

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA POR
ANTICORPOS ANTI-EtpA LIGADOS A NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS**

HELBER ABELLINI ASTOLPHO

**Manaus-Amazonas
Abril/2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

HELBER ABELLINI ASTOLPHO

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA POR
ANTICORPOS ANTI-EtpA LIGADOS A NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: “biotecnologias para a saúde”.

Orientador: Patrícia Puccinelli Orlandi, Dra.

Co-Orientador: Luís André Morais Mariúba, Dr.

**Manaus-Amazonas
Abril/2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A856d Astolpho, Helber Abellini
DETECÇÃO DE Escherichia coli ENTEROTOXIGÊNICA POR
ANTICORPOS ANTI-EtpA LIGADOS A NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS / Helber Abellini Astolpho. 2017
108 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi
Orientador: Luís André Morais Mariúba
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Nanopartículas. 2. Escherichia coli. 3. etec. 4. EtpA. 5.
Anticorpos policlonais. I. Orlandi, Patrícia Puccinelli II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

HELBER ABELLINI ASTOLPHO

**DETECÇÃO DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA POR ANTICORPOS
ANTI-EtpA LIGADOS A NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: "Biotecnologias para a saúde".

DEFESA DA TESE EM: 17/04/2017

BANCA EXAMINADORA:

Titulares:

Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira
Instituto Leônidas e Maria Deane / Fundação Oswaldo Cruz – IMLD/FIOCRUZ

Dr. Adolfo José da Mota
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dra. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dr. Daniel Saito
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Dr. José Pereira de Moura Neto
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Aos meus pais Ronaldo e Arlete minhas grandes referências de vida, à minha linda esposa Anne Astolpho, ao meu filho Davi que tanto amo e ao meu filho ou filha que dentro de alguns meses irá nascer, vocês são tudo para mim!

Dedico

“Quando seu coração decide o destino, a sua mente desenha o mapa para alcançá-lo”.

Mike Murdock.

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço ao Eterno Deus que me sustenta, fortalece e me guia. Dono de todas as coisas, sabedoria e poder, obrigado pela fonte da vida. Meu amigo fiel, a ele minha eterna gratidão.

Aos meus pais Ronaldo e Arlete que com muita dedicação e amor me incentivaram e apoiaram em todos os momentos da minha vida. Muito obrigado por nunca medirem esforços para me proporcionar uma excelente educação, amor e orientação. Sou um eterno devedor a Deus por ele ter me colocado sob a influência de vocês. Pai e mãe, vocês são meus exemplos de vida. Palavras me faltam para expressar a gratidão e o amor que tenho por vocês.

À minha linda esposa Anne Astolpho. Uma das maiores dádivas de Deus em minha vida. Te agradeço por estar ao meu lado lutando junto pelos nossos sonhos, te agradeço por me impulsionar, por ser a mãe dos meus filhos, e por completar minhas alegrias, você é a paixão de toda a minha vida!

À minha irmã Rebeca, você é muito importante para mim. Obrigado por sua amizade, pelos seus conselhos e pelas inúmeras risadas e momentos de alegrias. Te agradeço por sempre torcer e vibrar com cada uma das nossas conquistas.

À minha orientadora Professora Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi, muito obrigado pelas ideias, sugestões e pela confiança depositada. Te agradeço muito por ter me proporcionado essa extraordinária oportunidade de trilhar caminhos valiosos dentro da ciência. Espero continuar a contribuir com o grupo DCDIA e manter a parceria para os avanços e conquistas da pesquisa local e nacional.

Ao meu co-orientador e amigo Dr. Luis André Morais Mariúba, muito obrigado pelos inúmeros ensinamentos, dicas de bancada, pela paciência e incentivo. Sua ajuda, conselhos e momentos de auxílio no laboratório e no NIT foram fundamentais para concluir esse trabalho. Lhe admiro como pessoa e como profissional.

Aos professores Dr. Paulo Nogueira e Me. Yury Chaves muito obrigado pelos ensinamentos e momentos de auxílio com os experimentos de citometria no laboratório, a ajuda de vocês foi essencial para a conclusão deste trabalho.

Ao grupo DCDIA e ao pessoal do NIT, pessoas que foram extremamente importantes neste período e que proporcionaram muitos momentos de descontração, alegrias, histórias e grande auxílio na bancada do laboratório. Agradeço cada um de vocês por fazerem parte desse período tão especial da minha

vida. Muito obrigado: Edilene Martins, Paula Takita, Diogo Castro, Juliane Corrêa, Lucas Barbosa, Alessandra, Jean, Walter, Dani, Késsia, Natália, Felipe, Vani e Fernanda.

A toda minha família, em especial ao meu querido vô Demélio, vó Anna e vó Irma. Obrigado pelas orações e palavras de ânimo quando foi preciso.

Agradeço a FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelo apoio institucional e pela estrutura acadêmica e ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ) por toda estrutura física e suporte técnico laboratorial.

Resumo

As doenças diarreicas totalizam a segunda principal causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade, perdendo apenas para a pneumonia. A cada ano a diarreia mata cerca de 760.000 crianças nessa faixa etária. A linhagem de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é considerada como um dos agentes causadores mais frequentes da diarreia infantil e da diarreia dos viajantes nos países de baixa e média renda. Dentre os fatores de virulência secretados por ETEC, a exoproteína EtpA foi descrita como uma importante proteína que se interage com as regiões altamente conservadas do flagelo bacteriano. Essas interações são críticas para a adesão, colonização e entrega das toxinas nos enterócitos por ETEC. Foi desenvolvido no presente trabalho uma nova ferramenta de detecção para a bactéria *E. coli* enterotoxigênica. Inicialmente foi determinado a melhor sequência antigênica da proteína quimérica EtpA por ensaios de predição *in silico*. Após a construção do antígeno recombinante, avaliamos a produção de anticorpos policlonais anti-EtpA em camundongos que foram estimulados com esse antígeno. O mapeamento de epítopos utilizando peptídeos sintéticos demonstrou que apenas o peptídeo 1.1 foi reativo ao *pool* de soros dos animais imunizados. O reconhecimento específico dos anticorpos anti-EtpA foram avaliados por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que o anticorpo desenvolvido foi capaz de reconhecer a proteína EtpA nativa. A avaliação da especificidade dos anticorpos anti-EtpA contra diferentes cepas de *E. coli* diarreiogênicas demonstrou a maior porcentagem e especificidade para um isolado de ETEC (7.2%). Em seguida, os anticorpos foram acoplados em *beads* magnéticas para a captura e detecção de isolados de ETEC. Os resultados por citometria evidenciaram alta sensibilidade, especificidade e a eficácia do método de separação e detecção desses patógenos por *beads* magnéticas ligadas aos anticorpos anti-EtpA.

Palavras-chave: Nanopartículas; *Escherichia coli*; ETEC; EtpA; anticorpos policlonais; beads magnéticas.

Abstract

Diarrheal diseases account for the second leading cause of death in children under five years of age, below only pneumonia, killing about 760,000 children per year. The enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) lineage is considered to be one of the most frequent causative agents of childhood diarrhea and travelers' diarrhea in low and middle-income countries. Among the virulence factors secreted by ETEC, the exoprotein EtpA has been described as an important protein that interacts with the highly conserved regions of the bacterial flagellum. These interactions are critical for adhesion, colonization, and delivery of toxins to enterocytes by ETEC. A new detection tool for enterotoxigenic *E. coli* bacteria was developed in the present work. Initially, the best antigenic sequence of the chimeric EtpA protein was determined by in silico prediction assays. After the construction of the recombinant antigen, we evaluated the production of anti-EtpA polyclonal antibodies in mice that were stimulated with this antigen. The mapping of epitopes using synthetic peptides demonstrated that only the 1.1 peptide was reactive to the pool of sera from the immunized animals. Specific recognition of anti-EtpA antibodies were assessed by flow cytometry. The results showed that the developed antibody was able to recognize the native EtpA protein. The evaluation of the specificity of anti-EtpA antibodies against different strains of diarrheogenic *E. coli* demonstrated the highest percentage and specificity for the ETEC strain (7.2%). The antibodies were then coupled into magnetic beads for the capture and detection of ETEC isolates. The results by cytometry showed high sensitivity, specificity and the efficacy of the method of separation and detection of these pathogens by magnetic beads bound to anti-EtpA antibodies.

