de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que identificam estruturas moleculares conservadas presentes na superfície dos microrganismos, denominadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como lipopolissacarídeos (LPS), peptideoglicano, lipopeptídeos, flagelina e DNA bacteriano (KAWAI; AKIRA, 2010). PRRs também podem reconhecer sinais endógenos de danos, conhecidos como alarminas ou DAMPs (padrões moleculares associados ao dano) (CHEN; NUÑEZ, 2010; CHAN et al., 2012).

Entre os principais representantes dos receptores de reconhecimento padrão (PRR) encontram-se os receptores tipo *toll* dos mamíferos, uma família composta por proteínas de membrana homólogas aos receptores *toll* de *Drosophila melanogaster* (MEDZHITOV et al., 1997). Alguns receptores tipo *toll* são expressos na superfície celular (como os TLR 1, 2, 4, 5 e 6), enquanto outros são expressos nas vesículas membranosas endocíticas ou até mesmo em outros compartimentos intracelulares, como é o caso dos TLR 3, 7, 8 e 9 (KAWAI; AKIRA, 2010).

Os receptores transmembranares tipo *toll* são compostos por um domínio de reconhecimento e um domínio citoplasmático capaz de desencadear eventos de

sinalização intracelular. Após a ativação dos receptores via interação com um PAMP, ocorre o recrutamento de proteínas acessórias presentes no citoplasma e uma série de reações de fosforilação proteica é iniciada culminando na fosforilação do iKB (inibidor do fator Kappa B) e na liberação do NF- κ B (fator nuclear κ B). Este, por sua vez, é translocado para o núcleo da célula onde induzirá a transcrição de vários genes que codificam a produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000).

As citocinas são produzidas de modo regulado a fim de promover a ativação e diferenciação da resposta imune (SCHULTE et al., 2013). São produzidas por uma ampla gama de células imunes - como neutrófilos, linfócitos, macrófagos, células dendríticas – assim como por outros tipos celulares, a exemplo das células endoteliais, e exercem funções tanto pró-inflamatórias quanto reguladoras (STRIZ et al., 2014).

As quimiocinas e seus receptores são capazes de controlar a migração e a residência de todas as células imunes (RAZ; MAHABALESHWAR, 2009). Essas moléculas são secretadas em resposta a sinais, tais como citocinas pró-inflamatórias, atuando no recrutamento de monócitos, neutrófilos e linfócitos (DESHMANE et al., 2009). As quimiocinas podem ser agrupadas em duas subfamílias funcionais: quimiocinas inflamatórias e homeostáticas. As primeiras são responsáveis por controlar o recrutamento de leucócitos, enquanto as últimas guiam os leucócitos para órgãos linfoides secundários, bem como na medula óssea e no timo durante a hematopoese (PALOMINO; MARTI, 2015).

Outro mediador inflamatório que atua no contexto infeccioso é o óxido nítrico (NO). Este é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor sintetizado a partir de oxigênio molecular e do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS) (DUSSE et al., 2003). O NO representa um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares, consistindo em um composto bastante reativo cuja liberação resulta em imediatas e variadas reações químicas diretas e indiretas (VINCENT et al., 2000). Dentre as interações diretas está a reação com metais que compõem a estrutura de proteínas, podendo também interagir com grupamentos tióis (R-SH), muito frequentes em proteínas que contenham resíduos de cisteína. Os efeitos indiretos do NO baseiam-se na sua reação com espécies reativas de oxigênio (ASSREUY, 2006).

2.2.2.2 Desregulação da resposta imune e inflamação sistêmica

Quando a resposta imune local é incapaz de controlar a infecção, o microrganismo pode invadir a corrente sanguínea e induzir uma resposta inflamatória sistêmica caracterizada pela ativação celular exacerbada e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, a exemplo do fator de necrose tumoral (TNF- α), das interleucinas (IL) 6 e 12, do interferon gama (IFN- γ) e da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1). Em paralelo ou sequencialmente a essa fase de hiperinflamação, surge também um estado de imunossupressão, caracterizado pela produção de citocinas reguladoras, tais como a interleucina 10 (IL-10) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (WIERSINGA et al., 2014).

O TNF- α deriva de células imunes ativadas (macrófagos) e células não pertencentes ao sistema imune (fibroblastos) em resposta a um estímulo infeccioso ou inflamatório (PARAMESWARAN; PATIAL, 2010). Uma vez liberado, o TNF- α age em distintas células alvo, tais como macrófagos, células endoteliais e neutrófilos. Em macrófagos, essa citocina promove o aumento, ativação e diferenciação (WITSELL; SCHOOK, 1992) e estimula a sobrevivência celular (CONTE et al., 2006). Nas células endoteliais o TNF- α aumenta a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas (NAKAE et al., 1996), aumentando também a adesividade das integrinas nos neutrófilos, o que contribui com a sua migração para o foco infeccioso (SCHOUTEN et al., 2008). O TNF- α também amplifica a cascata inflamatória por ativar macrófagos a secretar outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8), mediadores lipídicos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (COHEN, 2002).

A IL-6 é produzida por uma ampla variedade de células, especialmente macrófagos, células dendríticas, linfócitos, células endoteliais, fibroblastos e células do músculo liso em resposta a estímulos com LPS, IL-1 e TNF- α (SCHELLER; ROSE-JOHN, 2006). Seu efeito biológico inclui a ativação de linfócitos B e T e sistema de coagulação e modulação da hematopoese (BORDEN; CHIN, 1994). Além disso, possui importante papel na indução da febre, bem como medeia a resposta de fase aguda, caracterizada por febre, leucocitose e liberação hepática de proteínas de fase aguda (KUSHNER; RZEWNICKI, 1994).

Fagócitos (macrófagos e neutrófilos) e células dendríticas são as principais fontes da citocina heterodimérica IL-12 (TRINCHIERI, 2003). Sua ação consiste em promover o desenvolvimento de resposta imune adaptativa tipo 1, que é caracterizada por aumento da resposta de fagócitos mononucleares. IL-12 induz células T e células natural *killer* (NK) a produzir IFN- γ , o qual estimula macrófagos a aumentar sua atividade bactericida (BONECCHI et al., 1998). Além disto, essa interleucina estimula a diferenciação de células TCD4+ *naïve* em células T_H1 e as protege da morte por apoptose (HSIEH et al., 1993). O interferon gama (IFN- γ) é produzido principalmente por células NK ativadas, T_H1 e células T citotóxicas CD8⁺. Sua produção é regulada e estimulada por citocinas derivadas de macrófagos, especialmente TNF- α , IL-12 e IL-8 (BOEHM et al., 1997).

A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) é uma quimiocina produzida por vários tipos celulares quer constitutivamente ou após a indução por estresse oxidativo, citocinas e fatores de crescimento (VAN COILLIE et al., 1999). Dentre as células que a produz estão células endoteliais, fibroblastos, epiteliais, do musculo liso, mesangiais, astrocíticas, monocíticas e microgliais. Entretanto, monócitos/macrófagos são a principal fonte dessa quimiocina (DESHMANE et al., 2009). MCP-1 estimula a quimiotaxia de monócitos e vários eventos celulares associados à quimiotaxia, incluindo o fluxo de Ca²⁺ e a expressão de integrinas. Ela é também um indutor fraco da expressão de citocina em monócitos e, em altas concentrações, desperta *respiratory burst*, que gera espécies reativas de oxigênio (JIANG et al., 1992; PALOMINO; MARTI, 2015).

IL-10 é produzida por muitos tipos de células do sistema imune, tais como monócitos, macrófagos, linfócitos T e B, células NK (LATIFI et al., 2002). Tem função antiinflamatória (reguladora), suprimindo, *in vitro*, a produção de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ (MALEFYT et al., 1991).

Além da liberação de diversas moléculas pró-inflamatórias, alterações metabólicas e hemodinâmicas também caracterizam a sepse e contribuem para o agravamento do quadro clínico do paciente, tendo como consequência o comprometimento da funcionalidade de diversos órgãos e mortalidade na maioria dos casos. As disfunções orgânicas mais comuns são: cardiovascular, pulmonar, renal, neurológica e do aparelho digestivo. Posteriormente, ocorrem também disfunções hepáticas e hematológicas (HATTORI et al., 2017).

Dentre as disfunções metabólicas frequentemente observadas em pacientes sépticos estão as alterações nos níveis glicêmicos (HIRASAWA et al., 2009), as quais ocorrem por ação de citocinas circulantes e de hormônios contra-reguladores liberados em condição de estresse (KROGH-MADSEN et al., 2004). Tanto o estado de hiperglicemia (MARIK; RAGHAVAN, 2004; DAY et al., 2008; VAN CROMPHAUT et al., 2008) quanto o de hipoglicemia (MACIEL et al., 2008) têm sido relatados no contexto da sepse, sendo ambos agravantes do quadro séptico, estando relacionados com mortalidade (ALI et al., 2008; AHMAD; KHALID, 2012).

As alterações hemodinâmicas, por sua vez, compreendem a ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas, como as da cascata de coagulação e do sistema complemento. A ativação da cascata de coagulação do sangue durante a sepse consiste em um mecanismo de defesa do hospedeiro que atenua a disseminação e facilita destruição de patógenos. Inflamação e coagulação estão estreitamente conectadas, visto que um processo inflamatório descontrolado pode promover a coagulação intravascular disseminada (DIC), um importante indicador de mau prognóstico na sepse caracterizado por produção massiva de trombina e ativação/consumo de plaquetas, acoplados com fibrinólise prejudicada e trombose microvascular (LUPU et al., 2014).

Similar à coagulação, o sistema complemento é um importante componente imune inato na defesa contra microrganismos invasores. A ativação desse sistema proteico contribui para a lise e opsonização dos microrganismos, regula as reações inflamatórias e conecta as imunidades inata e adaptativa (MARKIEWSKI, 2008). Entretanto, os pequenos fragmentos das proteínas (C3a, C4a e C5a), conhecidos como anafilatoxinas, liberados durante a clivagem das mesmas, amplificam a resposta inflamatória por aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos (SCHUERHOLZ et al., 2005) e atrair leucócitos para o sítio infeccioso (SILASI-MANSAT, 2010).

Um indício que a ativação do sistema complemento durante um estado de bacteremia inicial auxilia na eliminação dos patógenos reside no fato de que a ausência de C3 (uma molécula chave e que atua nas três vias de ativação desse sistema) em humanos e camundongos os torna vulneráveis a infecções (SILASI-MANSAT, 2010). Portanto, para permanecerem viáveis na corrente sanguínea e posteriormente se disseminar no hospedeiro, os patógenos invasores devem também resistir a essas propriedades bactericidas do soro (MIAJLOVIC; SMITH, 2014).

Os patógenos humanos exibem uma série de estratégias para evadir dos mecanismos de ação do sistema imune, dentre as quais podemos citar: (1) a produção de proteínas que mimetizam proteínas reguladoras do sistema complemento ou aquisição das proteínas reguladoras do hospedeiro; (2) a inibição de C3 e C5 convertase ou da formação do complexo de ataque à membrana (MAC); (3) inativação de anticorpos por meio da degradação ou ocupação da porção Fc dessas proteínas; (4) a inativação das proteínas do Sistema Complemento via secreção de proteases (ABREU; BARBOSA, 2017).

2.3 Proteases

Envolvidas em diversos processos celulares e extracelulares importantes (PAGE; Di CERA, 2008), as proteases são um grupo de enzimas capazes de catalisar a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas (TERSAIOL et al., 2002), estando entre os polímeros biológicos mais estáveis por possuir ligações peptídicas que podem resistir por várias horas em ácidos concentrados ou altas temperaturas (DRAG; SALVESEN, 2010). Essas enzimas são encontradas em todos os organismos e algumas delas são importantes fatores de virulência bacteriana, atuando como toxinas com distintos alvos celulares (POTEMPA; PIKE, 2009).

As proteases podem ser classificadas de acordo com a localização do sítio de clivagem na proteína alvo. Se esta ocorrer perto das porções amino ou carboxi-terminais, elas são chamadas de exoproteases; caso a clivagem aconteça distante das extremidades do substrato, a protease é denominada endoprotease (IUBMB, 2007). As endoproteases ainda podem ser subdivididas em sete grupos catalíticos: serinoproteases, metaloproteases, cisteíno proteases, aspártico proteases, treonino proteases, glutâmico proteases e asparagino peptídeo liases (BARRET et al., 2003; RAWLINGS et al., 2011; MADHAVI et al., 2014).

As serinoproteases são enzimas que possuem um sítio ativo que contém a tríade catalítica Ser/His/Asp, responsável por sua atividade proteolítica e são amplamente distribuídas entre vírus, bactérias e eucariotos, sendo, portanto, vitais para os organismos (PAGE; Di CERA, 2008; HEDSTROM, 2002; DODSON; WLODAWER, 1998). Em bactérias Gram-negativas, essas proteases são conhecidas como SPATEs (*serino protease*

autotransporter of Enterobacteriaceae), uma família de proteases extracelulares produzidas por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (RUIZ-PEREZ; NATARO, 2014).

O termo “autotransportadoras” refere-se a um grupo de proteínas que contêm em sua estrutura todos os componentes necessários para seu transporte através das membranas interna e externa da bactéria e posterior secreção. Esse mecanismo ocorre via um sistema de secreção Tipo V, presente em bactérias Gram-negativas (DAUTIN, 2010). Estruturalmente semelhantes, as proteínas autotransportadoras são compostas pelas seguintes regiões (Figura 2):

(1) **Peptídeo sinal:** importante para o reconhecimento e translocação da proteína pelo sistema secretor *Sec*, presente na membrana interna da bactéria;

(2) **Domínio passageiro:** parte secretada ao meio externo e que exerce atividade funcional;

(3) **β -domínio:** parte da proteína que forma um poro na membrana externa e permite a passagem e excreção do domínio passageiro.

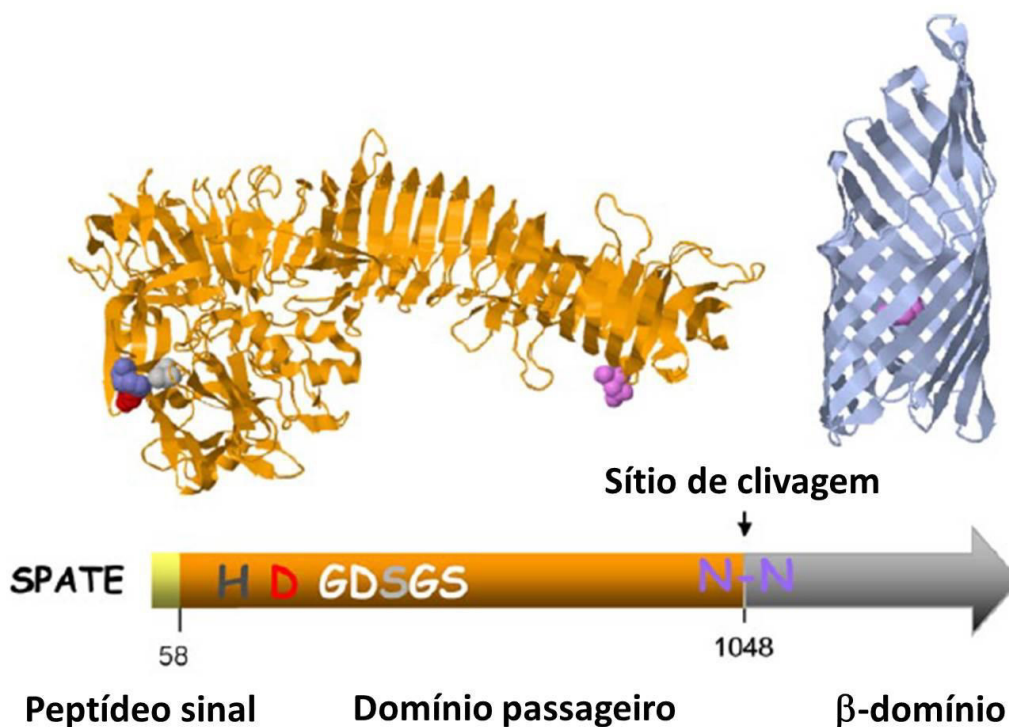


Figura 2. Estrutura geral das proteínas autotransportadoras.

Fonte: Adaptado de Ruiz-Perez e Nataro (2014).

A família SPATE, que inclui mais de 25 proteases com substratos diversos, tem sido dividida filogeneticamente em duas classes distintas baseadas na sequência de aminoácidos do domínio passageiro. SPATEs de classe I possuem habilidade de causar efeitos citopáticos em culturas de células e apresentam atividade enterotóxica. As SPATEs de classe II são capazes de degradar mucina, incluindo glicoproteínas da superfície de leucócitos com papel vital em numerosas funções celulares, modulando a resposta imune e sendo, portanto, consideradas como proteínas imunomoduladoras (HENDERSON et al., 1998; DUTTA, 2002). Um importante membro das SPATEs é a proteína envolvida na colonização (Pic).

2.4 Proteína envolvida na colonização (Pic)

Pic é uma proteína extracelular de 109.8 kDa produzida por *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *Shigella flexneri* 2a (RAJAKUMAR et al., 1997; HENDERSON et al., 1999; PARHAM et al., 2004; ABREU et al., 2016).

Vários papéis biológicos para Pic já foram descritos, incluindo hemaglutinação, atividade mucinolítica, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem de glicoproteínas de superfície de leucócitos, que estão envolvidas no tráfego, migração e inflamação (HENDERSON et al., 1999; RUIZ-PEREZ et al., 2011). A capacidade de aglutinar eritrócitos de várias espécies sugere que Pic pode ter uma atividade adesiva que pode promover aderência da bactéria produtora ao tecido intestinal ou a parede mucosa. Devido à sua atividade mucinolítica, Pic também promove a colonização intestinal de ratos e coelhos pela clivagem do muco presente na luz intestinal, favorecendo assim a adesão da bactéria aos enterócitos (HARRINGTON et al., 2009; MUNERA et al., 2014; ABREU et al., 2016). Porém, ao mesmo tempo em que possui atividade mucinolítica sobre mucina, essa proteína também desencadeia a hiperprodução de muco, o que sugere a possível participação de Pic nas características patológicas da diarreia induzida por EAEC e diarreia mucoide vista em infecções por *Shigella* (NAVARRO-GARCIA et al., 2010).

Além da capacidade de clivar uma notável gama de moléculas presentes na superfície de várias linhagens de células hematopoiéticas, incluindo macrófagos,

neutrófilos e linfócitos (RUIZ-PEREZ et al., 2011), Pic também promove resistência ao soro pela clivagem direta de moléculas-chave pertencentes às três vias desta cascata do sistema complemento (ABREU et al., 2015). Desta forma, patógenos produtores de Pic são capazes de destruir a barreira protetora do epitélio intestinal causando a persistência bacteriana, invasão, migração para o trato urinário e alguns deles têm a capacidade de atingir a corrente sanguínea podendo causar bacteremia e sepse (HERZOG et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a capacidade da serinoprotease Pic produzida por *Escherichia coli* induzir sepse letal em animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a ação de Pic na sobrevivência dos animais após infecção com as bactérias;
- ✓ Verificar a capacidade de sobrevivência das bactérias na corrente sanguínea, assim como sua disseminação pelo hospedeiro.
- ✓ Avaliar a migração dos leucócitos para o foco infeccioso inicial dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias;
- ✓ Avaliar a ocorrência de resposta inflamatória local e sistêmica nos animais infectados;
- ✓ Analisar o perfil fenotípico e o potencial de ativação de leucócitos do baço e peritônio dos animais infectados;
- ✓ Analisar as modificações histopatológicas em órgãos dos animais após a infecção.

4. CAPÍTULO I

The serinoprotease Pic secreted by *Escherichia coli* induces an intense immune response and death in a murine model of sepsis

DUTRA, I.L.^{1,2}; LIMA, Y.A.¹; NASCIMENTO, J.R.^{1,2}; VALE, A.A.M.^{1,2}; ASSUNÇÃO, R.G.³; ALVES, P.C.S.^{1,2}; TROVÃO, L.O.^{1,2}; SILVA, L.A.^{1,2}; MACIEL, M.C.G.^{1,2}; SILVA, R.M.⁴; ELIAS, W.P.⁵; SOUSA, E.M.³; NASCIMENTO, F.R.F.^{1,2}; ABREU, A.G.^{2,3}

¹Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil;

²Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Federal University of Maranhão, São Luís, Brazil;

³Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, UNICEUMA, São Luís, Brazil;

⁴Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil;

⁵Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

Some *Escherichia coli* strains are important pathogens responsible for a variety of diseases, and albeit using distinct mechanisms of pathogenesis, have in common the production of Pic, or protein involved in colonization. We have recently shown that Pic mediates immune evasion by the direct cleavage of complement molecules, significantly reducing complement activation by all three pathways. The aim of this study was to investigate the action of Pic in a murine model of sepsis. Six to eight-week-old female Swiss mice were intraperitoneally inoculated with Pic-producing *E. coli* (F5), F5 Δ pic mutant or apyrogenic water (control). Animal survival was monitored for 5 days (n= 6 animals/group) and a subset of mice (n= 6 animals/group) was euthanized after 12 h for sample acquire from blood, peritoneal lavage and organs. The parameters evaluated were cellularity from blood, peritoneal cavity and organs; inflammatory mediators production; quantity of colony forming units (CFU's); immunophenotyping of cells from spleen and peritoneum; and histopathology of organs. Intraperitoneal inoculation of Pic-producing bacteria induced 100% death within 24 h, different from the other groups where no death was observed. The CFU count of bacteria in the organs was significantly higher in F5 than other groups. Besides, only F5 was viable on bloodstream. Hematological analysis showed a decrease of total leukocytes, mainly lymphocytes. NO and cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10 and MCP-1) were detected in serum, as well as on peritoneal lavage (excepting IL-12) of F5 group in significantly higher levels than other groups. Immunophenotyping of spleen and peritoneum cells revealed that there was a low expression of co-receptors on lymphocytes and macrophages in F5 group, indicating that the activation and function of these were compromised. Therefore, these results evidenced that Pic represents an important virulence factor, allowing the survival of the bacterium on bloodstream and several organs, as well as inducing a high production of pro-inflammatory mediators by the host, leading to a sepsis and death.

Keywords: *Escherichia coli*; Pic; serinoprotease; sepsis.

Introdução

A sepse consiste em uma disfunção orgânica ameaçadora à vida, que decorre de uma resposta desregulada do organismo a uma infecção persistente (SINGER et al, 2016). O reconhecimento de patógenos invasores pelas células do sistema imune desencadeia uma série de reações citoplasmáticas de fosforilação proteica que resultam na transcrição de vários genes que codificam a produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A ativação em excesso desse sistema gera alterações cardiovasculares e/ou hemodinâmicas, neurológicas, metabólicas e ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas, como a cascata de coagulação e do sistema complemento, que contribuem para o agravamento do quadro clínico do paciente, tendo como consequência o comprometimento da funcionalidade de diversos órgãos e falência sistêmica, resultando em mortalidade na maioria dos casos (LUPU et al., 2014; VAN DER POLL et al., 2017; MINASYAN, 2017).

A sepse representa um grave problema de saúde pública mundial, devido a sua alta taxa de mortalidade e ao seu difícil e oneroso tratamento (RULIM et al., 2017). Comparando a taxa de mortalidade de pacientes hospitalizados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) de diferentes países, uma alta taxa foi observada no Brasil (56,1%), seguido pela Argentina (46,6%), Canadá (30,3%), Estados Unidos (33%), e Austrália (22%) (MACHADO; MAZZA, 2010). Nos Estados Unidos, a incidência de sepse é estimada em 300 casos por 100.000 habitantes e o ônus gerado com o tratamento desses pacientes chega a 14 bilhões de dólares (MAYR et al., 2014). Já no Brasil, os gastos decorrentes dessas internações, só no ano de 2015, foram de aproximadamente 400 milhões de reais (MIQUELIN; REIS, 2016).

Tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas podem desencadear o processo de sepse, estando *E. coli* entre as principais Gram-negativas causadoras de sepse (MAYR et al., 2014). *Escherichia coli* é uma bactéria amplamente distribuída em diversos ambientes e comumente encontrada no intestino grosso de humanos e animais de sangue quente, sem causar doenças em indivíduos saudáveis (KAPER et al., 2004). Entretanto, algumas linhagens são capazes de originar distúrbios intestinais a exemplo da diarreia que é um grave problema de saúde pública mundial e está entre as principais causas de morbidade e mortalidade entre crianças de países em desenvolvimento (World

Health Organization, 2016). Cepas patogênicas de *E. coli* são também responsáveis por infecções extra-intestinais, tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto nos imunocompetentes, sendo relatadas como agente etiológico de infecções do trato urinário, sistema nervoso central e corrente sanguínea (CROXEN et al., 2013).

Infecções da corrente sanguínea têm sido relacionadas às várias linhagens de *E. coli* (WISPLINGHOFF et al., 2004; LAUPLAND et al., 2008; de KRAKER et al., 2013). As cepas que causam bacteremia possuem diversos fatores de virulência, incluindo aqueles envolvidos com adesão, evasão do sistema imune, aquisição de ferro e toxinas e resistência à ação bactericida do soro (JOHNSON et al., 2002; MIAJLOVIC et al., 2016). A presença desses fatores pode garantir a persistência dessas bactérias no sangue e disseminação pelo organismo, podendo consequentemente desencadear uma severa resposta inflamatória resultando em sepse (HERZOG et al., 2014; MORA-RILLO et al., 2015).

Dentre os fatores de virulência que habilitam *E. coli* a evadir do sistema imune temos a Proteína envolvida na colonização (Pic). Esta consiste em uma serinoprotease produzida por algumas bactérias da família Enterobacteriaceae, que possui diversos papéis biológicos, incluindo hemaglutinação, atividade mucinolítica, degradação do fator V da cascata de coagulação e clivagem de glicoproteínas de superfície de leucócitos (HENDERSON et al., 1999; RUIZ-PEREZ et al., 2011), além de promover resistência ao soro pela clivagem direta de moléculas-chave pertencentes às três vias da cascata do sistema complemento (ABREU et al., 2015). Desta forma, patógenos produtores de Pic são capazes de destruir a barreira protetora do epitélio intestinal causando a persistência bacteriana, invasão, migração para sítios extra-intestinais e alguns deles têm a capacidade de atingir a corrente sanguínea podendo causar bacteremia e sepse (HERZOG et al., 2014).

Uma vez que Pic é capaz de degradar importantes substratos biológicos, levantou-se a hipótese de que esta serinoprotease poderia induzir sepse letal em modelo murino. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade da serinoprotease Pic produzida por *Escherichia coli* de induzir sepse letal em animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias.

Material e Métodos

Amostras bacterianas

Para realização deste trabalho foi utilizada uma amostra de *E. coli* (F5) isolada de um caso de bacteremia no Hospital São Paulo (SP – Brasil), produtora da serinoprotease Pic, bem como o seu mutante no gene *pic* (F5 Δ *pic*). A construção do mutante foi baseada na técnica de mutagênese específica, com uso de fragmento linear de DNA, com emprego do sistema de recombinases codificadas pelo fago λ Red (DATSENKO et al., 2000). Todas as amostras foram mantidas a -80°C em caldo de soja tripticase (TSB) acrescido de glicerol a 20% e cultivadas em caldo Luria-Bertani (LB), ágar LB ou ágar MacConkey (MC).

Animais

Foram utilizados 36 camundongos fêmeas da linhagem Swiss entre seis e oito semanas de vida para o modelo de sepse por inoculação intraperitoneal (ip.), obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal do Maranhão (Processo nº 23115.006231/2015-20) – ANEXO II.

Inoculação intraperitoneal das bactérias

A inoculação intraperitoneal das bactérias foi realizada conforme descrito previamente por Picard et al. (1999). Após determinação do inoculo adequado para indução da sepse letal, que consistiu em 200 μ L de suspensões contendo 10^9 UFC/mL, procedeu-se com a inoculação das suspensões por via intraperitoneal nos camundongos fêmeas da linhagem Swiss entre seis e oito semanas de vida, com peso entre 25 e 30 g.

Avaliação da sobrevida dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal e ensaios subsequentes

Os 36 camundongos usados no experimento foram separados em 03 grupos (12 animais/grupo). Os animais do grupo Controle receberam injeções contendo 200 μ L de

água apirogênica. Nos grupos F5 e F5 Δ pic foram inoculadas as cepas de *E. coli* F5 e seu mutante *E. coli* F5 Δ pic, respectivamente.

Doze horas após a indução da sepse por inoculação intraperitoneal, metade dos animais de cada grupo (n=6) foi eutanasiada, por overdose de anestésico, para coleta de amostras destinadas aos ensaios descritos a seguir. A outra metade dos animais (n=6) foi destinada a avaliação da sobrevivência, sendo esta acompanhada a cada 12 horas até o 5º dia após a indução da sepse (MACIEL et al., 2014).

Dosagem de glicose e coleta de sangue

A quantificação de glicose foi feita utilizando sangue periférico 12 h após a inoculação intraperitoneal das bactérias usando glicosímetro digital (Accu-check). O valor obtido expressou a concentração da glicose (mg/dL).

Em seguida, os animais foram anestesiados (150 mg/kg Cloridrato de Ketamina e 120 mg/kg Cloridrato de Xylazina) por via intramuscular e submetidos à punção retro orbital para coleta do sangue destinado contagem celular diferencial, mensuração sérica de citocinas e NO, além da avaliação da presença de bactérias no sangue, por meio do cultivo em ágar MacConkey, meio seletivo para bactérias Gram-negativas.

A contagem de células sanguíneas foi realizada por método automatizado, utilizando o Bioclin 2.8 Vet (Bioclin, Brasil).

Obtenção das células peritoneais

Após a eutanásia e coleta de sangue, as células peritoneais dos animais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de Solução tamponada com fosfato (PBS) estéril gelada (MACIEL et al., 2014). Para a determinação do número total, as células peritoneais foram coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1. As células foram contadas com auxílio de um hemocitômetro (Sigma, USA), e de um microscópio óptico de luz comum.

Produção de peróxido de hidrogênio

Para avaliar a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) peritoneal foi utilizado o método de oxidação do vermelho de fenol (PICK; MIZEL, 1981). Para isto, alíquotas

de 100µL da suspensão celular (2×10^6 células/mL de sol. fenol vermelho) foram transferidas para placa de cultura de fundo chato (96 poços). Os ensaios foram feitos em quadruplicata e em dois dos poços foram acrescentados 10µL de Acetato Miristato de Forbol (PMA) diluído em dimetil sulfóxido (DMSO), de modo a obter uma concentração final de 10ng por poço. A placa foi incubada à 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ e atmosfera úmida por uma hora. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 10µL de NaOH 1N por poço. A absorbância foi determinada por ELISA (Titertek-Multiscan), com filtro de 620 nm, contra branco constituído por solução de vermelho de fenol. Os resultados, obtidos em densidade óptica, foram transformados em µM de H₂O₂ mediante equação de regressão linear com base em uma curva padrão feita com concentrações conhecidas de H₂O₂.

Obtenção dos órgãos

O fígado, baço, rins, pulmões e o fêmur foram retirados. Pequenos fragmentos do fígado, baço e pulmão foram retirados, pesados com auxílio de balança digital e destinados a determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Fragmentos do fígado, baço e rins também foram retirados, pesados e utilizados para análises histopatológicas.

Determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Alíquotas de diluições seriadas em PBS do sangue, lavado peritoneal e macerado dos órgãos (baço, fígado e pulmão) foram semeadas ágar MacConkey para avaliação da presença de bactérias.

Para o cultivo das bactérias do sangue e do lavado peritoneal, alíquotas de 10 µL e 100 µL, respectivamente, foram diluídas em PBS estéril, seguido de diluições seriadas até a concentração de 10^{-5} . Posteriormente, um total de 100 µL de cada diluição foram semeados em ágar MacConkey (meio seletivo para bactérias Gram-negativas), com o auxílio de uma alça de drigalski. Para avaliação das bactérias nos órgãos, fragmentos dos mesmos foram pesados, triturados e homogeneizados em PBS estéril (pH 7,4) e diluições seriadas até a concentração de 10^{-5} foram semeadas em ágar MacConkey. As UFCs foram contadas após incubação *overnight* a 37°C, sendo os resultados expressos como Log de UFC/mL.