Keywords: Nanoparticles; *Escherichia coli*; ETEC; EtpA; Polyclonal antibodies; Magnetic beads.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Destruição das microvilosidades (MV) e formação do pedestal nos enterócitos provocados por EPEC. Fonte: Chen e Frankel, 2005.	15
Figura 2. Sistema de secreção do tipo III de EPEC. Complexo de proteínas efetoras (EspA/EspB/D/ e Tir) utilizadas para a invasão das células hospedeiras. Fonte: (CHEN E FRANKEL, 2005).	17
Figura 3. Estágios da invasão de EIEC/ <i>Shigella</i> e propagação basolateral pelas células epiteliais. Fonte: Adaptado de MAURELLI, 2013.	21
Figura 4. Fatores de colonização produzidos por ETEC (fímbrias/pili). A) Fator de colonização linear CFA/III produzidos por ETEC (fímbrias de 5-7 nm de diâmetro). B) Fator de colonização CFA/I. Fímbrias abundantes e longas medindo aproximadamente 5 a 7 nm. Fonte: Adaptado de Kaper, 2004.	27
Figura 5. Mecanismos de ancoragem e patogênese de ETEC. Fonte: Adaptado de CROXEN e FINLAN, 2010.	28
Figura 6. A) ETEC fazendo a ancoragem nas células hospedeiras através das pontas dos flagelos. B e C) EtpA se concentra nas pontas dos flagelos se interagindo com regiões altamente conservadas de flagelina. Fonte: Adaptado de Roy e colaboradores, 2009.	30
Figura 7. Mapa e sequencia de pontos de referência do vetor pGEM®-T Easy (Promega) utilizado para clonagem do gene EtpA.	37
Figura 8. Mapa do vetor de expressão pRSET A,B,C. Este vetor foi utilizado para a expressão da proteína recombinante EtpA de ETEC.	40
Figura 9. Modelagem tridimensional da proteína nativa EtpA para análises e desenho da quimera (I-Tasser).	56
Figura 10. Análise dos produtos da PCR das amostras 1; 2; 3; 4; 5 que foram amplificadas no vetor pGEM T-EtpA. M - Marcador de massa molecular de 500 pb (Ludwigbiotec).	56
Figura 11. 1) Análise do perfil de restrição do plasmídeo recombinante com as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i> . 2) Vetor não digerido. M - Marcador de massa molecular 1 Kb (Ludwigbiotec).	57
Figura 12. Perfil eletroforético do gene EtpA purificado. M - marcador de massa molecular 1 Kb (Ludwigbiotec).	58

Figura 13. Perfil de Análise de restrição do cassete de expressão pRSET-Etpa. Amostras 2 e 5 confirmando a correta construção do vetor com o tamanho das bandas esperadas. M - Marcador de massa molecular 1Kb (Ludwigbiotec).	59
Figura 14. Immunoblot contra a cauda de histidina para a detecção da proteína EtpA expressa em <i>E. coli</i> BL21. M - Marcador de massa molecular preparado com diferentes proteínas (caseiro).	60
Figura 15. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE da proteína recombinante EtpA expressa pelos clones 2 e 5. Lavagens e primeiras eluições com diferentes concentrações de Imidazol. Setas indicam as bandas correspondentes à proteína expressa. M – Marcador de massa molecular (Color Plus Biolabs: 10-230 kDa).	62
Figura 16. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das eluições da proteína EtpA purificada em coluna Ni-NTA-Agarose. M – Marcador de massa molecular (Color Plus Biolabs: 10-230 kDa).	62
Figura 17. Perfil Eletroforético da excisão da cauda de histidina pela ação da enzima enterokinase. Seta mostrando as bandas proteicas com e sem cauda respectivamente. M – Marcador de massa molecular (Color Plus Biolabs: 10-230 kDa).	63
Figura 18. Gráfico representando os resultados do primeiro teste de ELISA indireto para os anticorpos policlonais produzidos contra a proteína EtpA. C1 à C4: animais imunizados com EtpA purificada. CADJ -: animal imunizado apenas com adjuvante.	64
Figura 19. Dot blot com peptídeos sintetizados a partir da sequência quimérica de EtpA. Circulo amarelo destaca a revelação do peptídeo número 1.1 do epítipo 1 contra o <i>pool</i> de soros dos camundongos imunizados. O quadro verde representa os controles positivos de 2 lisados bacterianos, e o dot apontado pela flecha representa a proteína EtpA-Recombinante.	65
Figura 20. Perfil das regiões imunogênicas da proteína recombinante EtpA. Análise predita no programa BepiPred 1.0 Server.	65
Figura 21. Análise do reconhecimento de EtpA por citometria de fluxo em amostras ETEC positiva confirmadas por PCR. (A) População das bactérias analisadas; (B) Controle negativo: bactérias sem marcação. (C) Controle secundário: Bactéria + Anti-IgG mouse Alexa flúor 488; (D) Bactéria + Anti-EtpA + Anti-IgG mouse Alexa flúor 488 (2°).	67

Figura 22. Avaliação da especificidade de anticorpos anti-EtpA contra diferentes cepas de <i>E. coli</i> diarreio gênicas. Foram analisados por citometria de fluxo, a porcentagem de bactérias reconhecidas por anticorpos anti-EtPA. EHEC (0.5%); EAEC (0,7%); EIEC (1,2%); EPEC (0.5%); DAEC (0,8%) e ETEC (7.2%).....	70
Figura 23. Diferentes isolados de ETEC evidenciando porcentagens variadas da proteína alvo EtpA.....	71
Figura 24. Avaliação da marcação de bactérias por brometo de etídeo. (A) Bactérias sem marcação; (B) Bactérias marcadas com EtBr (FL3- Percp).....	73
Figura 25. Avaliação do acoplamento dos anticorpos anti-EtpA em <i>beads</i> magnéticas. (A) <i>Beads</i> magnéticas não acopladas. (B) <i>beads</i> acopladas ao anti-EtpA e reconhecidas pelo anticorpo anti-IgG mouse Alexa flúor 488.....	74
Figura 26. Avaliação da captura dos isolados 144 e 178 de ETEC-EtpA por citometria de fluxo utilizando <i>beads</i> associadas ao anticorpo Anti-EtpA.....	75
Figura 27. Esquema de captura da proteína EtpA de ETEC por <i>beads</i> magnéticas acopladas ao anticorpo Anti-EtpA.....	75
Figura 28. Porcentagem de captura de bactérias diarreio gênicas por <i>beads</i> acopladas ao anticorpo Anti-EtpA.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

dATP	2' desoxirriboadenosina trifosfato
A/E	<i>Attaching and effacing</i> (aderência e achatamento)
aEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica atípica
<i>aggR</i>	<i>Aggregative regulator</i> (regulador de aderência agregativa)
AMP	Adenosina monofosfato
BFP	<i>Bundle-forming pilus</i> (<i>pilus</i> formador de feixe)
DAEC	<i>E. coli</i> de aderência difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
<i>eae</i>	<i>EPEC attaching and effacing</i> (EPEC-aderência e achatamento)
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasora
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EspA	<i>EPEC secreted proteins</i> (Proteína secretada pela EPEC)
EspA	<i>EPEC secreted proteins</i> (Proteína secretada pela EPEC)
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
IL-8	Interleucina 8
kb	Quilobases
KDa	Kilo-Dalton
LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
LT	Enteroxina termolábil
mL	Mililitros
pAA	<i>Plasmid-aggregative adherence</i> (plasmídeo de aderência agregativa)
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHU	Síndrome hemolítica urêmica
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina de Shiga
Stx	Toxina de shiga
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
tEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica típica
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i> (receptor de intimina translocado)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTSS	<i>Type Three Secretion System</i> (Sistema de Secreção do Tipo III)
UV	Ultravioleta
µL	Microlitro

SUMÁRIO

Agradecimentos	vii
Resumo	ix
Abstract	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DA LITERATURA	10
2.1 Aspectos etiológicos e clínicos da doença diarreica	10
2.2 <i>Escherichia coli</i> - Características gerais	13
2.3 Patótipos de <i>Escherichia coli</i> diarreiogênica (DEC)	14
2.3.1 <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	14
2.3.2 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	18
2.3.3 <i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC).....	20
2.3.4 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	22
2.3.5 <i>E. coli</i> de aderência difusa (DAEC).....	24
2.3.6 <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	25
2.4 O fator de adesão EtpA.....	29
2.5 Diagnóstico para detecção de <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	31
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo Geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 Fluxograma das atividades desenvolvidas.....	35
4.2 Desenho da sequência de EtpA e análises genéticas <i>in silico</i>	36
4.3 Linhagens de micro-organismos utilizados	36
4.4 Meios de cultivo para bactérias.....	36
4.5 Estratégias de Clonagem.....	37
4.5.1 Confirmação da construção do vetor de clonagem por PCR e análise de restrição.....	38
4.6 Construção do vetor de expressão pRSET- EtpA.....	40
4.6.1 Subclonagem do gene EtpA no vetor de expressão pRSET-A.....	41
4.7 Confirmação da construção do vetor de expressão pRSET-EtpA.....	41
4.8 Preparo de células eletrocompetentes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS™	42