Contagem de células do baço e medula óssea

Para a obtenção das células do baço, o mesmo foi triturado e ressuspensão em 5 mL de PBS. Já para obtenção das células da medula óssea, o fêmur foi perfundido com 1 mL de PBS. Para determinar o número total de células, nove volumes de células foram adicionados a 1 volume de cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30% (MACIEL et al., 2014). As células foram contadas com auxílio de um hemocitômetro (Sigma, St. Louis, MO, USA) em microscópio óptico de luz comum.

Imunofenotipagem das células do baço e peritônio

Após contagem de células da cavidade peritoneal e do baço, 10^6 células/mL foram ressuspensas em tampão específico para imunofenotipagem e transferidas para uma placa de 96 poços de fundo em “U”. Em seguida, procedeu-se a marcação das células com anticorpos específicos e incubação a 4°C por 15 minutos. Na marcação das células do baço, foram utilizados 2 painéis com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos: anti-CD3 conjugado com FITC; anti-CD28 conjugado com PE e anti-CD4, anti-CD8 conjugados com PerCP (Tabela 2). Para as células do peritônio foram montados 5 painéis de marcação: anti-CD3, anti-CD14 e Ia-Ie conjugados com FITC; anti-CD28, anti-CD80, anti-CD86 e anti-CD19 conjugados com PE e anti-CD4, anti-CD8, anti-iNOS e anti-Ly6G conjugados com PerCP (Tabela 3).

Quantificação de NO, citocinas e quimiocina após a infecção bacteriana

Para investigar a produção de mediadores inflamatórios após indução da sepse por inoculação intraperitoneal de bactérias, foram realizadas dosagens de NO, citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12) e da quimiocina MCP-1.

Para determinação do NO, alíquotas de 50 μ L do soro foram utilizadas para dosagem de nitrito como forma indireta de avaliar a produção de óxido nítrico, conforme protocolo adaptado de Miranda et al. (2001). Amostras do soro, bem como do lavado peritoneal dos animais, foram destinadas à dosagem de citocinas por citometria de fluxo. A quantificação de citocinas secretadas (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10) e da quimiocina MCP-1 foi realizada utilizando o kit CBA (Cytometric Bead Array) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo recomendações do fabricante.

Avaliação histopatológica

Fragmentos do fígado, baço e rim foram removidos, pesados e fixados em formol 10% por 24 h, desidratados em álcool e embebidos em parafina. Fragmentos de 5-mm foram corados em hematoxilina – eosina para análise histopatológica dos seguintes parâmetros: hemorragia, infiltrado celular, necrose e edema. A análise foi determinada em teste duplo cego a partir da seguinte classificação: 0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism, versão 07. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão e submetidos a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Turkey, teste T ou Kruskal-Wallis e Mann-Whitney quando o pressuposto de normalidade dos dados não era satisfeito. Para a análise da sobrevida, utilizou-se a curva de Kaplan-Meier e o teste de Long-Rank.

Resultados

***E. coli* produtora de Pic induz sepse letal nos animais**

A inoculação intraperitoneal de bactérias produtoras da serinoprotease Pic (*E. coli* F5) induziu a morte de aproximadamente 66% dos animais em até 12 h após a infecção. Os animais restantes morreram em até 24h após a inoculação bacteriana, refletindo numa mortalidade de 100% em até 24h após a indução da sepse. Nenhuma morte foi verificada nos demais grupos (Figura 3).

Pic é essencial para a permanência da bactéria na corrente sanguínea

A contagem de UFCs após cultivo de alíquotas do lavado peritoneal dos animais em ágar MacConkey evidenciou a presença de ambos os grupos bacterianos (F5 e seu mutante F5 Δ *pic*), sendo o número de bactérias produtoras de Pic maior quando comparado ao mutante (Figura 4). Nas amostras de sangue foi detectada a presença de bactérias apenas nas amostras pertencentes ao grupo F5 (Figura 4).

Nas culturas dos macerados dos órgãos (baço, fígado e pulmão) pôde-se verificar a presença das bactérias produtoras da serinoprotease Pic (grupo F5) e do seu mutante (grupo F5 Δ pic), sendo o número de bactérias produtoras de Pic superior em relação ao do mutante em *pic* (Figura 5).

Pic promove alterações no número de leucócitos nos animais infectados por *E. coli* F5

O hemograma mostrou uma redução na quantidade total de leucócitos no sangue dos animais do grupo F5 quando comparado aos demais grupos (Figura 6). Essa redução ocorreu devido a uma redução no número de linfócitos, visto que o número destes estava reduzido em comparação ao grupo Controle, enquanto o número de neutrófilos não diferiu entre estes mesmos grupos. O grupo F5 Δ pic, por sua vez, apresentou um aumento no número total de leucócitos quando comparado ao grupo controle, atribuído principalmente a um aumento do número de neutrófilos (Figura 6). Além disso, foi observada também uma menor quantidade de leucócitos totais da cavidade peritoneal dos animais do grupo F5 com relação aos demais grupos (Figura 8).

Pic não induz alteração nos níveis glicêmicos e no número total de leucócitos no baço e na medula óssea

Os animais do grupo F5 apresentaram um nível glicêmico mais baixo que os demais grupos, não sendo este, entretanto, estatisticamente significativo (dados não mostrados). A quantidade total de leucócitos do baço (dados não mostrados) e da medula óssea também foi similar entre os grupos (Figura 7).

Pic compromete a expressão de moléculas co-estimuladoras em linfócitos T CD4 e macrófagos e afeta a expressão de iNOS por macrófagos na cavidade peritoneal

Ensaio de imunofenotipagem mostraram que a serinoprotease Pic reduz a expressão de CD28 nos linfócitos T CD4⁺ do baço (Figura 9), assim como das moléculas CD80 e CD86 nos macrófagos oriundos da cavidade peritoneal (Figura 10).

Apesar da frequência relativa de iNOS em macrófagos peritoneais não ter diferido entre os grupos (dados não mostrados), a expressão desta enzima no grupo F5 Δ pic foi

superior em relação aos demais grupos, enquanto a expressão desta pelo grupo F5 não diferiu do grupo Controle (Figura 11).

Pic promove aumento exacerbado de mediadores inflamatórios no soro e peritônio

Tanto citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, MCP-1), como a citocina anti-inflamatória IL-10 foram detectadas nas amostras de soro do grupo F5, de modo significativo em relação aos demais grupos (Figura 12), sendo as concentrações séricas de IL-6 e MCP-1 as mais elevadas. O óxido nítrico das amostras de soro também foi produzido de forma mais acentuada pelos animais infectados por bactérias produtoras de Pic (Figura 14).

A dosagem de citocinas das amostras do lavado peritoneal dos animais também mostrou uma produção significativa de citocinas no grupo F5, a exceção de IL-12 (Figura 13). No entanto, a produção de H₂O₂ na cavidade peritoneal não mostrou diferença significativa entre os grupos (dados não mostrados).

A infecção induz alterações histológicas nos órgãos dos animais

Os animais dos grupos F5 e F5 Δ pic apresentaram alterações histopatológicas características de inflamação no baço, fígado e rins. Foi observada a presença de hemorragia, infiltrado celular e edema nesses órgãos, não sendo, entretanto, evidenciada a presença de necrose. Contudo, tais alterações histopatológicas não diferiram estatisticamente entre os grupos F5 e F5 Δ pic (Tabela 4).

Discussão

Neste trabalho mostramos que Pic, uma importante serinoprotease produzida por algumas bactérias Gram-negativas, pode induzir sepse letal em animais infectados com bactérias que a produzem, uma vez que Pic afeta de maneira significativa a sobrevivência desses animais, promovendo a morte dos mesmos em até 24 h.

O papel de Pic como fator de virulência já vem sendo discutido em alguns trabalhos. Zhang et al. (2013), por exemplo, investigaram se a virulência de uma linhagem de *Shigella* (SF51), uma enterobactéria também produtora de Pic, estava associada à proteína. Por meio de ensaios de invasão em células HeLa *in vitro* e teste de

invasividade *in vivo* (Sereny test), foi verificado que Pic está associada com o potencial invasivo de *Shigella flexneri* 2a.

Harrington et al. (2009) e Abreu et al. (2016) também verificaram uma diferença na capacidade de colonização em camundongos infectados oralmente com as linhagens EAEC 042 e EPEC589, respectivamente. Nos seus experimentos, ambas as bactérias foram mais eficientes em colonizar o trato gastrointestinal dos animais infectados do que os mutantes em *pic*, mostrando que Pic é um importante fator de virulência envolvido na colonização. Porém, a influência de Pic na indução da sepse em animais ainda não havia sido testada e tão pouco os desfechos imunológicos resultantes de uma infecção mediada por bactérias produtoras de Pic.

Neste trabalho, o cultivo das amostras de sangue dos animais revelou que a única cepa capaz de se manter viável na corrente sanguínea foi a *E. coli* F5. Esses dados mostram que Pic é essencial para a sobrevivência da bactéria na circulação, uma vez que o mutante em *pic* (*E. coli* F5 Δ *pic*) não foi capaz de sobreviver no sangue. A sobrevivência das bactérias no soro aumenta o seu potencial de disseminação pelo organismo, favorecendo sua permanência em diversos órgãos - a exemplo do baço, fígado, pulmão e, possivelmente, outros órgãos - promovendo, desta forma, uma infecção disseminada que culminou na morte dos animais em menos de 24 horas.

A resistência ao soro de cepas de *E. coli* produtoras da serinoprotease Pic já havia sido demonstrada em modelo *in vitro* (HENDERSON et al., 1999). O mecanismo de resistência também já foi elucidado por Abreu et. al. (2015), ao demonstrarem que Pic promove a clivagem direta de moléculas chave das três vias do sistema complemento, inativando um dos principais mecanismos de reação imune. Dessa forma, uma bactéria capaz de sobreviver na corrente sanguínea torna-se um potencial agente causador de sepse.

Além da presença de bactérias viáveis no sangue, o grupo F5 também apresentou um maior número de bactérias no peritônio 12h após infecção, quando comparado ao grupo F5 Δ *pic*. Este resultado aponta para uma falha na eliminação das bactérias produtoras de Pic, o que é plausível uma vez que o número de leucócitos na cavidade peritoneal do grupo F5 estava reduzido, não sendo assim capaz de conter a infecção. Esse menor número de leucócitos no peritônio pode decorrer de três processos: deficiência na

produção (hematopoese), morte celular (apoptose) e falha migração para a cavidade peritoneal.

A deficiência na produção é uma alternativa pouco provável, visto que o número total de células da medula óssea não apresentou diferença entre os grupos, indicando que a serinoprotease Pic não interfere na hematopoese das células sanguíneas. A morte celular de leucócitos, por sua vez, é um fenômeno frequentemente descrito no contexto da sepse (WESCHE et al., 2005), que pode desencadear um estado de imunossupressão deixando o hospedeiro susceptível à infecção (HOTCHKISS et al., 2013), podendo ser também ativado pela serinoprotease Pic (RUIZ-PEREZ et al., 2011).

A falha na migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal também é uma alternativa que pode ser explicada com base em uma das propriedades biológicas de Pic, que reside na sua capacidade de clivar glicoproteínas presentes na superfície dos leucócitos, o que interfere em processos como quimiotaxia, transmigração, ativação e apoptose (RUIZ-PEREZ et al., 2011; AYALA-LUJAN et al., 2014). Além disso, a deficiente migração leucocitária para o sítio infeccioso também pode ser explicada em função da produção de NO, pois já foi demonstrado que o mesmo pode interferir nesse processo por inibir a expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial (BENJAMIM et al., 2002).

Qualquer que seja a causa da redução de leucócitos no peritônio, seja uma das alternativas supracitadas ou a ação sinérgica destas (Figura 15), a diminuição dessas células no foco infeccioso prejudica o controle da infecção e favorece a multiplicação e disseminação do patógeno (SHEN et al., 2017), o que pode também justificar diminuição da sobrevivência dos animais do grupo F5.

A contagem de células sanguíneas mostrou uma baixa quantidade de leucócitos no grupo infectado com bactérias produtoras de Pic, especialmente de linfócitos. Essa deficiência de leucócitos na corrente sanguínea pode decorrer do processo de apoptose de linfócitos. Embora a maioria dos relatos de apoptose no contexto da sepse tenham focado na apoptose nos tecidos, a literatura também descreve a ocorrência deste processo em linfócitos do sangue periférico (LE TULZO et al., 2002; HOTCHKISS et al., 2005). Além disto, pacientes com sepse tendem a ter uma diminuição persistente no número absoluto de linfócitos através do curso da sepse (LE TULZO et al., 2002), sendo que as perdas por apoptose podem afetar seus vários subconjuntos, em especial linfócitos B e as

células T CD4 (HOTCHKISS et al., 2001). Essa depleção de linfócitos está associada à mortalidade na sepse (FELMET et al., 2005; DREWRY et al., 2014), fato que é corroborado por estudos que mostram uma melhora na sobrevivência de indivíduos sépticos quando a apoptose de linfócitos foi mitigada (HOTCHKISS et al., 2000; OBERHOLZER et al., 2001).

A infecção dos animais com o mutante F5 Δ pic ocasionou um aumento no número total de leucócitos, especialmente de neutrófilos, o que não foi observado no grupo F5. Os neutrófilos são essenciais no contexto da resposta imune inata, exercendo uma função primordial durante a resposta imune inicial na sepse no sentido de eliminar os microrganismos invasores (CRACIUN et al., 2010) e uma falha na sua produção e/ou função pode impactar de forma significativa a habilidade do sistema imune em controlar a infecção (NAVARINI et al., 2009). Assim, a reduzida quantidade de neutrófilos nos animais do grupo F5 também pode ter contribuído para a alta taxa de mortalidade encontrada neste grupo.

Os animais infectados com *E. coli* F5 ainda apresentaram uma deficiência na produção de agentes microbicidas. A produção de peróxido de hidrogênio na cavidade peritoneal não mostrou diferença significativa entre os grupos e a enzima iNOS também apresentou baixa expressão no peritônio dos animais deste grupo. Outros estudos já demonstraram a importância de NO sintetizado via iNOS no controle da infecção na sepse, onde camundongos deficientes de iNOS falharam em conter a replicação de *Listeria monocytogenes* *in vivo* (MACMICKING et al., 1995). Em outro trabalho, camundongos deficientes de iNOS submetidos a sepse letal e sub-letal induzida por ligadura e perfuração do ceco sofreram uma alta taxa de letalidade, sendo esta atribuída à falta de atividade antimicrobiana de neutrófilos deficientes de iNOS e sua incapacidade de produzir NO. A falha no controle da infecção foi ainda evidenciada pelo alto número de exsudatos bacterianos detectados nesses camundongos deficientes de iNOS (BENJAMIM et al., 2002).

Além de afetar a produção de agentes bactericidas, Pic também compromete a expressão de moléculas envolvidas no processo de co-estimulação presentes tanto nos linfócitos T auxiliares do baço, quanto em macrófagos no peritônio. A expressão debilitada de co-estimuladores representa uma das vias que leva à imunossupressão na sepse. Semelhantemente ao nosso estudo, Inoue e colaboradores (2013) encontraram uma

redução na expressão de CD28 em linfócitos T CD4+ e CD8+ em idosos com sepse. Em outro trabalho, macrófagos peritoneais isolados de animais submetidos a sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) também apresentaram uma significativa redução de CD86 (NEWTON 2004), corroborando os nossos resultados. Vale ressaltar que, neste trabalho, os animais infectados com a cepa F5 podem ter apresentado uma redução das moléculas co-estimuladoras devido à clivagem proteolítica destas moléculas por Pic, visto que Ruiz-Perez et al. (2011) já demonstraram a ação proteolítica da proteína Pic sobre glicoproteínas superficiais de leucócitos.

Neste estudo, a serinoprotease Pic ainda mostrou ser uma importante molécula indutora da produção de citocinas e quimiocina, visto que todas as citocinas testadas (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-10, MCP-1) foram detectadas nas amostras de soro do grupo F5, de modo significativo em relação aos demais grupos, sendo as concentrações de IL-6 e MCP-1 as de valores mais elevados tanto em amostras de soro quanto nas do lavado peritoneal dos animais. Outros trabalhos também têm relatado a alta produção de citocinas no contexto da sepse, a exemplo da IL-6, bem como da quimiocina MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos) (MACIEL et al., 2014; RIOS et al., 2017).

Já foi mostrado que a IL-6 induz a expressão de mRNA e a secreção de MCP-1 em células mononucleares de sangue periférico humano (BISWAS et al., 1998). Há também relatos de que MCP-1 pode induzir a expressão de citocinas, incluindo IL-6, em monócitos humanos (JIANG et al., 1992) e o tratamento de camundongos sépticos com anticorpos anti-MCP-1 reduz os níveis de IL-6 no soro (SPEYER et al., 2004), o que sugere uma alternativa ou complementar alça de amplificação da resposta inflamatória.

A produção exacerbada de IL-6 é um indicativo de mau prognóstico em pacientes com sepse, estando associada com uma maior propensão de mortalidade. Valores mais altos de IL-6 mensurados ao longo do período de internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) evidenciam uma manutenção do estímulo inflamatório, estando associado ao posterior óbito do paciente, ao passo que uma diminuição significativa nos níveis dessa citocina foi detectada entre os pacientes que sobreviveram, mostrando que o aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 pode ser considerado um bom marcador precoce na predição da mortalidade entre pacientes sépticos (BENEYTO et al., 2016).

Em modelos animais de sepse, a relação de IL-6 com mortalidade foi evidenciada em trabalhos que mostram um aumento da sobrevida de animais cujo nível de IL-6 foi

diminuído por bloqueio da via de sinalização dessa citocina (RIEDEMANN et al., 2003; BARKHAUSEN et al., 2011). Modelos de sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) e endotoxemia em animais também detectaram um aumento significativo nos níveis de MCP-1, indicando um papel dessa quimiocina como mediador pró-inflamatório na sepse (RAMNATH et al., 2008).

Em humanos, altas concentrações de MCP-1 também têm sido relacionadas com mortalidade na sepse. Alguns trabalhos têm detectado concentrações plasmáticas de MCP-1 mais elevadas em pacientes que faleceram do que entre os sobreviventes (ZHU et al., 2017), estando, portanto, significativamente diminuída com a resolução da sepse (SANS et al., 2012).

Além da produção de citocinas e quimiocina, neste trabalho também foi observada uma elevada produção sérica de NO nos animais do grupo F5. Estímulos inflamatórios deflagrados durante um estado de sepse podem aumentar a produção de NO, promovendo a vasodilatação periférica, queda da pressão arterial, com consequente redução da perfusão sanguínea e hipóxia tecidual, o que contribui para a falência de múltiplos órgãos (ELLIS et al., 2002; TRZECIAK et al., 2007), estando sua produção em excesso relacionada com mau prognóstico em pacientes com sepse (SANTOS et al., 2012). A produção excessiva de NO pode também prejudicar o processo de adesão ao endotélio, rolamento e migração de neutrófilos para o foco infeccioso (BENJAMIM et al., 2002).

As amostras histológicas do baço, fígado e rins dos animais apresentaram hemorragia, infiltrado celular e edema nos órgãos dos animais dos grupos F5 e F5 Δ pic. Tais alterações certamente foram causadas pela presença das bactérias nos tecidos, independente da presença de Pic. Estudos prévios já apontaram que Pic não possui efeito citopático (DUTTA et al., 2002), não sendo capaz de induzir dano ao tecido. Dessa forma, provavelmente outros fatores de virulência presentes em ambas as bactérias podem estar associados aos danos.

Os resultados em conjunto mostram que Pic interfere na sobrevivência dos animais infectados com bactérias produtoras dessa serinoprotease, possivelmente devido à capacidade dessas bactérias em sobreviver na corrente sanguínea, alterar a dinâmica de leucócitos e induzir uma alta produção de mediadores pró-inflamatórios pelo organismo infectado (Figura 16).

Referências

- ABREU AG, ABE CM, NUNES KO, MORAES CT, CHAVEZ-DUENAS L, NAVARRO-GARCIA F, BARBOSA AS, PIAZZA RM, ELIAS WP. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Gut microbes 2016; 7:115-125.
- ABREU AG, FRAGA TR, MARTINEZ APG, KONDO MY, JULIAN M.A, JULIANO L, NAVARRO-GARCIA F, ISAAC L, BARBOSA AS, ELIAS WP. The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. J. Infect. Dis. 2015; 212:106-115.
- AYALA-LUJAN JL, VIJAYAKUMAR V, GONG M, SMITH R, SANTIAGO AE, RUIZ-PEREZ F. Broad spectrum activity of a lectin-like bacterial serine protease family on human leukocytes. PLoS ONE 2014; 9(9):1-14.
- BARKHAUSEN T, TSCHERNIG T, ROSENSTIEL P, VAN GRIENSVEN M, VONBERG RP, DORSCH M, et al. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. Crit Care Med 2011; 39:878–88.
- BENEYTO LAP, LUIS OR, LUIS CS, SIMÓN OC, RENTERO DB, BAYARRI VM. Prognostic value of interleukin 6 for death of patients with sepsis. Medicina Clinica (Barc) 2016, 147(7):281–286.
- BENJAMIM CF, SILVA JS, FORTES ZB, OLIVEIRA MA, FERREIRA SH, CUNHA FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. Infection Andimmunity 2002; 70(7):3602–3610.
- BISWAS P, DELFANTI F, BERNASCONI S, MENGOZZI M, COTA M, POLENTARUTTI N, MANTOVANI A, LAZZARIN A, SOZZANI S, POLI G. Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. Blood 1998; 91(1):258-265.
- BREITSCHWERDT EB, LOAR AS, HRIBERNIK TN, GRATH RK. Hypoglycemia in four dogs with sepsis. J American Vet Med Assoc 1981; 178:1072-1076.
- CRACIUN FL, SCHULLER ER, SCHULLER DG. Early enhanced local neutrophil recruitment in peritonitis-induced sepsis improves bacterial clearance and survival. The Journal of Immunology 2010; 185:6930-6938.
- CROXEN MA, LAW RJ, SCHOLZ R, KEENEY KM, WLODARSKA M, FINLAY BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews 2013; 26:822– 880.

DATSENKO KA, WANNER BL. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000; 97:6640-6645.

DE KRAKER MEA, JARLIER V, MONEN JCM, HEUER OE, VAN DE SANDE N, GRUNDMANN H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Clin Microbiol Infect 2013; 19(9): 860-8.

DREWRY AM, SAMRA N, SKRUPKY LP, FULLER BM, COMPTON SM, HOTCHKISS RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. Shock 2014; 42(5): 383–391.

DUTTA PR, CAPPELLO R, NAVARRO-GARCIA F, NATARO JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. Infect Immun 2002; 70(12):7105–13.

ELLIS CG, BATEMAN RM, SHARPE MD, SIBBALD WJ, GILL R. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 282:H156-H164.

FELMET KA, HALL MW, CLARK RSB, JAFFE R, CARCILLO JA. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. J Immunol 2005; 174:3765-377.

HARRINGTON SM, SHEIKH J, HENDERSON IR, RUIZ-PEREZ F, COHEN PS, NATARO JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. Infect. Immun. 2009; 77:2465-2473.

HENDERSON IR, CZECHULIN J, ESLAVA C, NORIEGA F, NATARO JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1999; 67:5587-96.

HERZOG K, ENGELER DUSEL J, HUGENTOBLE M, BEUTIN L, SÄGESSER G, STEPHAN R, HÄCHLER H, NÜESCH-INDERBINEN M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. Infection 2014; 42:441-4.

HOTCHKISS RS, CHANG KC, SWANSON PE, TINSLEY KW, HUI JJ, KLENDER P, XANTHOUDAKIS S, ROY S, BLACK C, GRIMM E, et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. Nat. Immunol. 2000; 1:496.

HOTCHKISS RS, MONNERET G, PAYEN D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. Nature Reviews Immunology 2013; 13:862-874.

HOTCHKISS RS, OSMON SB, CHANG KC, WAGNER TH, COOPERSMITH CM, KARL IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathway. *The Journal of Immunology* 2005; 174:5110-5118.

HOTCHKISS RS, TINSLEY KW, SWANSON PE, SCHMIEG RE, HUI JJ, CHANG KC, OSBORNE DF, FREEMAN BD, COBB JP, BUCHMAN TG, KARL IE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *The Journal of Immunology*, 166:6952-6963; 2001.

INOUE S, SUZUKI-UTSUNOMIYA K, OKADA Y, IIDA Y, TAIRA T, MIURA N, TSUJI T, YAMAGIWA T, MORITA S, CHIBA T, SATO T, INOKUCH S. Reduction of Immunocompetent T Cells Followed by Prolonged Lymphopenia in Severe Sepsis in the Elderly. *Crit Care Med*, 41:810–819; 2013.

JIANG Y, BELLER DI, FREN DL G, GRAVES DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol*. 1992; 148(8):2423-8.

JOHNSON JR, RUSSO TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. *J Lab Clin Med* 2002; 139:155-62.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2(2):123–140.

LAUPLAND, K.B., GREGSON, D.B., CHURCH, D.L., ROSS, T., PITOUT, J.D. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14(11);1041–1047.

LE TULZO, Y., C. PANGAULT, A. GACOUIN, V. GUILLOUX, O. TRIBUT, L. AMIOT, P. TATTEVIN, R. THOMAS, R. FAUCHET, AND B. DRENOU. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002; 18:487.

LUPU F, KESHARI RS, LAMBRIS JD, COGGESHALL KM. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. *Thromb Res*. 2014; 133(01):28–31.

MACHADO FR, MAZZA BF. Improving mortality in sepsis: analysis of clinical trials. *Shock*, 4:54-58; 2010.

MACIEL MCG, FIALHO EMS, GUERRA RNM, BORGES VM, KWASNIEWSKI FH, NASCIMENTO FRF. *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. *Toxicon* 2014; 89:1-8.

MACMICKING JD, NATHAN C, HORN G, CHARTRAIN N, FLETCHER DS, TRUMBAUER M, STEVENS K, XIE O, SOKOL K, HUTCHINSON N, CHEN H,

MUDGETT JS. Altered Responses to Bacterial Infection and Endotoxic Shock in Mice Lacking Inducible Nitric Oxide Synthase. *Cell*, 61:641-650; 1995.

MAYR FB, YENDE S, ANGUS S. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014; 5:4–11.

MEDZHITOV R, JANEWAY JR C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000; 173:89-97.

MIAJLOVIC H, AOGA MM, COLLINS CJ, ROGERS TR, SMITH SGJ. Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. *Journal of Medical Microbiology* 2016; 65:71–79.

MINASYAN H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. *Journal of Critical Care* 2017; 40: 229–242.

MIQUELIN PRS, REIS GR. Comparação entre as taxas de morbimortalidade de pacientes com septicemia em todos os estados da federação e o Distrito Federal. *Amazônia Science & Health* 2016; 4:420-24.

MIRANDA KM, ESPEY M, WINK DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide: Biol. Chem.* 2001; 5:62-71.

MORA-RILLO M, FERNÁNDEZ-ROMERO N, NAVARRO-SANFRANCISCO C, DÍEZ-SEBASTIÁN J, ROMERO-GÓMEZ MP, FERNÁNDEZ FA, LÓPEZ JRA, MINGORANCE J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence* 2015; 6(1):93-100.

NAVARINI AA, LANG KS, VERSCHOOR A, RECHER M, ZINKERNAGEL AS, NIZET V, et al. Innate immune-induced depletion of bone marrow neutrophils aggravates systemic bacterial infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:7107–12.

NEWTON S, DING Y, CHUNG CS, CHEN Y, LOMASNEIRA JL, AYALA A. Sepsis-Induced Changes in Macrophage Co-Stimulatory Molecule Expression: CD86 as a Regulator of Anti-Inflammatory IL-10 Response. *Surg Infect (Larchmt)*, 5(4): 375–383; 2004.

OBERHOLZER C, OBERHOLZER A, BAHJAT FR, MINTER RM, TANNAHILL CL, ABOUHAMZE A, LAFACE D, HUTCHINS B, CLARE-SALZLER MJ, MOLDAWER LL. Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98:11503.

PICARD B, GARCIA JS, GOURIOU S, DURIEZ P, BRAHIMI N, BINGEN E, ELION J, DENAMUR E. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun.* 1999; 67:546-53.

PICK E, MIZEL D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Methods*, 46:211-226; 1981.

RAMNATH RD, WEI S, GUGLIELMOTTI A, BHATIA M. Role of MCP-1 in endotoxemia and sepsis. *International Immunopharmacology* 2008; 8:810–818.

RIEDEMANN NC, NEFF TA, GUO RF, BERNACKI KD, LAUDES IJ, SARMA JV, LAMBRIS JD, WARD PA. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol* 2003; 170(1):503–507.

RIOS CEP, ABREU AG, BRAGA FILHO JAF, NASCIMENTO JR, GUERRA RNM, AMARAL FMM, MACIEL MCG, NASCIMENTO FRF. *Chenopodium ambrosioides* L. improves phagocytic activity and decreases bacterial growth and the systemic inflammatory response in sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Front Microbiol.* 2017; 8:148, 1-10.

RUIZ-PEREZ F, WAHID R, FAHERTY CS, KOLAPPASWAMY K, RODRIGUEZ L, SANTIAGO A, MURPHY E, CROSS A, SZTEIN MB, NATARO JP. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108:12881-6.

RULIM ALL, RULIM MAB, ROLIM NETO ML, PITA P, BATISTA IL. Sepsis Epidemiology: Settings and Contexts. *International Archives of Medicine* 2017; 10(155).

SANS T, RULL A, LUNA J, MACKNESS B, MACKNESS M, JOVEN J, IBAÑEZ M, PARIENTE R, RODRIGUEZ M, ORTIN X, MASDEU G, CAMPS J. Monocyte chemoattractant protein-1 and paraoxonase-1 and 3 levels in patients with sepsis treated in an intensive care unit: a preliminary report. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2012; 50(8).

SANTOS SS, BRUNIALTI MKC, RIGATO O, MACHADO FR, SILVA E, SALOMAO R. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. *Shock* 2012; 38(1):18-23.

SHEN X, CAO K, JIANG J, GUAN W, DU J. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. *J. Cell. Mol. Med.* 2017; 20(10):1-11.

SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, SHANKAR-HARI M, ANNANE D, BAUER M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):801-10.

SPEYER CL, GAO H, RANCILIO NJ, NEFF TA, HUFFNAGLE GB, SARMA JV, et al. Novel chemokine responsiveness and mobilization of neutrophils during sepsis. *Am J Pathol* 2004; 165:2187–96.

TRZECIAK S, DELLINGER RP, PARRILLO JE, GUGLIELMI M, BAJAJ J, ABATE NL, ARNOLD RC, COLILLA S, ZANOTTI S, HOLLENBERG SM. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. *Ann Emerg Med* 2007; 49:88-98.

VAN DER POLL T, VAN DE VEERDONK FL, SCICLUNA BP, NETEA MG. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology* 2017; 17:407-420.

WESCHE DE, LOMAS-NEIRA JL, PERL M, CHUNG CS, AYALA A. Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *Journal of Leukocyte Biology* 2005; 78:325-337.

WISPLINGHOFF H, BISCHOFF T, TALLENT SM, SEIFERT H, WENZEL RP, EDMOND MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309-17.

World Health Statistics 2016: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2016.

ZHANG J, QIAN L, WU Y, CAI Y, LI X, CHENG X, QU D. Deletion of pic results in decreased virulence for a clinical isolate of *Shigella flexneri* 2a from China. *BMC Microbiology* 2013; 13(31):1-10.

ZHU T, LIAO X, FENG T, WU Q, ZHANG J, CAO C, LI H. Plasma Monocyte Chemoattractant Protein 1 as a Predictive Marker for Sepsis Prognosis: A Prospective Cohort Study. *Tohoku J. Exp. Med.* 2017, 241:139-147.

Tabelas, figuras e legendas

Tabela 2. Painel de marcadores para células do baço.

FLUOROCROMO	FITC	PE	PERCP
PAINEL 1	CD3	CD28	CD4
PAINEL 2	CD3	CD28	CD8

Tabela 3. Painel de marcadores para células do lavado peritoneal.

FLUOROCROMO	FITC	PE	PERCP
PAINEL 1	CD3	CD28	CD4
PAINEL 2	CD3	CD28	CD8
PAINEL 3	CD14	CD80	iNOS
PAINEL 4	CD14	CD86	iNOS
PAINEL 5	Ia-Ie	CD19	Ly6G

Tabela 4. Avaliação histopatológica do baço, fígado e rins dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle.