4.9	Transformação de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS™ por eletroporação e expressão proteica	43
4.10	Purificação da proteína recombinante EtpA	44
4.11	Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE e Imunoblot.....	44
4.12	Excisão da cauda de histidina.....	45
4.13	Imunização dos camundongos contra a proteína EtpA recombinante	46
4.14	Confirmação da produção de anti-EtpA por ELISA “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays”	47
4.15	Purificação e quantificação dos anticorpos anti-EtpA obtidos após as imunizações em Balb/C	47
4.16	Dot Blot com peptídeos sintéticos da proteína recombinante EtpA.....	48
4.17	Imunofenotipagem de bactérias por citometria de fluxo	49
4.17.1	Teste de padronização dos anticorpos anti-EtpA para reconhecimento de bactérias ETEC.....	49
4.17.2	- Padronização do experimento de especificidade dos anticorpos anti-EtpA contra isolados de <i>E. coli</i> diarreio gênicas.	50
4.17.3	Avaliação da detecção da proteína EtpA entre diferentes isolados de ETEC por citometria de fluxo.	50
4.18	Acoplamento dos anticorpos anti-EtpA às nanopartículas magnéticas (Beads).	52
4.19	Ensaio de separação imunomagnético por <i>Beads</i> associadas ao anticorpo Anti-EtpA.....	53
4.19.1	Padronização da marcação do material genético das bactérias ETEC com o corante Brometo de Etídeo para detecção em citometria de fluxo.	53
4.19.2	Detecção de bactérias ETEC por <i>Beads</i> magnéticas associadas ao anticorpo Anti-EtpA.....	53
4.20	Análises de citometria e confecção dos gráficos.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Análises <i>in silico</i> de EtpA	55
5.2	Análise da construção do vetor de clonagem por PCR e digestão enzimática	56
5.3	Análise da construção do vetor de expressão pRSET-EtpA	58
5.4	Confirmação da expressão proteica por imunoblot.....	59
5.5	Expressão de pRSET-EtpA em BL21 e purificação proteica.....	60
5.6	Análise da excisão da cauda de histidina	62
5.7	ELISA indireto com os anticorpos policlonais produzidos	64
5.8	Mapeamento de epítomos da proteína quimérica EtpA	65

5.9	Imunofenotipagem de bactérias por citometria de fluxo	66
5.9.1	Análise do Reconhecimento de EtpA por citometria de fluxo	67
5.9.2	Teste de especificidade dos anticorpos anti-EtpA contra isolados de <i>E. coli</i> diarréiogênicas.	69
5.9.3	Avaliação da detecção da proteína EtpA em diferentes isolados de ETEC por citometria de fluxo.....	71
5.10	Ensaio de separação imunomagnético por <i>Beads</i> associadas ao anticorpo Anti-EtpA.....	73
5.10.1	Marcação do material genético das bactérias ETEC com o corante Brometo de Etídeo para detecção em citometria de fluxo.	73
5.10.2	Detecção dos anticorpos anti-EtpA acoplados em <i>beads</i> magnéticas (Bioclone).....	74
5.10.3	Detecção de bactérias ETEC por <i>Beads</i> magnéticas	74
5.10.4	Teste de especificidade e captura com diferentes isolados de <i>E. coli</i> diarréiogênicas.	76
6	CONCLUSÃO.....	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
	ANEXO-A	96
	ANEXO – B	97
	ANEXO C - SOLICITAÇÃO DE ESTUDO DE VIABILIDADE PATENTÁRIA.....	99

1 INTRODUÇÃO

A diarreia é uma doença classificada como uma importante causa de morbidade e mortalidade observada em diversas regiões do mundo. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2013), as doenças diarreicas totalizam a segunda principal causa de morte em crianças menores de cinco anos de idade, perdendo apenas para a pneumonia. A cada ano a diarreia mata cerca de 760.000 crianças nessa faixa etária. No mundo, há cerca de 1,7 bilhão de casos de doença diarreica registrados todos os anos (WHO, 2013; KUMAR et al., 2016). Existem diversas condições que podem favorecer a disseminação dessa doença. As principais vias de veiculação dos agentes causais da diarreia são a água e os alimentos contaminados. Também podem contribuir com o aumento da incidência da doença, as precárias condições de higiene doméstica e pessoal, ausência de tratamento adequado do lixo e dejetos, fornecimento inadequado de água, difícil acesso à rede de saúde pela população socialmente menos favorecida, baixo nível educacional, interrupção da amamentação de recém-nascidos e pescados provenientes de águas poluídas (GUERRANT et al., 2002; WALKER et al., 2010; WHO, 2013). Outro fator relevante são os impactos diretos na economia e sociedade, gerando custos com hospitalizações, serviços médicos e ambulatoriais, medicamentos e perdas de dias de trabalho ou escola dos pacientes com diarreia (VRANJAC, 2004).

No Brasil as populações carentes e principalmente residentes das regiões menos desenvolvidas do país, apresentam características semelhantes da doença em relação a outros países de baixa e média renda. Já em crianças pertencentes a famílias de condições socioeconômicas elevadas, tanto a etiologia quanto o curso clínico da doença são semelhantes ao descrito em países desenvolvidos. Estudos prospectivos têm mostrado que, onde as condições higiênicas em que vivem as populações são desfavoráveis, a incidência de diarreia aguda é alta em crianças. (GUERRANT et al., 2002; ORLANDI et al., 2001; ZAMBONI et al., 2004).

A diarreia pode ser definida quando ocorre a passagem de três ou mais fezes moles ou líquidas por dia. Isso ocorre devido a alterações nos mecanismos de secreção, osmose ou processos inflamatórios e de infecção das células intestinais (WHO, 2013; CANANI et al., 2015). Existem também as doenças diarreicas classificadas como congênitas, estas se caracterizam por enteropatias raras

apresentando uma etiologia heterogênea, com um início precoce dos sintomas típicos (PEZZELLA et al., 2013; CANANI et al., 2015).

A lista de enteropatógenos que causam diarreia é extensa e inclui bactérias, parasitas e vírus. Entre os agentes patogênicos bacterianos, *Escherichia coli* estabelece um importante papel como agente causador, sendo diagnosticada em mais de 49% dos pacientes hospitalizados por diarreia em países em desenvolvimento (TANIUCHI et al., 2012; WALKER et al., 2010).

Escherichia coli é uma bactéria anaeróbia facultativa não patogênica, pertencente a família Enterobacteriaceae que predomina o trato gastrointestinal humano, estabelecendo sua colonização nas primeiras horas de vida. Geralmente essas bactérias permanecem confinadas ao lúmen intestinal sem oferecer riscos ao hospedeiro, no entanto, em hospedeiros debilitados ou imunossuprimidos, ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas, algumas cepas de *E. coli* desenvolvem a capacidade de provocar doenças gastrointestinais, do trato urinário e do sistema nervoso central (NGUYEN et al., 2005; NATARO e KAPER, 1998).

As cepas de *E. coli* diarreiogênicas podem ser divididas em seis categorias principais com base em distintas características epidemiológicas e clínicas, determinantes de virulência específicos que afetam uma ampla variedade de processos celulares e associação com certos sorotipos. As categorias são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER et al., 2004; NGUYEN et al., 2005; TANIUCHI et al., 2012).

A linhagem de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é considerada como um dos agentes causadores mais frequentes da diarreia infantil e da diarreia dos viajantes nos países de baixa e média renda. Essa cepa resulta aproximadamente 400 milhões de casos de diarreia e quase 400.000 mortes por ano em crianças com idade inferior a cinco anos (MENTZER et al., 2014). Não existem métodos apropriados para a identificação de ETEC nos países em desenvolvimento. Por essa razão, muitos laboratórios que conduzem estudos sobre diarreia nesses países, não incluem ETEC em suas capacidades de diagnóstico de rotina. Novas técnicas para a detecção de ETEC são de grande relevância, pois direcionam as investigações epidemiológicas, previne os procedimentos invasivos desnecessários e também

servem como ferramenta para monitorar os pacientes infectados para o tratamento imediato (KARCH et al., 1999; QADRI et al., 2005).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos etiológicos e clínicos da doença diarreica

A diarreia é uma síndrome cuja manifestação predominante é o aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência. Geralmente, é acompanhada de vômito, febre e dor abdominal (BRASIL, 2010). Essa doença é dividida em três tipos clínicos: A diarreia aguda aquosa que persiste por várias horas ou dias; a diarreia aguda sanguinolenta também classificada como disenteria e a diarreia persistente que pode durar 14 dias ou mais (WHO, 2013).