		Hemorragia	Infiltrado	Necrose	Edema
Rim	Controle	0	0	0	0
	F5	1,0 ± 0,6 ^a	1,4 ± 0,5	0	1,6 ± 0,5
	F5Δ <i>pic</i>	0,16 ± 0,3	1,33 ± 0,4	0	0,83 ± 0,7
Baço	Controle	0	0	0	0
	F5	1,2 ± 1,2	2,25 ± 0,4	0	1,2 ± 1,0
	F5Δ <i>pic</i>	0,8 ± 0,7	2 ± 0,6	0	1,8 ± 1,2
Fígado	Controle	0	0	0	0
	F5	0	1,0 ± 0	0	0,2 ± 0,4
	F5Δ <i>pic</i>	0	0,83 ± 0,7	0	0,66 ± 0,7

Doze horas após a inoculação peritoneal de bactérias, fragmentos do fígado, baço e rim dos animais foram removidos, pesados e fixados em formol 10% por 24 h, desidratados em álcool e embebidos em parafina. A análise histopatológica foi realizada com auxílio de microscópio ótico.

n = 6 animais/grupo

^a Os resultados estão expresso como média ± SD dos escores: 0-ausente, 1-leve, 2-moderado, 3-intenso.

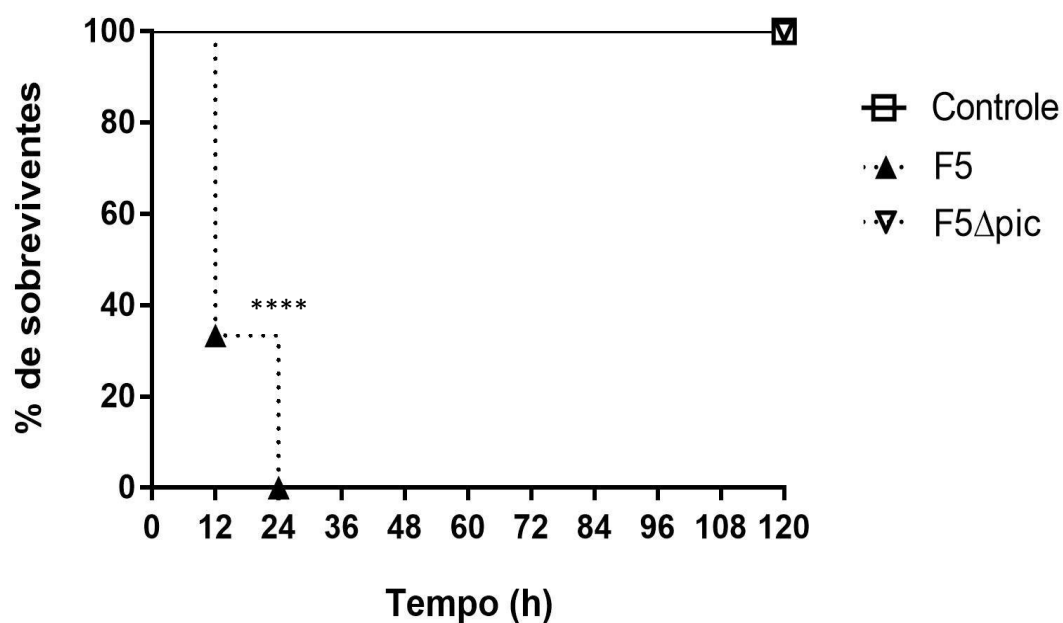


Figura 3. Curva de sobrevivência dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica. Os animais usados no experimento foram distribuídos em três grupos (6 animais/grupo). Os animais do grupo controle receberam injeções contendo 200 μ L água apirogênica. Os demais grupos receberam 200 μ L de suspensões bacterianas (*E. coli* F5 e F5 Δ pic) contendo 10^9 UFC/mL. Em seguida, o número de óbitos foi avaliado durante 5 dias com intervalos de 12/12 horas após a infecção.

****p < 0,0001 quando comparado com os demais grupos.

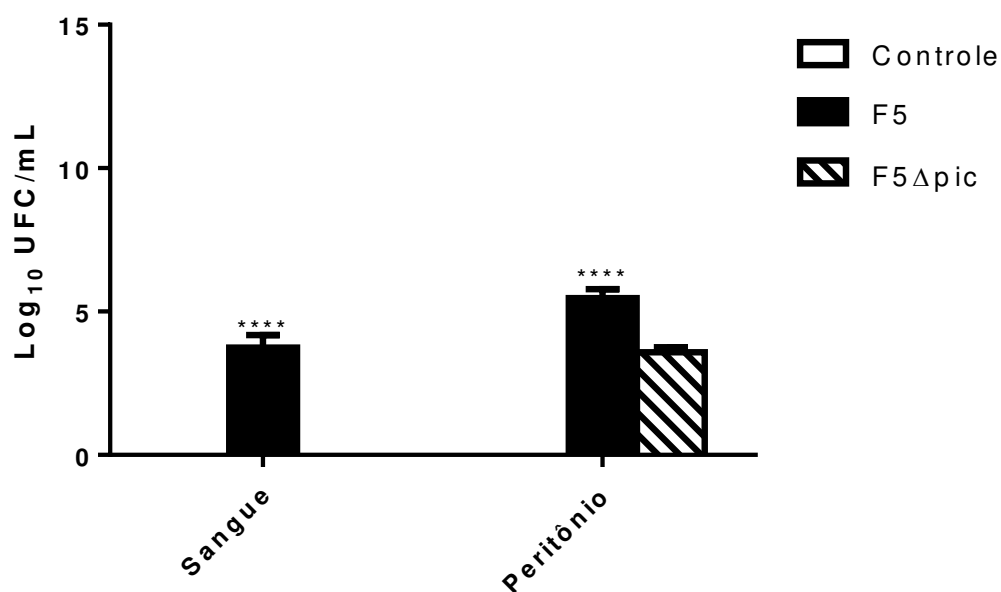


Figura 4. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) das amostras de sangue e lavado peritoneal dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica. Para avaliação das UFCs, alíquotas do sangue e do líquido peritoneal foram diluídas em PBS estéril e diluições seriadas, até a concentração de 10^{-5} , foram semeadas em ágar MacConkey. As UFCs foram contadas após incubação *overnight* a 37°C. Os resultados estão expressos como Log de UFC/mL e representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

****p < 0,0001 quando comparado com os demais grupos.

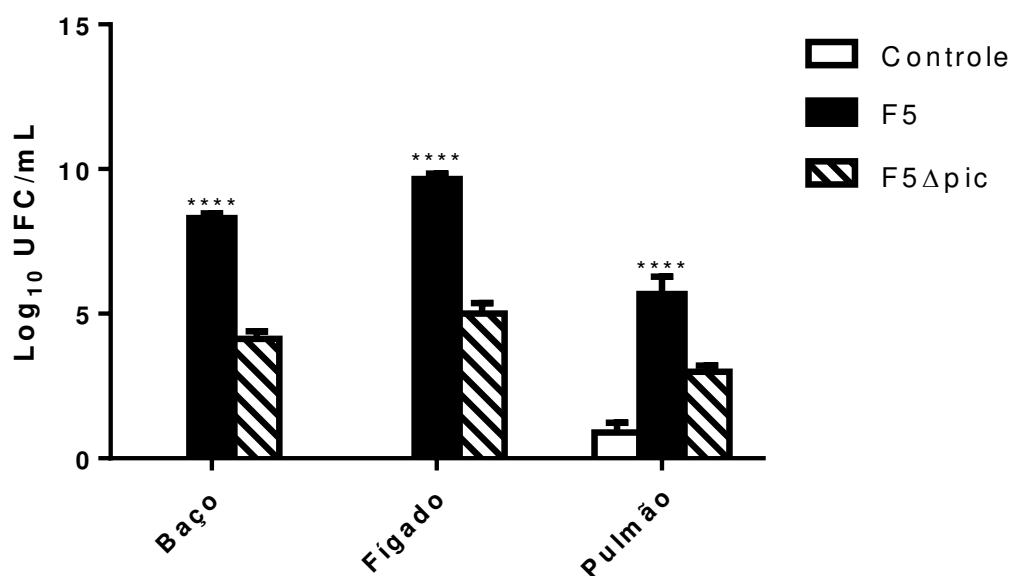


Figura 5. Contagem de UFCs das amostras do baço, fígado e pulmão dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica. Para avaliação da presença de bactérias nos órgãos, uma parte dos mesmos foi pesada, macerada e diluições seriadas, até a concentração de 10^{-5} , foram semeadas em ágar MacConkey. As UFCs foram contadas após incubação *overnight* a 37°C. Os resultados estão expressos como Log de UFC/mL e representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

**** $p < 0,0001$ quando comparado com os demais grupos.

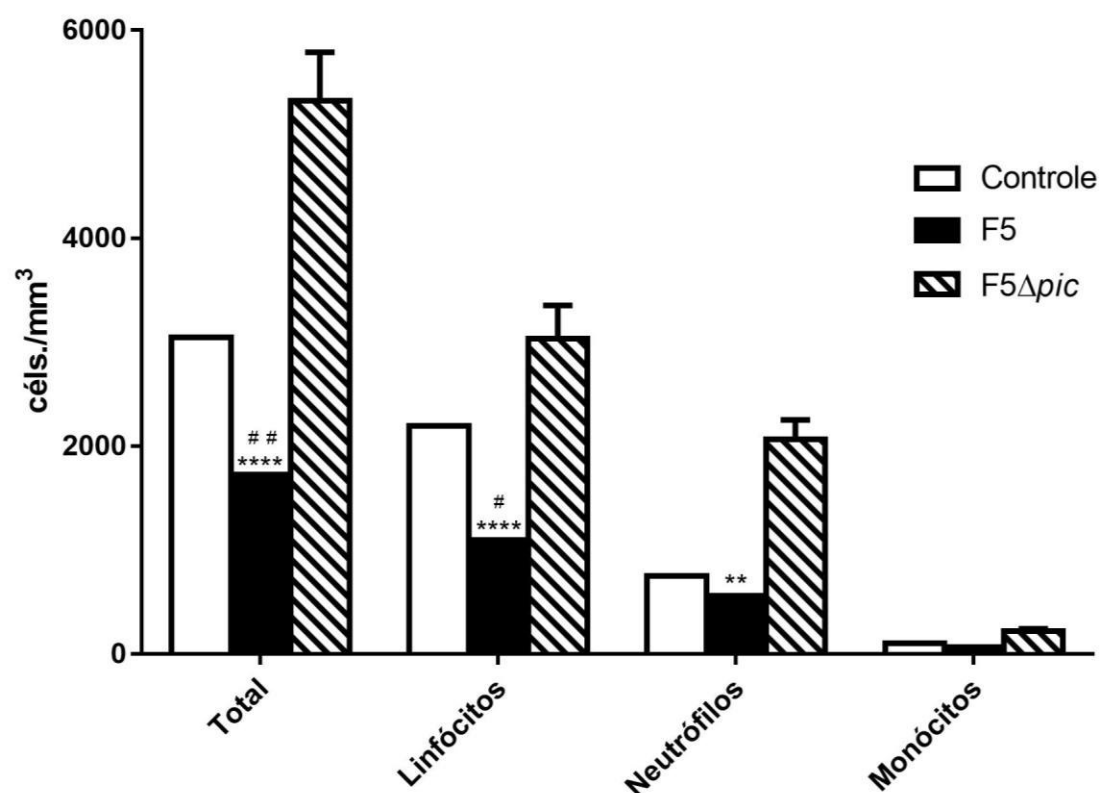


Figura 6. Contagem diferencial das células sanguíneas dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica. Doze horas após indução da sepse por inoculação peritoneal de bactérias, os animais já anestesiados foram submetidos à punção retro orbital para coleta do sangue destinado a contagem celular total e diferencial, que foi realizada por método automatizando, utilizando o Bioclin 2.8 Vet (Bioclin, Brasil). Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

$p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle.

$p < 0,01$ quando comparado com o grupo controle.

** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo F5Δpic.

**** $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo F5Δpic.

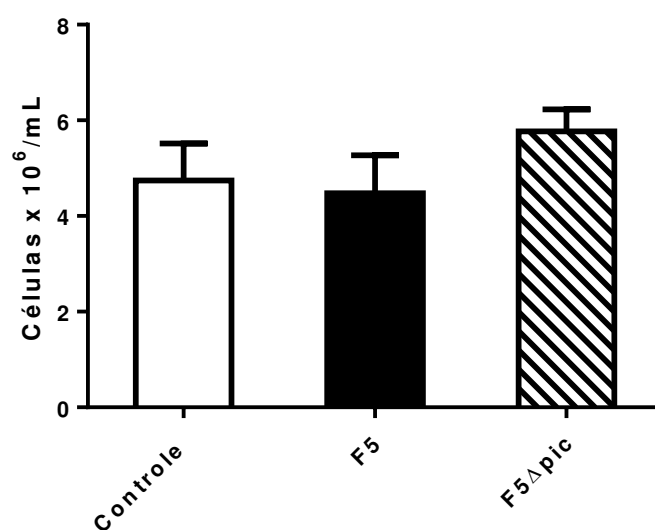


Figura 7. Contagem do número total de células da medula óssea dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica. Doze horas após a indução da sepse, as células da medula óssea foram obtidas por meio da perfusão do fêmur dos animais com 1 mL de PBS. As células foram coradas com cristal violeta a 0,05% em ácido acético a 30% e contadas com auxílio de um microscópio óptico de luz comum. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

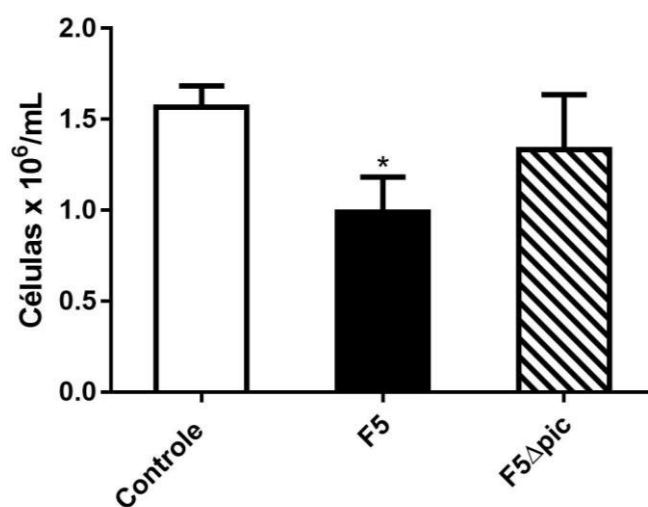


Figura 8. Contagem do número total de células do peritônio dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. As células peritoneais dos animais foram assepticamente coletadas a partir da lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL PBS estéril gelada, coradas com cristal violeta (0,05%) em ácido acético 30% na proporção de 9:1 e contadas com auxílio de um hemocítômetro (Sigma, USA), e de um microscópio óptico de luz comum. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

*p < 0,05 quando comparado com o grupo Controle.