As principais manifestações clínicas da doença consistem na desidratação e perda de eletrólitos (sódio, cloreto, potássio e bicarbonato), que são eliminados juntamente nos líquidos das fezes, vômito, suor e urina. A desidratação ocorre quando essas perdas não são reconstituídas (WHO, 2013). Esse mecanismo de secreção pode ser provocado por toxinas ou pela colonização e multiplicação dos agentes etiológicos na parede intestinal, levando à lesão epitelial e, até mesmo, à bacteremia ou septicemia (MORRIS et al., 1994; BRASIL, 2010). A desidratação é classificada em inicial, moderada e grave. Na desidratação inicial não existem sinais ou sintomas. Na moderada os sintomas são sede, comportamento agitado ou irritável, diminuição da elasticidade da pele e olhos encovados. A desidratação grave consiste em choque, consciência diminuída, falta de produção de urina, extremidades úmidas, pulso rápido e fraco, pressão arterial baixa ou indetectável, e pele pálida (WHO, 2013).

Os distúrbios diarreicos congênitos (diarreia crônica) são enteropatias que podem ser divididas em duas principais categorias: diarreia secretora (DS) e diarreia osmótica (DO); no entanto, em vários casos, ambos os mecanismos podem estar envolvidos. Esse tipo de doença tem como característica a persistência de fezes moles (geralmente com um aumento na frequência de evacuações) durante pelo menos 14 dias. Esses distúrbios geralmente são doenças hereditárias monogênicas de forma autossômica recessiva. A diarreia secretora é caracterizada por um aumento do fluxo de eletrólitos e água em direção ao lúmen intestinal e a osmótica é

provocada pela presença de nutrientes não absorvidos no intestino, levando o fluido para dentro do lúmen por meio de forças osmóticas (PEZZELLA et al., 2013; CANANI et al., 2015). As formas raras e com sinais clínicos leves da diarreia crônica podem permanecer sem diagnóstico até a idade adulta. Os pacientes podem ao longo do tempo desenvolver complicações irreversíveis, como disfunção renal e gota como consequência de uma contração crônica do espaço intravascular (ABOU ZIKI e VERJEE, 2015).

As principais medidas de tratamento da diarreia incluem a reposição de líquidos e eletrólitos, suplementação com zinco e a utilização de agentes antimicrobianos e drogas antidiarreicas. A administração precoce da solução de reidratação oral (ORS - *oral rehydration salts*) é aconselhável para evitar a desidratação provocada pela diarreia (AVERY et al., 1990; KELLY, 2015). ORS é uma solução de reidratação oral que foi originalmente desenvolvida no início de 1970 para corrigir a desidratação substancial que ocorre como resultado da diarreia grave e diarreia infecciosa aguda. Essa solução é basicamente composta de glicose, **cloreto de sódio, citrato de sódio e cloreto de potássio** que quando absorvida no intestino repõe a água e os eletrólitos perdidos durante a diarreia (AVERY et al., 1990; WHO, 2013; BINDER et al., 2014).

A deficiência de zinco é uma condição comum entre as crianças de países em desenvolvimento. Essa deficiência está relacionada com o aumento das infecções gastrointestinais, efeitos adversos sobre a estrutura e função do trato gastrointestinal, e comprometimento da função imunológica (BUTTA et al., 1999; PATEL et al., 2005; KHAN e SELLEN, 2011). Estudos demonstraram que a suplementação de zinco (20 mg por dia para crianças com mais de seis meses ou 10 mg por dia para crianças menores de seis meses, durante 10 a 14 dias) reduz significativamente a gravidade e duração da diarreia (WHO, 2004; WHO, 2006; KHAN e SELLEN, 2011).

Existe também uma variedade de drogas antidiarreicas que atuam no interior do lúmen intestinal que são utilizadas para o tratamento das diarreias crônica e aguda. Esses agentes incluem mecanismos de ativação dos receptores periféricos dos opióides (agentes naturais, sintéticos e semi-sintéticos), redução das concentrações de ácidos biliares no cólon, alteração da microbiota e função da barreira intestinal (MENEES et al., 2012). Entretanto, o uso frequente dessas drogas

não são recomendadas para crianças, pois podem ocorrer riscos de eventos adversos, efeitos tóxicos e desenvolvimento de bactérias resistentes. A utilização dos antimicrobianos só é recomendada para crianças com diarreia sanguinolenta (provável Shigellose), cólera com desidratação grave, e infecções não intestinais graves, como pneumonia. Os medicamentos anti-protozoários raramente são indicados (HAAK e CLAESON, 1996; WHO, 2005; CLEMENTS et al., 2012).

A principal via de transmissão dos patógenos causadores da diarreia aguda ocorre pela via fecal-oral. Isso pode ocorrer por meio da ingestão de água e/ou alimentos contaminados ou por contato direto de pessoa a pessoa. A infecção é mais comum quando coexiste falta de saneamento adequado, higiene e água potável para beber, cozinhar ou limpar (WHO, 2013; KELLY, 2015). Dessa forma, a prevenção da doença diarreica está diretamente relacionada com a utilização de água potável e alimentos seguros. Outros fatores também têm um impacto preventivo direto sobre a incidência da doença, dentre eles, destaca-se a amamentação exclusiva com leite materno durante os 6 primeiros meses de vida, lavagem das mãos, uso de latrinas, eliminação segura de fezes e vacinação contra alguns patógenos (DUPONT, 2005; XU et al., 2015).

Os agentes etiológicos que estão relacionados com a diarreia infecciosa mais aguda estão distribuídos entre bactérias, parasitas e vírus. Os principais agentes bacterianos incluem: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Bacteroides fragilis* e *Arcobacter* spp. Os parasitas mais comuns são dos gêneros: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Isospora*, *Cyclospora*, *Entamoeba* e *Balantidium* (O'RYAN et al., 2005; MCGREGOR et al., 2012; KELLY, 2015). A diarreia aguda de origem viral pode ser causada pelos Norovírus, Calicivirus, Adenovírus, Astrovírus e Rotavírus (COLUCHI, 2002; KANG, 2008).

Entre os agentes etiológicos bacterianos, as cepas de *Escherichia coli* classificadas como diarreiogênicas afetam anualmente milhões de pessoas em todo mundo. As diferentes cepas de *E. coli* podem causar diversas doenças intestinais e extra-intestinais por meio de fatores de virulência que afetam uma ampla variedade de processos celulares. Essas bactérias são versáteis e frequentemente se tornam fatais. As consequências dessas infecções são observadas de forma individual, familiar, comunitário e nacional em diversos países em desenvolvimento (KAPER et al., 2004; CROXEN e FINLAY, 2010; WALKER, 2010).

2.2 *Escherichia coli* - Características gerais

A bactéria *Escherichia coli* foi descrita inicialmente como *Bacterium coli commune* pelo médico alemão Theodor Escherich em 1885 (CHAUDHURI e HENDERSON, 2012). *Escherichia coli* é classificada como um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo e membro da microbiota intestinal normal do ser humano e de outros mamíferos (ELSAS et al., 2011). Em laboratórios de biologia molecular de todo o mundo, *E. coli* é um modelo clássico explorado na Tecnologia do DNA recombinante (KAPER et al., 2004). No entanto, existem vários clones de *E. coli* altamente adaptados que possuem a capacidade de adquirir atributos de virulência específicos. Estes atributos conferem maior capacidade de adaptação a novos habitats e permitem causar um largo espectro de doenças. Os fatores de virulência são frequentemente codificados em elementos genéticos que podem ser mobilizados em diferentes linhagens para criar novas combinações de fatores de virulência (CASSELS e WOLF, 1995; KAPER et al., 2004; SWEENEY et al., 1996).

A transição de algumas cepas comensais de *E. coli* em agentes patogênicos podem ocorrer por meio de transferência horizontal de genes ou aquisição de ilhas de patogenicidade. Estes eventos de transferência ocorrem independentemente uns dos outros com diferentes conjuntos de genes de virulência (CLARKE, 2001). Todas as cepas patogênicas de *E. coli* contêm regiões genômicas (ilhas) carregadas com um conjunto de genes de virulência que codificam as características essenciais para a adesão, colonização, invasão, secreção de compostos tóxicos e funções de transporte (ELSAS et al., 2011; TOUCHON et al., 2009).

A sorotipagem de *E. coli* ocupa um lugar central na história desse patógeno. Antes da identificação dos fatores de virulência específicos de linhagens de *E. coli* diarreiogênica, a análise do sorotipo era o meio predominante pelo qual as linhagens patogênicas eram diferenciadas. Em 1944, Kauffman propôs um esquema para a classificação sorológica de *E. coli*, que são sorotipadas em O (camada de lipopolissacarídeos-LPS), H (antígeno flagelar), K (capsulares) e F (fimbriais). Na literatura são descritos mais de 700 sorotipos antigênicos de *E. coli* baseados em seus antígenos O, H e K (KAPER et al., 2004). Existem ainda amostras rugosas, autoaglutinantes, que não podem ser sorotipadas devido à perda parcial ou total das cadeias de polissacarídeos (NATARO e KAPER, 1998; ROCHA, 2008; TRABULSI, 2005; WHITTAM, 1996).