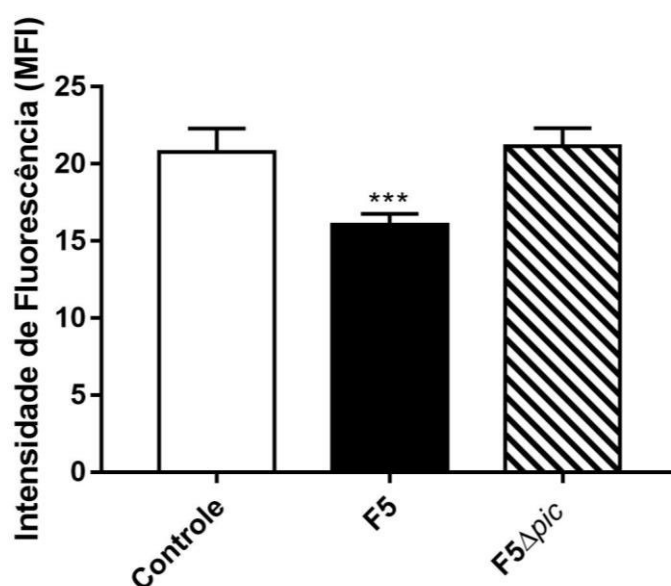


Figura 9. Intensidade mediana de fluorescência (MFI) da molécula CD28 em linfócitos T CD4⁺ oriundos do baço. Após contagem de células do baço, 10⁶ células/mL foram ressuspensas em tampão específico, transferidas para uma placa de 96 poços de fundo em “U”, marcadas com anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Os anticorpos utilizados e seus respectivos conjugados foram: anti-CD3 conjugado com FITC; anti-CD28 conjugado com PE e anti-CD4 conjugado com PerCP. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

***p < 0,001 quando comparado os demais grupos.

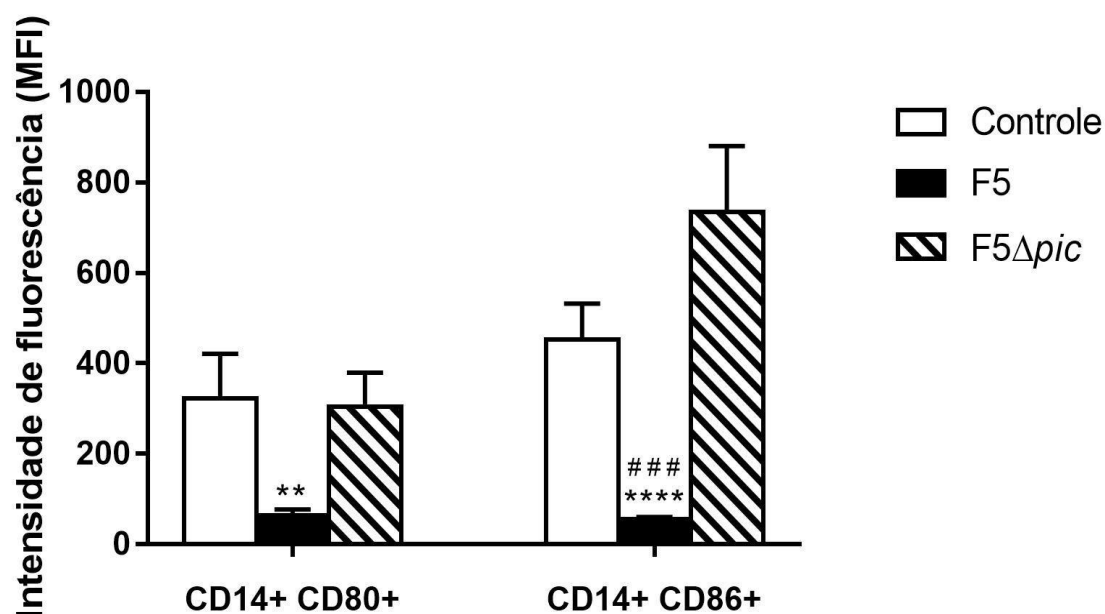


Figura 10. Intensidade mediana de fluorescência (MFI) das moléculas CD80 e CD86 em macrófagos oriundos da cavidade peritoneal. Após contagem de células da cavidade peritoneal, 10^6 células/mL foram ressuspensas em tampão específico, transferidas para uma placa de 96 poços de fundo em “U”, marcadas com anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Os anticorpos utilizados e seus respectivos conjugados foram: anti-CD14 conjugado com FITC; anti-CD80 e anti-CD86 conjugados com PE. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

** $p < 0,01$ quando comparado os demais grupos.

$p < 0,001$ quando comparado com o grupo Controle.

**** $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo F5Δpic.

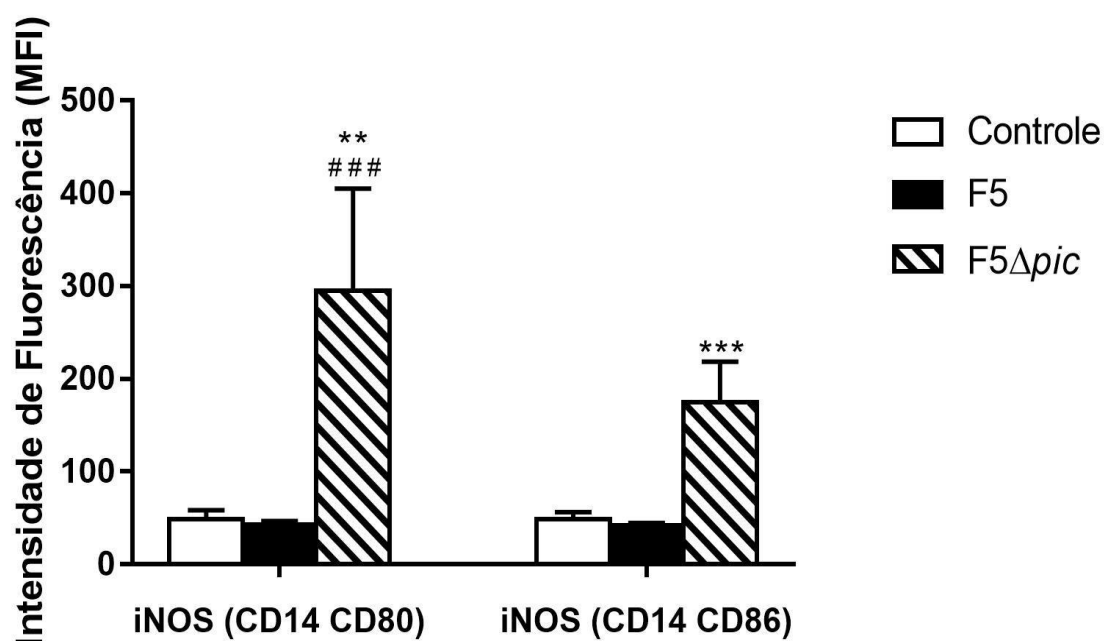


Figura 11. Intensidade mediana de fluorescência (MFI) da enzima oxido nítrico sintase induzível (iNOS) em macrófagos CD80+ e CD86+ oriundos da cavidade peritoneal. Após contagem de células da cavidade peritoneal, 10^6 células/mL foram ressuspensas em tampão específico, transferidas para uma placa de 96 poços de fundo em “U”, marcadas com anticorpos específicos e incubadas a 4°C por 15 minutos. Os anticorpos utilizados e seus respectivos conjugados foram: anti-CD14 conjugado com FITC; anti-CD80 e anti-CD86 conjugados com PE e anti-iNOS conjugado com PerCP.

Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo F5.

*** $p < 0,001$ quando comparado os demais grupos.

$p < 0,001$ quando comparado com o grupo Controle.

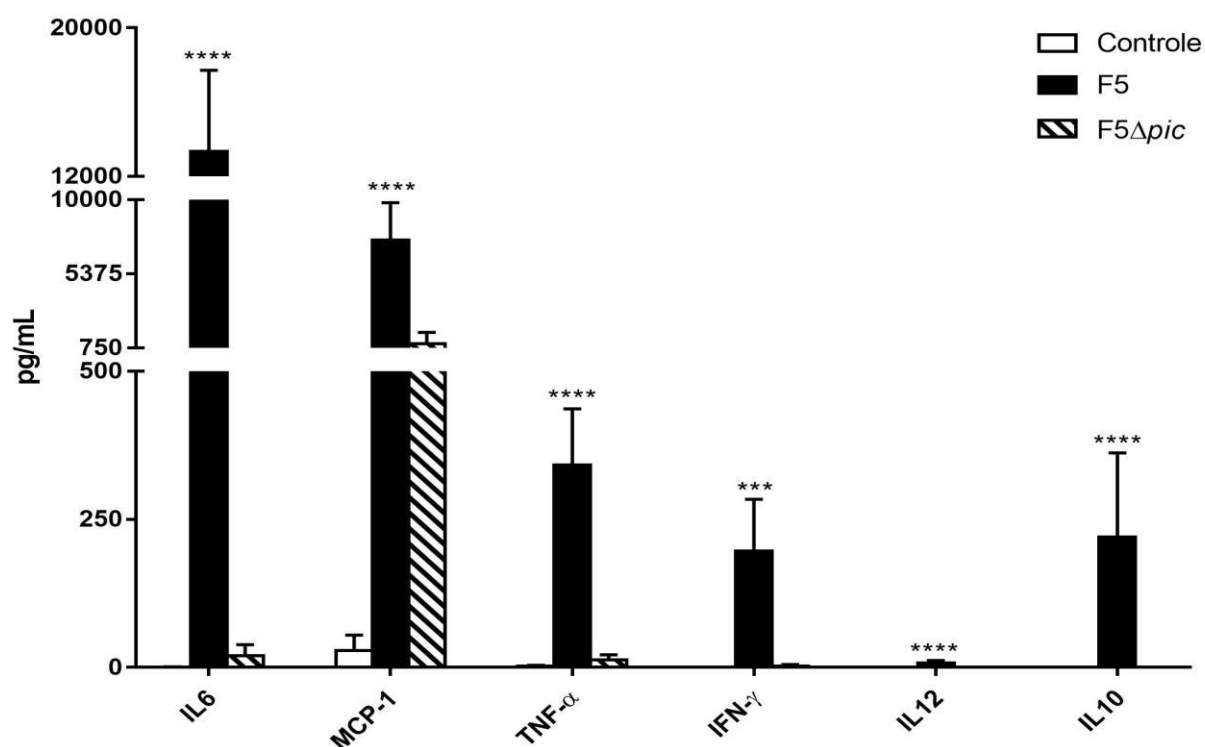


Figura 12. Concentração de citocinas no soro dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica. Doze horas após indução da sepse por inoculação peritoneal de bactérias, os soros dos animais foram obtidos e utilizados para a dosagem de citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12) e da quimiocina MCP-1. A quantificação destas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Bead Array) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo recomendações do fabricante. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

*** $p < 0,001$ quando comparado com os demais grupos.

**** $p < 0,0001$ quando comparado com os demais grupos.

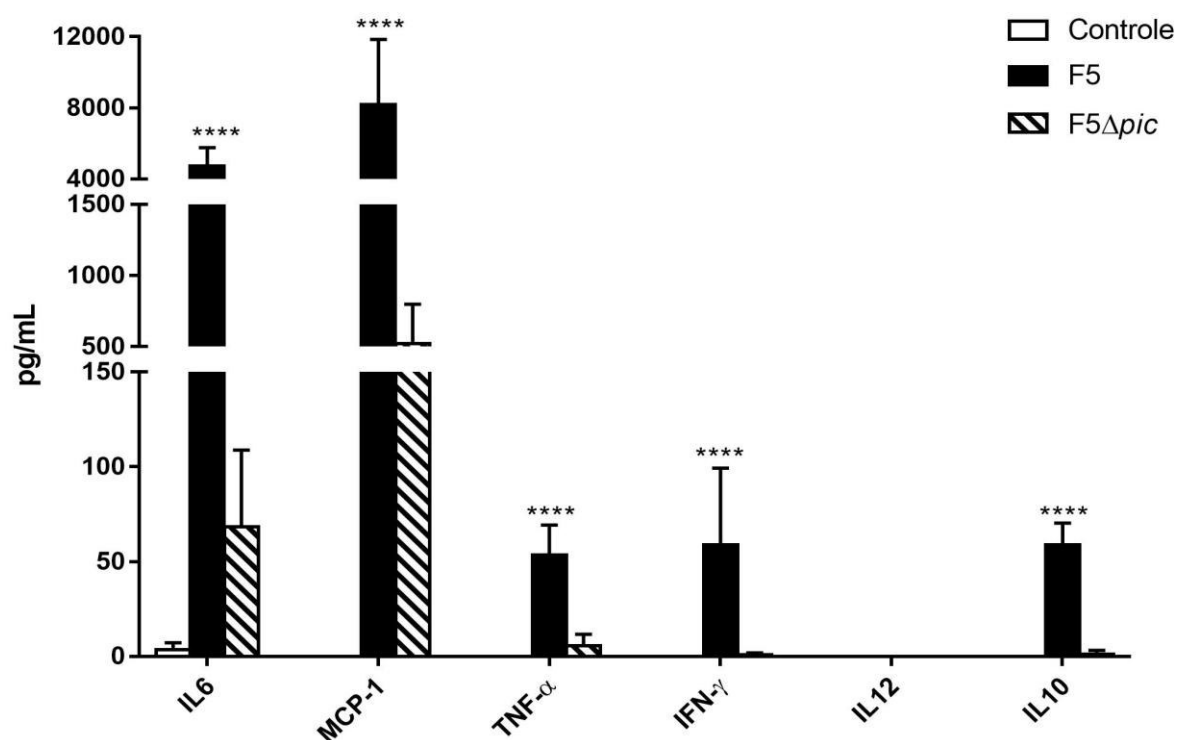


Figura 13. Concentração de citocinas no lavado peritoneal dos animais submetidos a inoculação intraperitoneal de bactérias e dos animais controle. Doze horas após indução da sepse por inoculação peritoneal de bactérias, os lavados peritoneais dos animais foram obtidos e utilizados para a dosagem de citocinas (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e IL-12) e da quimiocina MCP-1. A quantificação destas foi realizada por citometria de fluxo utilizando o kit CBA (Cytometric Bead Array) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo recomendações do fabricante. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

**** $p < 0,0001$ quando comparado com os demais grupos.

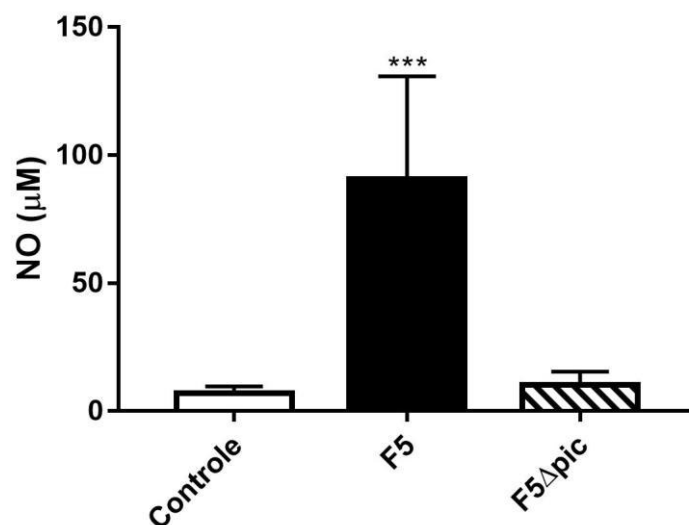


Figura 14. Produção de Óxido Nítrico no sangue dos animais submetidos à inoculação intraperitoneal de bactérias ou água apirogênica. Doze horas após a inoculação peritoneal de bactérias, os animais já anestesiados foram submetidos à punção retro orbital para coleta do sangue destinado a mensuração sérica de NO via dosagem de nitrito. Os resultados representam a média $\pm$ S.D. de 6 animais por grupo.