As *E. coli* que são capazes de causar doenças em indivíduos saudáveis são classificadas nas categorias diarreiogênicas (DEC) e extra-intestinais (ExPEC) (CROXEN e FINLAY, 2010). A categoria extra-intestinal é composta por dois patótipos específicos que são divididos em *E. coli* causadora de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC). As cepas diarreiogênicas compõem seis patótipos que são divididos em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (CROXEN e FINLAY, 2010; KAPER et al., 2004; NGUYEN et al., 2005; TANIUCHI et al., 2012).

2.3 Patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC)

2.3.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC foi o primeiro patótipo descrito como o responsável por grandes surtos de diarreia infantil nos anos de 1940 e 1950 (CHEN e FRANKEL, 2005; HU e TORRES, 2015). Esta linhagem de *E. coli* é responsável por quadros de diarreia aquosa com presença de muco e que pode ser acompanhada de vômitos e febre em crianças abaixo de dois anos de idade (GOMES et al., 1998; TRABULSI., 2005).

De acordo com Kaper e colaboradores (2004), os mecanismos pelos quais EPEC causa diarreia foram desconhecidos por décadas. Este patótipo somente era identificado de acordo com os sorotipos O:H. Entretanto à partir de 1979, numerosos avanços na compreensão da patogenia de EPEC foram elucidados o que permitiu a sua definição. Os participantes do Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC em 1995 definiram em consenso que EPEC produz uma patologia característica (A/E) sobre as células epiteliais e não apresenta a toxina Shiga. Além disso, esse patótipo foi subdividido em EPEC “típica” (tEPEC) e “atípica” (aEPEC). Essa classificação foi baseada na presença do plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*) e expressão da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) presente somente nas cepas de EPEC típica (ABE et al., 2009; CHEN e FRANKEL, 2005; KAPER, 1996; NARA et al., 2010).

Os aspectos epidemiológicos e os reservatórios das duas cepas de EPEC também são distintos. Segundo alguns estudos, as cepas de EPEC típica estão

associadas a infecções de crianças menores de um ano de idade nos países de baixa e média renda e não são descritas em outros reservatórios diferentes do homem (HERNANDES et al., 2009; HU e TORRES, 2015; TRABULSI et al., 2002). As cepas de EPEC atípica estão associadas com grandes surtos de doença diarreica envolvendo crianças e adultos nos países industrializados e podem ser encontradas em diferentes espécies de animais (KAPER et al., 2004; NATARO e KAPER, 1998; **NGUYEN et al., 2005**).

As infecções provocadas por EPEC resultam em uma patologia intestinal característica, conhecida como A/E (*attaching and effacing*). As bactérias aderem intimamente com as membranas das células epiteliais intestinais e causam alterações surpreendentes no citoesqueleto, incluindo o acúmulo de actina polimerizada por baixo das bactérias aderentes, eliminação das microvilosidades e formação de uma estrutura padrão nos enterócitos em formato de pedestal (Figura 1). A capacidade para induzir a aderência (A/E) é codificada por genes presentes em um locu conhecido como locu de eliminação dos enterócitos (LEE). Este locu codifica para proteínas de membrana externa, que atua como mediador da ligação íntima de EPEC com as células epiteliais intestinais (CROXEN e FINLAY., 2010).

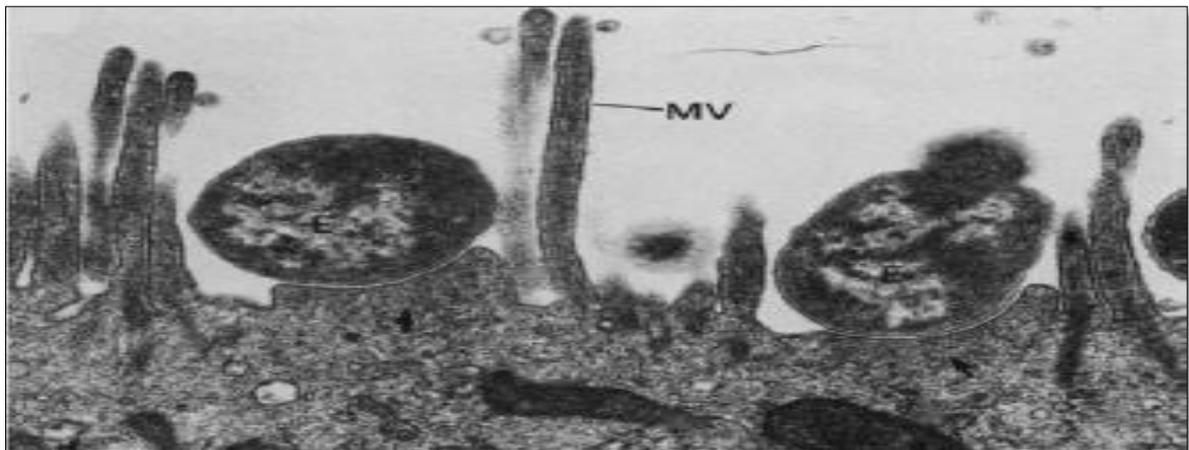


Figura 1. Destruição das microvilosidades (MV) e formação do pedestal nos enterócitos provocados por EPEC. Fonte: Chen e Frankel, 2005.

O locu de eliminação do enterócito (LEE) de 35,6 Kb da cepa de EPEC-E2348/69 foi clonado em *E. coli* K12 para comprovar sua patogenicidade. O resultado foi o aparecimento da histopatologia característica (A/E) em *E. coli* K12, que provou de maneira inequívoca, que o locu LEE é um cassete funcional

necessário e suficiente para a virulência de EPEC (MCDANIEL et al, 1995; MCDANIEL e KAPER, 1997).

A sequência genômica completa de LEE demonstrou um sistema altamente regulado que realiza a translocação de proteínas efetoras bacterianas para dentro do citoplasma das células hospedeiras. Essas sequências compreendem cinco *operons* policistrônicos e 41 ORFs (*open reading frames*). Os genes são separados em domínios funcionais. Um domínio codifica para proteínas do sistema de secreção do tipo III (EspA, EspB, EspD e EspF) e suas respectivas chaperonas moleculares; e outro domínio codifica para as proteínas relacionadas com adesão íntima de EPEC (Tir e intimina) (CHEN E FRANKEL, 2005; DEAN et al., 2005; **YOUNIS et al., 2010**).

O modelo de patogênese de EPEC é considerado mais complexo que uma simples ligação das células epiteliais por meio de uma única adesina ou secreção de uma enterotoxina que induz diarreia. O processo de colonização ocorre em três etapas: adesão, produção e translocação de proteínas efetoras e íntima aderência (CLEARY et al., 2004; GOMES et al., 2010). A fase de adesão de EPEC típica envolve a participação do fator BFP (*Bundle-forming pilus*), da proteína intimina e do filamento EspA (EPEC *secreted proteins A*) (CLEARY et al., 2004). O fator BFP é codificado por um conjunto de 14 genes situados no plasmídio EAF (SOHEL et al., 1996; STONE et al, 1996). O gene *bfpA* codifica para a subunidade estrutural deste fator. Além dos genes plasmidiais, a formação do fator BFP requer um gene cromossômico (*dsbA*) que codifica uma dissulfeto isomerase, necessária para estabilização das pontes de dissulfeto (ZHANG & DONNENBERG, 1996).

A fase de infecção por EPEC é caracterizada pela produção e translocação de proteínas efetoras a partir de um sistema de secreção do tipo III (JARVIS et al., 1995; CROXEN e FINLAY, 2010). O sistema de secreção do tipo III é utilizado por muitos agentes patogênicos entéricos que injeta suas proteínas efetoras diretamente nas células hospedeiras (GARMENDIA et al., 2005). Em EPEC, o sistema de secreção do tipo III é dedicado à secreção de proteínas específicas, incluindo Tir, EspA, EspB e EspD que são essenciais para as desordens das vias de transdução de sinal das células hospedeiras e formação das lesões A/E (Figura 2) (DONNENBERG et al., 1993; IDE et al, 2001).