*** $p < 0,001$ quando comparado com os demais grupos.

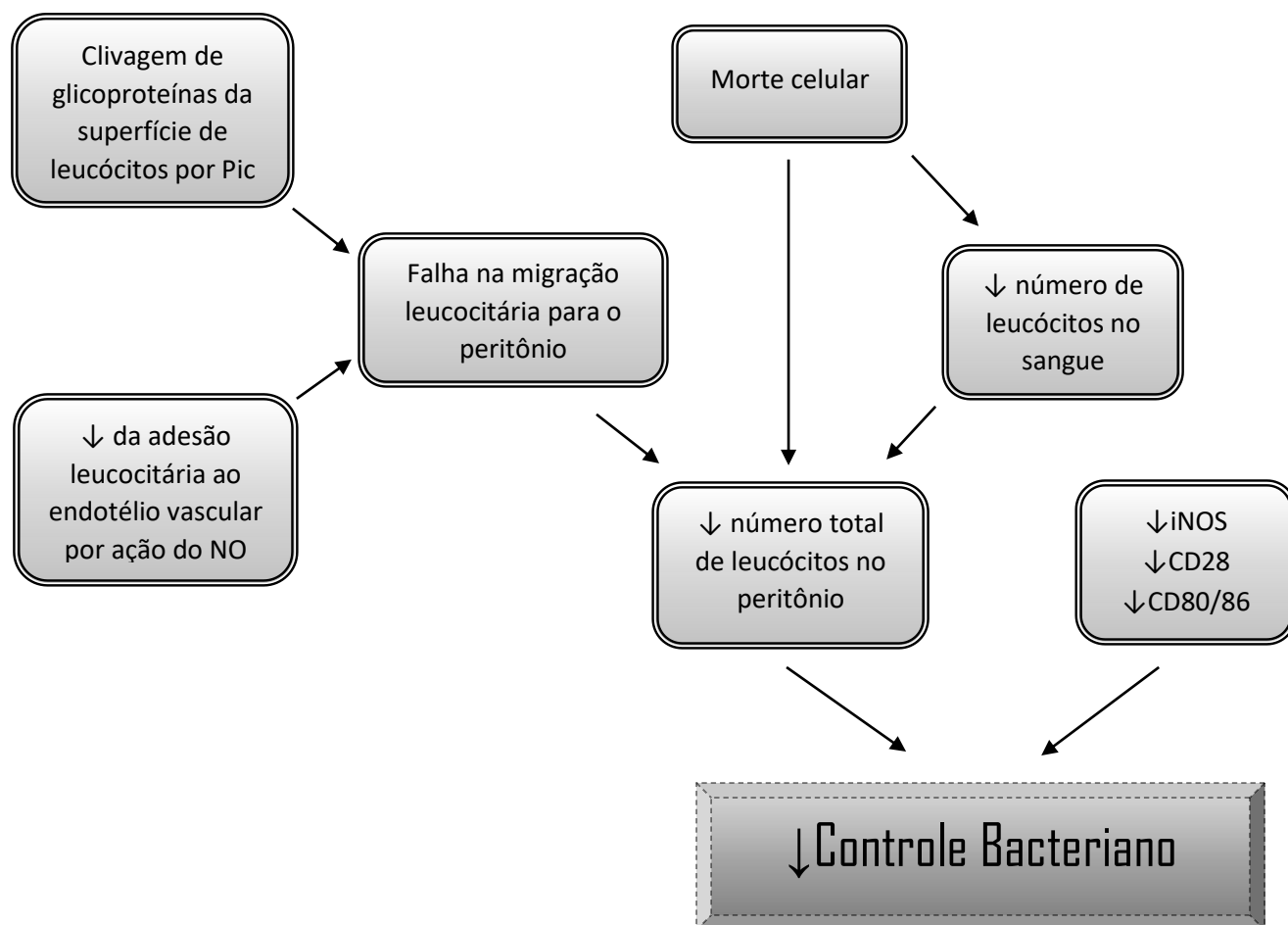


Figura 15. Mecanismos que justificam a falha no controle bacteriano no grupo F5. A determinação das Unidades Formadoras de Colônias do lavado peritoneal dos animais mostrou que o grupo F5 ainda continha uma grande quantidade de bactérias no sítio infeccioso inicial em comparação ao grupo mutante, evidenciando uma falha no controle de bactérias produtoras de Pic. Esse controle ineficiente pode ser explicado por distintos mecanismos não excludentes. Um reduzido quantitativo de leucócitos totais na cavidade peritoneal (que pode ter decorrido de uma falha na migração destes e/ou da sua morte por apoptose) é um reflexo da redução leucocitária também detectada no sangue dos animais do grupo F5. Essa falha na migração de leucócitos para o peritônio, por sua vez, é embasada por trabalhos que mostram: (1) a capacidade de Pic clivar glicoproteínas da superfície de leucócitos envolvidas nos processos de adesão, rolamento e transmigração para o foco infeccioso; e (2) a falha na migração via ação NO sobre a expressão de moléculas de adesão pelo endotélio vascular. Além de reduzir o número de leucócitos no peritônio e sangue, Pic também compromete a expressão de moléculas co-estimuladoras nos leucócitos, assim como a expressão de iNOS e consequente produção de NO, comprometendo os processos de ativação de células imunes e produção de agentes microbicidas, respectivamente, o que também pode contribuir para a ineficiente eliminação das bactérias F5.

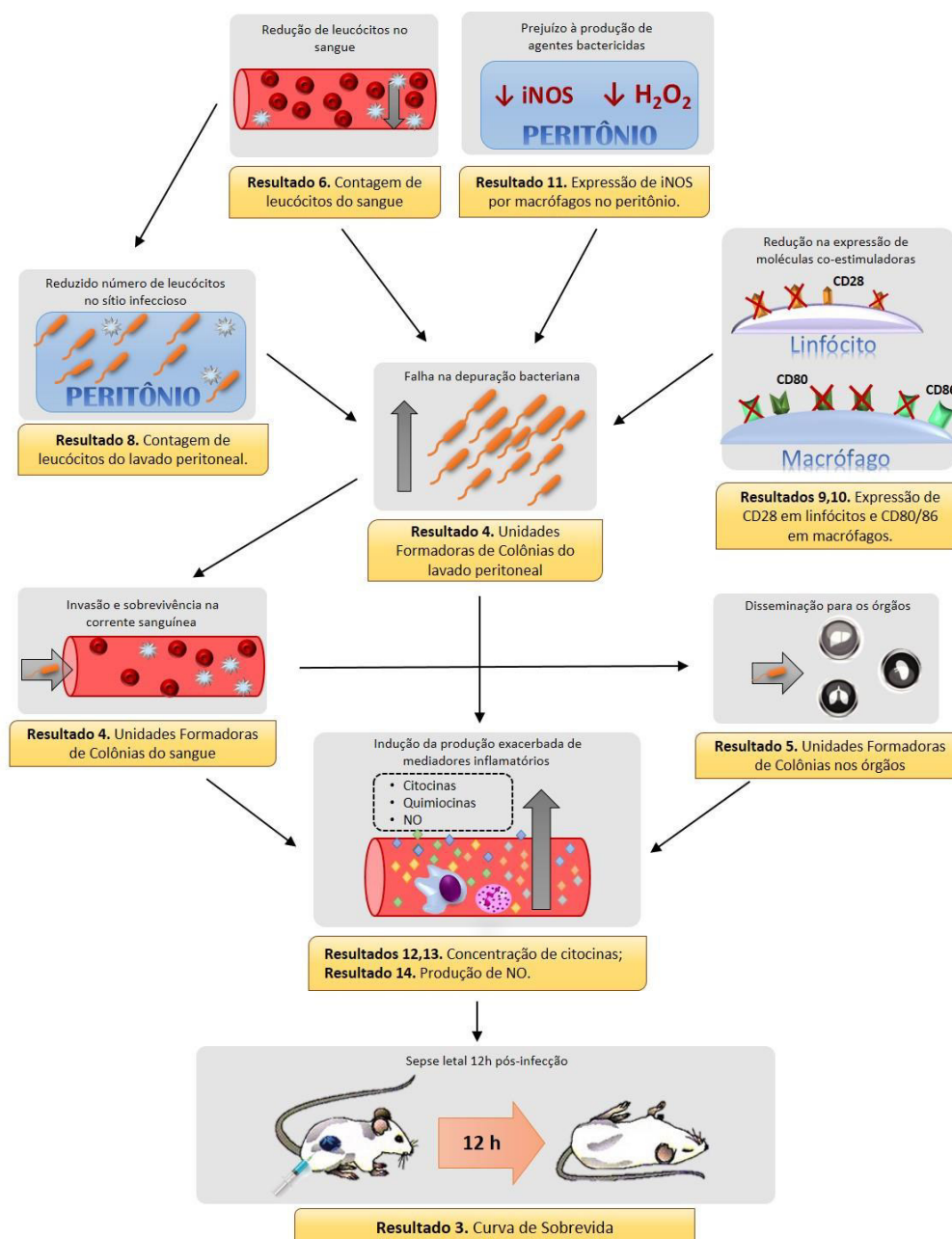


Figura 16. Síntese dos processos envolvidos na indução de sepse letal por bactérias produtoras de Pic. A serinoprotease Pic consiste em um importante fator de virulência de *Escherichia coli* F5, capaz de promover sepse letal em até 12 h pós-infecção. A letalidade da infecção por bactérias produtoras de Pic pode decorrer de distintos processos. Os reduzidos números de leucócitos na cavidade peritoneal e no sangue, o prejuízo na produção de agentes microbicidas no peritônio, e a redução na expressão de moléculas co-estimuladoras em linfócitos T CD4+ e macrófagos pode ter contribuído para o ineficiente controle bacteriano no sítio infeccioso inicial. A falha no controle da infecção no seu local de origem permitiu que uma maior quantidade de microrganismos pudesse invadir a corrente sanguínea e, uma vez que as bactérias produtoras de Pic permanecem viáveis na circulação devido à capacidade de clivar moléculas do sistema complemento, órgãos distantes do sítio infeccioso inicial puderam ser invadidos e colonizados por elas de modo acentuado. A disseminação do patógeno pelo corpo do hospedeiro amplificou a resposta imunológica, induzindo a exacerbada produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocina e NO, o que desregulou a homeostase do hospedeiro de maneira irreversível, levando-o a óbito.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos com este trabalho revelaram o potencial papel de Pic na indução de sepse, nos ajudando a entender alguns dos mecanismos envolvidos na patogênese dessas infecções, o que será de grande valia no manejo clínico/terapêutico de pacientes acometidos de infecções causadas por bactérias produtoras dessas serinoprotease. Porém, devido à complexidade e riqueza de interações entre diversos fatores, mais estudos estão em andamento no nosso grupo de pesquisa para que a resposta imune frente a uma infecção ocasionada por bactérias produtoras de Pic seja melhor compreendida.

6. CONCLUSÕES

- A serinoprotease Pic é um importante fator de virulência capaz de induzir sepse letal em até 12 h após infecção, em modelo de infecção por inoculação intraperitoneal de bactérias;
- A sobrevivência da bactéria na corrente sanguínea parece ser mediada pela produção de Pic, visto que o mutante Δpic foi incapaz de se manter viável na circulação;
- A manutenção da viabilidade de bactérias produtoras de Pic no sangue possibilitou que um maior número destas alcançasse os órgãos do hospedeiro, potencializando sua disseminação;
- Pic reduz a quantidade de leucócitos na cavidade peritoneal, assim como na corrente sanguínea;
- Pic induz uma intensa resposta inflamatória sistêmica, evidenciada pela alta produção de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, quimiocina e NO;
- A proteína Pic é capaz de comprometer a ativação de leucócitos por prejudicar a expressão de moléculas co-estimuladoras presentes na superfície destes, podendo comprometer também a produção de agentes antimicrobianos, como NO;
- Pic não induz danos histopatológicos nos órgãos (baço, fígado e rins) no tempo de 12 h, refletindo a ausência de uma atividade citopática sobre tais tecidos.

REFERÊNCIAS

ABREU AG, ABE CM, NUNES KO, MORAES CT, CHAVEZ-DUENAS L, NAVARRO-GARCIA F, BARBOSA AS, PIAZZA RM, ELIAS WP. The serine protease Pic as a virulence factor of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. Gut microbes, 7:115-125; 2016.

ABREU AG, BARBOSA A. How *Escherichia coli* Circumvent Complement-Mediated Killing. Front. Immunol, 8:452; 2017.

ABREU AG, FRAGA TR, MARTINEZ APG, KONDO MY, JULIAN M.A, JULIANO L, NAVARRO-GARCIA F, ISAAC L, BARBOSA AS, ELIAS WP. The serine protease Pic from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates immune evasion by the direct cleavage of complement proteins. J. Infect. Dis., 212:106-115; 2015.

AHMAD S, KHALID R. Blood Glucose Levels in Neonatal Sepsis and Probable Sepsis and its Association with Mortality. Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan 2012; 22(1):15-18.

ALI NA, O'BRIEN JM JR, DUNGAN K, PHILLIPS G, MARSH CB, LEMESHOW S, CONNORS AF JR, PREISER JC. Glucose variability and mortality in patients with sepsis. Crit Care Med 2008; 36:2316-2321.

ASSREUY J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets, 6(2):165-73; 2006.

BARRET AJ, RAWLINGS N, WOESSNER J. Handbook of proteolytic enzymes. London: Academic Press, 2003.

BOEHM U, KLAMP T, GROOT M, HOWARD JC. Cellular responses to interferon-gamma. Annual Review of Immunology, 15:749–795; 1997.

BONECCHI R, BIANCHI G, BORDIGNON ET AL PP. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. Journal of Experimental Medicine, 187(1):129–134; 1998.

BORDEN EC, CHIN P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 123(6):824–829; 1994.

CHALUPKA AN, TALMOR D. The Economics of sepsis. Crit Care Clin, 28:57-76; 2012.

CHAN JK, ROTH J, OPPENHEIM JJ, TRACEY KJ, VOGL T, FELDMANN M. Alarmins: awaiting a clinical response. J Clin Invest, 122:2711-9; 2012.

CHEN GY, NUÑEZ G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:826-37.

COHEN J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, 420(6917):885–891.

CONTE D, HOLCIK M, LEFEBVRE CA, et al. Inhibitor of apoptosis protein cIAP2 is essential for lipopolysaccharide-induced macrophage survival. *Molecular and Cellular Biology* 2006, 26(2):699–708.

CROXEN MA, LAW RJ, SCHOLZ R, KEENEY KM, WLODARSKA M, FINLAY BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 2013; 26:822– 880.

DAUTIN N. Serine protease autotransporters of enterobacteriaceae (SPATES): biogenesis and function. *Toxins* 2010; 2:1179-1206.

DAY KM, HAUB N, BETTS H, INWALD DP. Hyperglycemia is associated with morbidity in critically ill children with meningococcal sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2008; 9:636-640.

DE KRAKER MEA, JARLIER V, MONEN JCM, HEUER OE, VAN DE SANDE N, GRUNDMANN H. The changing epidemiology of bacteraemias in Europe: trends from the European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(9): 860-8.

DESHMANE SL, KREMLEV S, AMINI S, SAWAYA BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of interferon & cytokine research* 2009, 29(6):313-326.

DODSON G, WLODAWER A. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem.* 1998; 23:347–352.

DRAG M, SALVESEN GS. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2010, 9:690-701.

DUSSE LMS, VIEIRA LM, CARVALHO MG. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003, 39(4)343:350.

DUTTA PR, CAPPELLO R, NAVARRO-GARCIA F, NATARO JP. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun* 2002; 70(12):7105–13.

FORTIN CF, MCDONALD PP, FULOP T, LESUR O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *SHOCK* 2010; 33(4):344-352.

GOMES TAT, ELIAS WP, SCALETSKY ICA, GUTH BEC, RODRIGUES JF, PIAZZA RMF, FERREIRA LCS, MARTINEZ MB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Microbiology 2016; 47:3–30.

HARRINGTON SM, SHEIKH J, HENDERSON IR, RUIZ-PEREZ F, COHEN PS, NATARO JP. The Pic protease of enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. Infect. Immun. 2009; 77:2465-2473.

HATTORI Y, HATTORI K, SUZUKI T, MATSUDA N. Recent advances in the pathophysiology and molecular basis of sepsis-associated organ dysfunction: Novel therapeutic implications and challenges. Pharmacology & Therapeutics 2017; 177:56-66.

HEDSTROM L. Serine protease mechanism and specificity. Chem. Rev. 2002; 102:4501–4524.

HENDERSON IR, CZECHULIN J, ESLAVA C, NORIEGA F, NATARO JP. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1999; 67:5587-96.

HENDERSON IR, NAVARRO-GARCIA F, NATARO JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol. 1998; 6(9):370–8.

HERZOG K, ENGELER DUSEL J, HUGENTOBLE M, BEUTIN L, SÄGESSER G, STEPHAN R, HÄCHLER H, NÜESCH-INDERBINEN M. Diarrheagenic enteroaggregative *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. Infection 2014; 42:441-4.

HIRASAWA H, ODA S, NAKAMURA M. Blood glucose control in patients with severe sepsis and septic shock. World J Gastroenterol 2009; 15(33):4132-4136.

HSIEH CS, MACATONIA SE, TRIPP CS, WOLF SF, O'GARRA A, MURPHY KM. Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by listeria-induced macrophages. Science. 1993; 260(5107):547–549.

HUTTUNEN R, AITTONIEMI J. New concepts in the pathogenesis, diagnosis and treatment of bacteremia and sepsis. J Infect 2011; 63(6):407-419.

IUBMB; International Union of Biochemistry and Molecular Biology. EC3. Hydrolase Nomenclature - Enzyme nomenclature recommendations. University of London, 2007.

JIANG Y, BELLER DI, FRENDL G, GRAVES DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. J Immunol. 1992; 148(8):2423-8.

JOHNSON JR, RUSSO TA. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*”. J Lab Clin Med 2002; 139:155-62.

KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology 2004; 2(2):123–140.