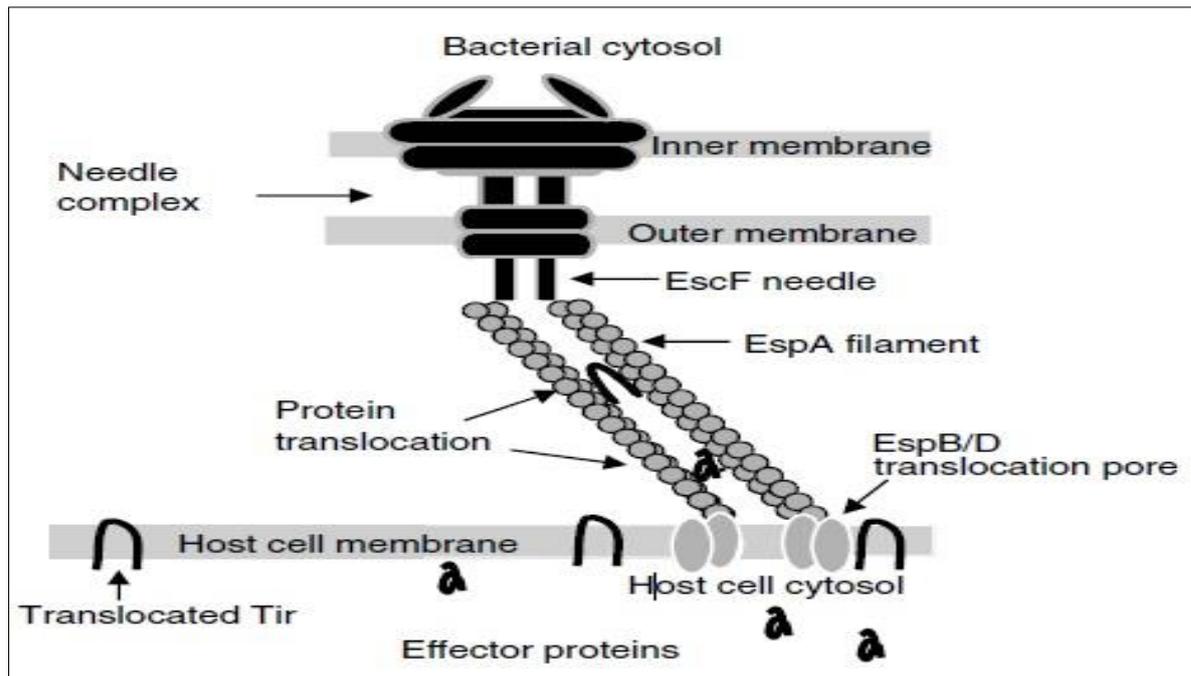


Figura 2. Sistema de secreção do tipo III de EPEC. Complexo de proteínas efectoras (EspA/EspB/D/ e Tir) utilizadas para a invasão das células hospedeiras. Fonte: (CHEN E FRANKEL, 2005).

O sistema de secreção do Tipo III de EPEC é um complexo que se estende da parede celular bacteriana até a membrana da célula hospedeira. A polimerização de EspA é realizada a partir do fator EscF que conduz a formação de filamentos ocos. Por meio desses filamentos ocorre a translocação das proteínas efectoras. Essas proteínas atravessam a membrana das células hospedeiras por meio de poros que são formados pelos fatores EspB e ESPD (FRANKEL, et al., 1998).

Os efetores irão atingir os alvos em diferentes compartimentos celulares. A proteína Tir (*translocated intimin receptor*) é ancorada na membrana dos enterócitos onde funciona como um receptor para a proteína de superfície bacteriana denominada intimina. A interação Tir-Intimina permite a ancoragem de EPEC na superfície dos enterócitos e posteriormente a formação de um complexo proteico capaz de realizar a polimerização dos filamentos de actina, formação do pedestal e a lesão histopatológica A/E (*attaching and effacing*) (KAPER, et al., 2004; SAL-MAN et al., 2009; CAPELLONE, 2010).

A pesquisa sobre EPEC já percorreu um longo caminho desde a sua primeira descrição e muitos fatores de virulência foram elucidados ao longo dos anos.

Atualmente, as pesquisas se concentram no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, diagnóstico e vacinas para diarreia infantil provocada por EPEC.

2.3.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

O reconhecimento de EHEC como uma classe de *E. coli* patogênica ocorreu a partir de observações epidemiológicas chave. A primeira observação foi relatada por Riley e colaboradores (1983) após a investigação de dois surtos de uma doença gastrointestinal distintiva e caracterizada por dor abdominal (cólica grave), seguido de diarreia sanguinolenta e pouca ou nenhuma febre. A doença foi designada como colite hemorrágica (CH) e foi associada com a ingestão de hambúrgueres mal cozidos de uma cadeia de restaurantes de *fast-food* (NATARO e KAPER, 1998).

A segunda observação importante foi realizada por Karmali e colaboradores (1983) que relataram a associação de casos de síndrome hemolítica urêmica (SHU) com a presença de uma citotoxina específica nas fezes produzida por *E. coli*. As citotoxinas observadas por Karmali e colaboradores (1983-a) foram originalmente relatadas por Konowalchuk e colaboradores (1977). Os pesquisadores relataram que filtrados de culturas de algumas cepas de *E. coli* produziam um efeito citopático impressionante e irreversível em culturas de células Vero. Após um ano intenso de publicações, Karmali e colaboradores (1983-b) concluíram que a citotoxina observada nas células Vero era um fator de virulência comum entre pacientes que apresentavam colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica. Essa toxina foi classificada como toxina Shiga (Stx ou verotoxina) que também são produzidas por alguns patógenos entéricos como a *Shigella dysenteriae* (CROXEN e FINLAY, 2010; LIOR, 1994; O'LOUGHLIN e ROBINS-BROWNE, 2001).

As *E. coli* produtoras desta toxina são conhecidas como **STEC** (*Shiga toxin-producing E. coli*). **Dentre as STEC, o patótipo classificado como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) está associada a grandes surtos de diarreia infantil em todo o mundo. Essa cepa também é capaz de induzir a lesão attaching and effacing (A/E), de forma semelhante à que ocorre em EPEC** (CROXEN e FINLAY, 2010; KAPER, 2004; NATARO e KAPER, 1998).

EHEC é um agente patogênico altamente infeccioso que coloniza o íleo distal e o intestino grosso nos seres humanos. Os sorotipos implicados em surtos de diarreia variam de país para país. Os principais sorotipos de EHEC conhecidos são:

O26:H11, O103:H2, O111ac:H8; O118:H16, O145:H28 e O157:H7 (BROOKS et al., 2005; GYLES, 2007; SODONA et al., 2008). Esses patógenos podem ser encontrados na microbiota intestinal de diversos animais como bovinos, suínos, ovelhas, cabras, veados, cavalos, cachorros e em alguns pássaros. A transmissão ocorre geralmente através de água e alimentos contaminados (GYLES, 2007; CAPRIOLI et al., 2005).

Na América do Norte, Japão e partes da Europa, a maioria dos surtos de diarreia são relacionados ao sorotipo O157:H7 de EHEC. Adultos e crianças que são infectados com EHEC sofrem de colite hemorrágica e outras complicações que podem levar à síndrome hemolítica urêmica (SUH). A síndrome hemolítica urêmica é definida pela insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática e pode ser precedida por quadros de diarreia sanguinolenta (CROXEN e FINLAY, 2010; NATARO e KAPER, 1998).

Os mecanismos de patogênese de EHEC são semelhantes aos descritos para EPEC, ou seja, ocorre também o processo de adesão (mediado pela intimina e pela proteína receptora Tir) e a formação da lesão histopatológica A/E. No entanto, existem diferenças no acionamento da reorganização de actina em relação à proteína Tir, essencial para indução do sinal (O'BRIEN e HOLMES, 1987; SAL-MAN et al., 2009).

Quase todos os sorotipos de EHEC O157:H7 abriga um plasmídeo de virulência de 92 Kb denominado Po157. Esse plasmídio possui cerca de 100 ORFs (*open reading frames*) que codifica para vários fatores de virulência, sendo o principal a toxina Shiga (Stx). Essa toxina pode ser dividida em dois grupos principais, Stx1 e Stx2, que podem ser encontradas em várias combinações diferentes de isolados de EHEC. A toxina Stx1 é idêntica à toxina Shiga de *S. dysenteriae* e está associada a quadros de síndrome hemolítica urêmica, enquanto o grupo de Stx2 é mais prevalente em casos de colite hemorrágica. Essas toxinas pertencem a família das toxinas do tipo AB₅, apresentando uma subunidade A com 32 kDa e 5 subunidades B com 7,5 kDa (CLEMENTS et al., 2012; NATARO e KAPER, 1998).

A subunidade A é composta por dois peptídeos. O peptídeo A1 que possui atividade enzimática e o peptídeo A2 que liga a subunidade B ao complexo proteico. A subunidade B é responsável pela ligação da toxina Shiga ao receptor denominado

globotriasilceramida (Gb3), que é localizado na superfície das células renais, intestinais e cerebrais do homem. A interação da Stx com os receptores Gb3 induz invaginações da membrana para facilitar a translocação da toxina. A Stx é translocada para dentro das células hospedeiras por meio de endossomas precoces que são transportados para o complexo de Golgi e então para o retículo endoplasmático. No retículo, o peptídeo A1 (N-glicosidase) remove um resíduo de adenina da porção 28S do ribossomo eucariótico. Essa clivagem inibe a síntese proteica levando a necrose e morte celular dos enterócitos (JOHNSON et al., 2006; ROMER et al., 2007; KURMANOVA et al., 2007).

O sequenciamento do genoma da cepa O157:H7 revelou numerosas ilhas cromossômicas que codificam fatores de virulência adicionais. Entre estes fatores, incluem novas fímbrias, sistemas de absorção, utilização de ferro e uma urease que é semelhante à produzida por *Klebsiella* e outros agentes patogênicos do trato urinário (KAPER, 2004). Outros fatores que também podem colaborar com a patogenicidade de EHEC são: O fator Sfp (*sorbitol-fermenting plasmid*), uma fímbria presente em isolados de EHEC fermentadores de sorbitol do sorogrupo O157 (BRUNDER et al., 2001) e o fator EspP (*extracellular serine protease, plasmid encoded*), uma serino protease codificada no plasmídeo pO157 que tem a capacidade de clivar o fator V de coagulação, podendo resultar na exacerbação da doença hemorrágica (BRUNDER et al., 1997).

2.3.3 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

Esta cepa possui a capacidade de invadir as células do intestino, provocando no homem a disenteria bacilar. A doença ocorre geralmente em um intervalo de 8 a 24 horas após o consumo de alimentos ou água contaminados. As apresentações clínicas mais comuns são: diarreia, cólicas abdominais e febre, que em alguns casos evolui para diarreia sanguinolenta com presença de muco e leucócitos (LAMPEL, 2014). A invasão intracelular de EIEC possui uma relação íntima com os fatores bioquímicos, genéticos e patogênicos aos descritos para *Shigella* spp. Muitos estudos mostraram que *Shigella* e *E. coli* enteroinvasora são taxonomicamente indistinguíveis ao nível de espécie, mas, devido ao significado clínico de *Shigella*, a distinção da nomenclatura é mantida (KAPER et al., 2004; LAN et al., 2001; SCHROEDER et al., 2008).

Alguns sorotipos de EIEC e *Shigella* compartilham antígenos-O idênticos ou comuns, entretanto, EIEC possui a capacidade de fermentar xilose e produzir gás a partir do metabolismo de glicose, sendo que essas características são negativas para *Shigella*. A maioria dos isolados de *E. coli* são móveis e possuem a lisina descarboxilase ativa. No entanto as cepas de EIEC não apresentam motilidade, carecem de lisina descarboxilase e cerca de 70% não fermentam lactose (LAMPEL, 2014; MAURELLI, 2013).

Os primeiros estudos genéticos demonstraram que, essencialmente, todos os fatores de virulência necessários para a expressão do fenótipo invasivo de EIEC e *Shigella* são codificados no plasmídeo (pINV) de 220 kb. Os genes mais importantes estão no locus conhecido como *mxi-spa*, que codificam para o sistema secretor Tipo III. Esse mecanismo é necessário para a secreção de várias proteínas como as IpaA, IpaB, IpaC, IpaD e IpaH (*invasion plasmid antigens*), que possibilitam os eventos de sinalização epitelial, rearranjos do citoesqueleto, captação celular, lise do vacúolo endocítico, dentre outras ações nas células hospederias (KAPER, 2004; MOUNIER et al., 2009; OGAWA et al., 2008; PENDARIES et al., 2006; SCHROEDER et al., 2008).

EIEC e *Shigella* spp. causam diarreia pela invasão ostensiva das células epiteliais no intestino grosso. Os sintomas clínicos de disenteria podem ser diretamente atribuídos às etapas de invasão dos enterócitos, lise do fagossomo, multiplicação intracelular, movimentação intracitoplasmática direcionada, migração basolateral pelas células epiteliais e estimulação de uma resposta inflamatória forte das células hospedeiras (Figura 3) (GOLDEBERG e SANSONETTI, 1993; MAURELLI, 2013).

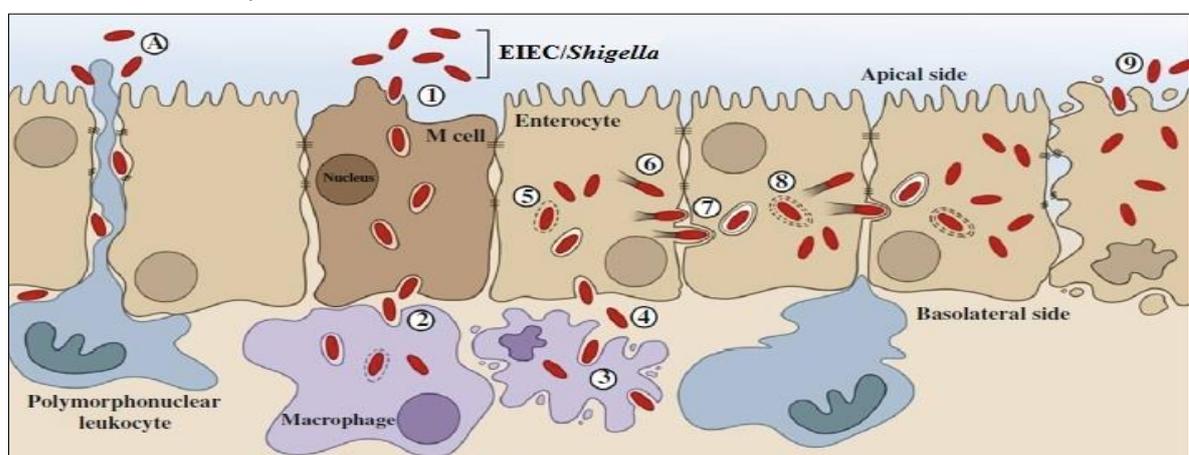


Figura 3. Estágios da invasão de EIEC/*Shigella* e propagação basolateral pelas células epiteliais. Fonte: Adaptado de MAURELLI, 2013.

A infecção começa no cólon (1), onde as bactérias passam através das células M por transcitose para alcançar a mucosa subjacente. (2) Posteriormente as bactérias são fagocitadas por macrófagos residentes. (3) Após a fagocitose, os patógenos escapam do fagossoma dos macrófagos e induzem morte celular para obter acesso ao lado basolateral dos enterócitos. (4) Em seguida, as cepas de EIEC/*shigella* invadem os enterócitos na região basolateral por meio dos fatores de virulência secretados pelo T3SS. (5) Uma vez no interior das células epiteliais, as bactérias rompem a única membrana do fagossomo e replicam-se dentro do citossol. (6) Em seguida, elas polimerizam actina das células hospedeiras, (7) e criam uma “cauda” de actina para promover a sua propagação célula a célula. (8) Uma vez dentro de um segundo enterócito, EIEC/*shigella* escapam de um novo fagossomo de membrana dupla. (9) A replicação e a propagação bacteriana continuam durante toda a mucosa do cólon do intestino. As células epiteliais infectadas sofrem necrose e morrem, liberando os patógenos no lúmen intestinal. Desta forma, pode ocorrer a disseminação das bactérias para outro hospedeiro pela via fecal-oral. (A) Para maximizar a invasão, as células epiteliais infectadas induzem através dos quimioatratantes IL8 e heparina A3, um massivo fluxo de leucócitos polimorfonucleares para a região infectada. A migração transepitelial destes leucócitos rompe o revestimento intestinal e permite que as bactérias atravessem entre as células epiteliais, atingindo assim a membrana basolateral para a subsequente invasão (CROXEN e FINLAY, 2010; MAURELLI, 2013).

2.3.4 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) são agentes causadores de diarreia persistente (≥ 14 dias) que foram descritos pela primeira vez por Cravioto e colaboradores (1979). O fenótipo característico descrito para esses patógenos são determinados pela sua característica de adesão agregativa (AA) padrão em culturas de células HEp-2 ou HeLa (BRUSSOW, 2014). Embora seja considerado um patógeno emergente, EAEC é a segunda causa mais comum de diarreia dos viajantes em países de alta renda e de países de baixa e média renda. Essas cepas tornaram-se comumente reconhecidas como causa de diarreia endêmica e epidêmica em todo o mundo. A diarreia causada por EAEC é geralmente aquosa,

podendo ser acompanhada por muco ou sangue. A colonização dessas bactérias podem ocorrer na mucosa de ambos os intestinos e também conduzir uma inflamação suave no cólon (ASLANI et al., 2011; NAVANEETHAN e GIANNELLA, 2008).