KAWAI T, AKIRA S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol 2010; 11:373-84.

KOGA VL, TOMAZETTO G, CYOIA PS, NEVES MS, VIDOTTO MC, NAKAZATO G, KOBAYASHI RKT. Molecular screening of virulence genes in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from human blood culture in Brazil. BioMed Research International 2014; 1-9.

KROGH-MADSEN R, MOLLER K, DELA F, KRONBORG G, JAUFFRED S, PEDERSEN BK. Effect of hyperglycemia and hyperinsulinemia on the response of IL-6, TNF- α , and FFAs to low-dose endotoxemia in humans. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004; 286(5):E766-72.

KUSHNER I, RZEWNICKI DL. The acute phase response: general aspects. Bailliere’s Clinical Rheumatology 1994, 8(3): 513–530.

LATIFI SQ, O’RIORDAN MA, LEVINE AD. Interleukin-10 controls the onset of irreversible septic shock. Infection and Immunity 2002, 70(8):4441–4446.

LAUPLAND, K.B., GREGSON, D.B., CHURCH, D.L., ROSS, T., PITOUT, J.D. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14(11):1041–1047.

LERMAN YV, KIM M. Neutrophil Migration under normal and sepsis conditions. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2015 ; 15(1): 19–28.

LUPU F, KESHARI RS, LAMBRIS JD, COGGESHALL KM. Crosstalk between the coagulation and complement systems in sepsis. Thromb Res 2014, 133(01): S28–S31.

MADHAVI J, SRILAKSHMI J, RAGHAVENDRA-RAO MV, KRISHNA-SATYA K, SAMBASIVA-RAO KRS. Proteases – a single group of enzymes bridging industrial and therapeutic demands. Intern. J. Inst. Pharm. Life Science 2014, 4:1-27.

MAINIL J. *Escherichia coli* virulence factors. Veterinary Immunology and Immunopathology 2013; 152:2–12.

MALEFYT RDW, ABRAMS J, BENNETT B, FIGDOR CG, DE VRIES E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 1991, 174(5):1209–1220.

MARIK PE, RAGHAVAN M. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. *Intensive Care Med* 2004; 30:748-756.

MARKIEWSKI MM, DEANGELIS RA, LAMBRIS JD. Complexity of complement activation in sepsis. *J. Cell. Mol. Med.* 2008, 12(6A):2245-2254.

MAYR FB, YENDE S, ANGUS S. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 2014; 5:4–11.

MEDZHITOV R, JANEWAY JR C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000; 173:89-97.

MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature Medicine* 1997; 388:394-397.

MIAJLOVIC H, AOGA MM, COLLINS CJ, ROGERS TR, SMITH SGJ. Characterization of *Escherichia coli* bloodstream isolates associated with mortality. *Journal of Medical Microbiology* 2016; 65:71–79.

MIAJLOVIC H, SMITH SG. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiol Lett* 2014; 354:1–9.

MIQUELIN PRS, REIS GR. Comparação entre as taxas de morbimortalidade de pacientes com septicemia em todos os estados da federação e o Distrito Federal. *Amazônia Science & Health* 2016; 4:420-24.

MORA-RILLO M, FERNÁNDEZ-ROMERO N, NAVARRO-SANFRANCISCO C, DÍEZ-SEBASTIÁN J, ROMERO-GÓMEZ MP, FERNÁNDEZ FA, LÓPEZ JRA, MINGORANCE J. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence* 2015; 6(1):93-100.

MUNERA D, RITCHIE JM, HATZIOS SK, BRONSON R, FANG G, SCHADT EE, DAVIS BM, WALDOR MK. Autotransporters but not pAA are critical for rabbit colonization by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4. *Nat. Commun.* 2014; 5:3080.

NAKAE H, ENDO S, INADA K, TAKAKUWA T, KASAI T. Changes in adhesion molecule levels in sepsis. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology* 1996, 91(3):329–338.

NAVARRO-GARCIA F, GUTIERREZ-JIMENEZ J, GARCIA-TOVAR C, CASTRO LA, SALAZAR-GONZALEZ H, CORDOVA V. Pic, an autotransporter protein secreted by different pathogens in the Enterobacteriaceae family, is a potent mucus secretagogue. *Infect Immun* 2010; 78:4101-9.

NIELUBOWICZ GR, MOBLEY HL. Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 2010; 7:430-441.

PAGE MJ, Di CERA E. Evolution of peptidase diversity. *J. Biol. Chem.* 2008, 283:30010-14.

PALOMINO DC, MARTI LC. Quimiocinas e imunidade. *Einstein* 2015; 13(3):469-73.

PARAMESWARAN N, PATIAL S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression* 2010, 20(2):87–103.

PARHAM NJ, SRINIVASAN U, DESVAUX M, FOXMAN B, MARRS CF, HENDERSON IR. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 230:73-83.

POTEMPA J, PIKE RN. Corruption of Innate Immunity by Bacterial Proteases. *J Innate Immun* 2009, 1:70–87.

RAJAKUMAR K, SASAKAWA C, ADLER B. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the Immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect. Immun.* 1997; 65:4606-14.

RAWLINGS ND, BARRET AJ, BATEMAN A. Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. *J. Biol. Chem.* 2011, 286:38321-38328.

RAZ E, MAHABALESHWAR H. Chemokine signaling in embryonic cell migration: a fish-eye view. *Development.* 2009;136(8):1223-9. Review.

RUIZ-PEREZ F, NATARO JP. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014; 71:745-770.

RUIZ-PEREZ F, WAHID R, FAHERTY CS, KOLAPPASWAMY K, RODRIGUEZ L, SANTIAGO A, MURPHY E, CROSS A, SZTEIN MB, NATARO JP. Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108:12881-6.

RULIM ALL, RULIM MAB, ROLIM NETO ML, PITA P, BATISTA IL. Sepsis Epidemiology: Settings and Contexts. *International Archives of Medicine* 2017; 10(155).

RUSSO TA, JOHNSON JR. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* 2000;181:1753-4.

SCHELLER J, ROSE-JOHN S. Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical Microbiology and Immunology* 2006, 195(4):173–183.

SCHOUTEN M, WIERSINGA WJ, LEVI M, VANDERPOLL T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 2008, 83(3):536–545.

SCHUERHOLZ T, LEUWER M, COBAS-MEYER M, VANGEROW B, KUBE F, KIRSCHFINK M, MARX G. Terminal complement complex in septic shock with capillary leakage: marker of complement activation? *Eur J Anaesthesiol.* 2005, 22:541–7.

SCHULTE W, BERNHAGEN J, BUCALA R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation* 2013, 16 p.

SEYMOUR CW, LIU VX, IWASHYNA TJ, BRUNKHORST FM, REA TD, SCHERAG A, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):762-74. Erratum in: *JAMA* 2016; 315(20):2237.

SHANKAR-HARI M, PHILLIPS GS, LEVY ML, SEYMOUR CW, LIU VX, DEUTSCHMAN CS, ANGUS DC, RUBENFELD GD, SINGER M. Sepsis Definitions Task Force. Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):775-87.

SILASI-MANSAT R, ZHU H, POPESCU NI, PEER G, SFYROERA G, MAGOTTI P, IVANCIU L, LUPU C, MOLLNES TE, TAYLOR FB, KINASEWITZ G, LAMBRIS JD, LUPU F. Complement inhibition decreases the procoagulant response and confers organ protection in a baboon model of *Escherichia coli* sepsis. *Blood.* 2010, 116:1002–10.

SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, SHANKAR-HARI M, ANNANE D, BAUER M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016; 315(8):801-10.

STRIZ I, BRABCOVA E, KOLESAR L, SEKERKOVA A. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science* 2014; 126(9): 593-612.

TERSAIOL ILS, PIMENTA DC, CHAGAS JR, ALMEIDA PC. Proteinase activity regulation by glycosaminoclycans. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002, 35(20):135-144.

TRINCHIERI G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology* 2003, 3(2):133–146.

ULETT GC, TOTSIKA M, SCHAALE K, CAREY AJ, SWEET MJ, SCHEMBRI MA. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current Opinion in Microbiology* 2013; 16:100–107.

VAN COILLIE E, VAN DAMME J, OPDENAKKER G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine Growth Factor Rev* 1999, 10:61–86.

VAN CROMPHAUT SJ, VANHOREBEEK I, VAN DEN BERGHE G. Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. *Curr Pharm Des* 2008; 14:1887-1899.

VILA J, SÁEZ-LÓPEZ E, JOHNSON JR, RÖMLING U, DOBRINDT U, CANTÓN R, GISKE CG, NAAS T, CARATTOLI A, MARTÍNEZ-MEDINA M, BOSCH J, RETAMAR P, RODRÍGUEZ-BAÑO J, BAQUERO F, SOTO SM. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiol Rev.* 2016; 40(4):437-463.

VINCENT JL, ZHANG H, SZABO C, PREISER JC. Effects of nitric oxide in septic shock. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000, 161:17811-1785.

WIERSINGA WJ, LEOPOLD SJ, CRANENDONK DR, VAN DER POLL T. Host innate immune responses to sepsis, *Virulence* 2014; 5(1):36-44.

WISPLINGHOFF H, BISCHOFF T, TALLENT SM, SEIFERT H, WENZEL RP, EDMOND MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39:309-17.

WITSELL AL, SCHOOK LB. Tumor necrosis factor alpha is an autocrine growth regulator during macrophage differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89(10):4754–4758.

World Health Statistics 2016: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2016.

ANEXO I

13/01/2018

Frontiers | Preview

[About](#) | [Submit](#) | [Journals](#) | [Research Topics](#)
1 | [My frontiers](#)

Afonso G. Abreu


[Journal Info](#) | [Author Info](#) | [Abstract Info](#) | [Preview](#)

Manuscript Preview

Please preview your submission here. If corrections are necessary, please return to the previous screen. If all information is correct, you may "Submit".

The serinoprotease Pic secreted by *Escherichia coli* induces an intense immune response and death in a murine model of sepsis

Itaynara L. Dutra¹, Yago A. Lima¹, Johnny R. Nascimento¹, André A. Vale¹, Raissa G. Assunção², Patrícia C. Alves¹, Liana O. Trovão¹, Rosa M. Silva³, Waldir P. Elias⁴, Lucilene A. Silva¹, Márcia C. Maciel¹, Eduardo M. Sousa², Flavia R. Nascimento¹ and Afonso G. Abreu^{2, 1*}

¹ Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, Brazil

² Programa de Pós-Graduação, Universidade Ceuma, Brazil

³ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Brazil

⁴ Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, Brazil

Escherichia coli are important pathogens responsible for a variety of diseases and, albeit using distinct mechanisms of pathogenesis. Some of them have in common the production of Pic, a protein involved in colonization. We have recently shown that Pic mediates immune evasion by the direct cleavage of complement molecules, significantly reducing complement activation by all three pathways. The aim of this study was to analyze the action of Pic in a murine model of sepsis. Six to eight-week-old female Swiss mice were intraperitoneally inoculated with Pic-producing *E. coli* (F5) or F5Δpic mutant or apyrogenic water (control). *E. coli* F5 strain was isolated from patient with bacteremia admitted to a tertiary hospital in São Paulo city. Animal survival was monitored for 5 days (n= 6 animals/group) and a subset of mice (n= 6 animals/group) was euthanized after 12 h to analyze hematological parameters, glucose, production of IL-10, IL-12, IL-6, TNF-α, IFN-γ and MCP-1, hydrogen peroxide, nitric oxide (NO), as well as cells count and organ weight. To evaluate the colony forming units (CFU), blood, peritoneal lavage, spleen, liver and lung were cultivated on MacConkey agar for 18 hours. Peritoneal lavage and spleen were also collected in order to quantify cells and perform the immunophenotyping of T cells and antigen-presenting cells. In addition, histological analysis of kidney, spleen, lung, and liver were performed to evaluate the following parameters: vascular congestion, hemorrhage and cellular infiltration. The results showed that intraperitoneal inoculation of Pic-producing *E. coli* (F5) induced lethal sepsis in 100% of animals within 24 h, while in the group inoculated with F5Δpic there was no death. Only *E. coli* F5 was viable on blood, and CFU count of bacteria in the organs (spleen, liver and lung) was significantly higher in F5 than in the F5Δpic group. Hematological analysis showed a decrease of total leukocytes, lymphocytes and neutrophils, besides impairment of leukocytes migration to peritoneum in F5 group. In addition, the NO production on peritoneum, as well as, the activation of T cells and antigen-presenting cells were compromised in F5 group. Consequently, the pathogen dissemination induced an excessive activation of the immune response, as indicated by inflammatory mediators measurement. NO and cytokines (IFN-γ, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-10 and MCP-1) were detected in serum, as well as high levels of IL-6 and MCP-1 on peritoneal lavage of F5 group, significantly higher than in the other groups. Besides, histological analysis showed that *E. coli* F5 induced inflammation with cellular infiltration and hemorrhage on the organs. Therefore, these results evidenced that Pic represents an important virulence factor, allowing the survival of the bacterium on bloodstream and several organs, as well as inducing a high production of pro-inflammatory mediators by the host, leading to sepsis and death.

* Correspondence: PhD. Afonso G. Abreu, Programa de Pós-Graduação, Universidade Ceuma, R. Josué Montello 01, Jardim Renascença, São Luís, MARANHÃO, Brazil, abreu.ag@hotmail.com

☐ On behalf of every author of this article, I have read, understood and hereby accept the [Conditions for Authors](#). I warrant that I am expressly authorized to submit this article and to agree to these conditions on behalf of myself and of every author of this article.

Ativ
Acess

ANEXO II

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 14
PROJETO DE PESQUISA	Registro do CEUA: 14/15 Nº do Protocolo: 23115.006231/2015-20 Data de entrada no CEUA: 12/05/2015 Parecer: APROVADO

I – Identificação

Título do projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Shigella flexneri</i> PRODUTORAS DA SERINOPROTEASE PIC EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE		
Identificação da equipe executora: Coordenador: Prof. Dr. Afonso Gomes Abreu Júnior; Colaboradores: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento, Prof. Dr. Waldir Pereira Elias Júnior, Profa. Dra. Rosa Maria Silva, Fernanda Batista de Andrade		
Instituição onde será realizado: Universidade Federal do Maranhão		
Área temática:	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 20/05/2015
Cooperação estrangeira: Não		Data de devolução 25/08/2015

II – Objetivos:

Avaliar a resposta imunológica de camundongos submetidos à sepse induzida por *E. coli* e *S. flexneri* produtoras da serinoprotease Pic.

III – Sumário do projeto:

O projeto pretende aumentar o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade de bactérias bem disseminadas em nosso meio e responsáveis por diversas enfermidades, contribuindo, no futuro, para o desenvolvimento de inibidores proteicos, antibióticos e vacinas.

Serão utilizados camundongos das linhagens Swiss (6-8 semanas) e C57/Bl6 (8-12 semanas), fêmeas, divididas em 12 grupos (6 animais/grupo). Os animais serão inoculados com cepas selvagens e

mutantes das bactérias em questão, via subcutânea, além de grupos com sepse por CLP. Serão realizados experimentos de avaliação de sobrevivência (a cada 12 horas / 5 dias após indução da sepse). Após a eutanásia dos animais, serão obtidos o lavado peritoneal e lavado bronco alveolar (avaliação *in vitro* e *ex vivo* da função de macrófagos), o fígado, baço e linfonodo inguinal para contagem de células e avaliação da produção de citocinas, como TNF alfa. Serão obtidas amostras de sangue para avaliação da concentração de glicose e contagem de plaquetas, amostras de ceco para avaliação histológica.

IV – Comentário do relator frente à resolução Nº 779 - CONSEPE e complementares em particular sobre:

O projeto é conciso e segue as normas da resolução No 779 – CONSEPE. Os animais estarão sob condições controladas e não propositais de estresse. Os métodos anestésicos, cirúrgicos e de eutanásia estão de acordo com as normas da Universidade Federal do Maranhão e CONSEPE.

V – Pendências

Não apresenta pendências

VI – Recomendações:

Não apresenta recomendações

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

O projeto proverá uma importante base para caracterização da sepse, seus mecanismos imunopatológicos e os patógenos envolvidos obteve o parecer APROVADO por esta comissão.

São Luís, _____ 25 _____ / _____ Agosto _____ / _____ 2015 _____



Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva

Presidente da CEUA / UFMA