O maior surto de diarreia por EAEC ocorreu no Japão. Este surto envolveu 16 escolas diferentes, totalizando 2.697 crianças que foram contaminadas por essa cepa após o consumo de merenda escolar contaminada. Os Fatores de risco para o desenvolvimento da infecção por EAEC incluem refrigeração imprópria de alimentos, contaminação de alimentos e falta de higiene. Outro fator de risco possível inclui a imunossupressão pela infecção avançada em pacientes com HIV. Alguns estudos mostraram que 10 a 44% de pacientes infectados pelo vírus do HIV também apresentavam infecção por EAEC (HUANG et al., 2004; **HUANG et al., 2006**).

A estratégia básica de infecção de EAEC é a colonização da mucosa intestinal, seguido pela secreção de enterotoxinas e citotoxinas. O fenótipo característico de adesão agregativa de EAEC (formação de um padrão de “tijolos empilhados” em células HEp-2), é mediada por genes que são encontrados em uma família de plasmídeos de virulência denominados plasmídeos pAA. Estes plasmídeos de 100 kb codificam os genes de virulência necessários para a biogénese de fímbrias de aderência agregativa (AAFs), que até o momento foram identificadas quatro tipos (AAF/ I, AAF/ II, AAF/ III e Hda) (ASLANI et al., 2011; BOISEN et al., 2013).

O fator de virulência mais estudado é descrito como AggR. Esse fator controla a expressão dos fatores de aderência, de uma proteína de revestimento de superfície denominada de dispersina e de um grande aglomerado de genes codificados no cromossomo de EAEC, porém, as condições naturais que resultam na ativação de AggR são desconhecidas (BOISEN et al., 2013; KAPER et al., 2004).

A aderência de EAEC estimula a produção de muco e a formação de um biofilme sobre a superfície da mucosa. Os biofilmes formados por esses patógenos são distintos dos biofilmes formados por *E. coli* não patogênicas. Os biofilmes de EAEC são incorporados em camadas espessas na superfície dos enterócitos e podem contribuir para o desenvolvimento de desnutrição e diarreia prolongada. Pode ocorrer também uma resposta inflamatória aguda após a ocorrência de danos nos enterócitos devido a adesão das bactérias. A resposta inflamatória do

hospedeiro ocorre por meio da ativação do receptor do tipo Toll 5 (TLR5), que estimula a liberação de IL-8, provocando assim a destruição das células epiteliais e secreção de fluido (CROXEN e FINLAY, 2010; HUANG et al., 2004; NAVANEETHAN e GIANNELLA, 2008).

2.3.5 *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC)

A cepa classificada como DAEC, é um grupo heterogêneo de *E. coli*, definida por um padrão de aderência difusa em células do tipo HeLa e HEp-2. Esses patógenos são relacionados com diarreias que acometem crianças com idade superior a 12 meses, bem como adultos com recorrentes infecções do trato urinário. Poucos estudos epidemiológicos clínicos permitiu a descrição adequada da síndrome clínica associada à infecção por DAEC. No entanto, em alguns trabalhos publicados, a maioria dos pacientes infectados com DAEC tiveram diarreia aquosa sem sangue ou fezes que apresentaram leucócitos (NATARO e KAPER, 1998; SERVIN, 2005).

Cerca de 75% das cepas de DAEC produzem uma adesina fimbrial denominada F1845. Esta fímbria pertence a família de adesinas Dr, que inclui adesinas de *E. coli* uropatogênicas, como AfaE-I e AfaE-III. DAEC induz um efeito de transdução de sinal característico no intestino delgado, e os enterócitos se manifestam com o crescimento de projeções celulares que envolvem as bactérias. Essas adesinas usam como receptor o DAF (*decay-accelerating factor*) que normalmente protege as células do sistema complemento (KAPER et al., 2004; NOWICKI et al., 2001). Yamamoto e colaboradores (1994) mostraram que as cepas de DAEC são capazes de induzir essas projeções que são semelhantes a dedos que se estendem a partir da superfície de células Caco-2 ou HEp-2. Essas projeções aparentemente envolvem as bactérias, fornecendo proteção contra alguns antibióticos como a gentamicina, porém, não ocorre internalização completa das cepas.

Apesar da **baixa prevalência de isolados de DAEC em relação às outras cepas de *E. coli*** diarreiogênicas, alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de desenvolver estratégias terapêuticas contra esse patógeno. Araújo e Giugliano (2000) demonstraram em um estudo que a adesão nos enterócitos de duas cepas

de DAEC e EAEC foi inibida por proteínas e imunoglobulinas encontradas no soro do leite materno. Estas proteínas foram utilizadas em concentrações mais baixas do que as encontradas no leite natural. Segundo os autores, as glicoproteínas estão associadas com efeitos inibitórios de adesão dessas bactérias. Além disso, os resultados obtidos, indicam que os componentes do leite materno protegem os bebês contra determinadas infecções intestinais.

2.3.6 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

A cepa de *Escherichia coli* enterotoxigênica foi inicialmente reconhecida como agente causador de doença diarreica em leitões recém-nascidos. Os primeiros mecanismos de patogênese também foram elucidados nesses animais infectados por ETEC (NATARO e KAPER, 1998). DuPont e colaboradores (1971) foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar a capacidade de ETEC infectar e causar diarreia em seres humanos. ETEC é considerada como um dos agentes causadores mais frequentes da diarreia infantil e da diarreia dos viajantes em países de baixa e média renda. Além disso, essa bactéria é relacionada com o desenvolvimento de desnutrição em crianças (DUBREUIL, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, esse patógeno provoca por ano a morte de aproximadamente 400.000 crianças com menos de 5 anos de idade (QADRI *et al.*, 2005; MENTZER *et al.*, 2014).

Esse enteropatógeno é contraído por meio do consumo ou utilização de água ou alimentos contaminados e colonizam a superfície da mucosa do intestino delgado, sintetizando enterotoxinas (LT/ST) que provocam diarreia (GAASTRA E SVENNERHOLM, 1996). A doença possui um início tipicamente abrupto, com um curto período de incubação entre 14 à 50 horas. A dose infectante avaliada em voluntários foi de aproximadamente 10^8 a 10^{10} unidades formadoras de colônias. Os aspectos clínicos mais comuns são diarreia aquosa, geralmente sem sangue, muco e pus. Os sinais de febre e vômitos estão presentes numa minoria de pacientes. Além disso, a diarreia pode ser leve, breve e auto-limitada ou pode resultar em graves evacuações, semelhante à observada na infecção por *Vibrio cholerae* (DUPONT *et al.*, 1971; DUBREUIL, 2014).

Estudos referentes à epidemiologia desse patógeno demonstrou que em diversas áreas do mundo, incluindo principalmente países em desenvolvimento,

ETEC é responsável por mais de 20% de todas as doenças diarreicas graves. Estima-se que mais de 10 milhões de turistas todos os anos sofram de diarreia provocada por ETEC (DUBREUIL, 2014; QADRI et al., 2005; WHO, 2013). O padrão epidemiológico da doença diarreica provocada por ETEC é determinada basicamente pela compreensão da prevalência das toxinas (LT e ST) e pelos fatores de colonização (CF) utilizados por ETEC. Isidean e colaboradores (2011) fizeram uma revisão sistemática da epidemiologia de ETEC com o foco nesses dois fatores. Os autores coletaram dados de 17.205 isolados de ETEC que foram abstraídos de 136 estudos. Aproximadamente metade dos estudos (49%) envolveu apenas populações endêmicas, e 17% envolveram apenas viajantes. Na análise global, 60% dos isolados de ETEC expressaram a toxina LT, sendo 27% isoladamente e 33% expressaram LT em combinação com a toxina ST. Os resultados sobre a prevalência dos fatores de colonização demonstraram que 17% das cepas de ETEC expressaram o fator CFA/I, 9% o CFA/II e 18% o CFA/IV. Segundo os autores a heterogeneidade ao longo do tempo, a população, a região, confundidos pela variabilidade dos fatores de colonização e metodologias de detecção das toxinas de ETEC, ofuscam as estimativas racionais para os requisitos de legitimidade em alguns estudos.

No Brasil, alguns estudos sobre a prevalência de ETEC também foram realizados. Orlandi e colaboradores (2006) realizaram um estudo sobre a etiologia das infecções diarreicas em crianças de Porto Velho-RO. Foram analisadas 470 crianças com menos de 72 meses de idade que apresentavam diarreia aguda. Destas, foram constatados 21 casos de diarreia provocada por ETEC. Nunes e colaboradores (2011) também conduziram um estudo que envolveu 250 crianças com diarreia, com idade entre 1 e 5 anos, de famílias de baixa renda em Teresina-PI. Nesse estudo foram isolados 9,2% de ETEC. Outro estudo envolveu uma análise sobre a etiologia da diarreia infantil no Nordeste do Brasil. Moreno e colaboradores (2010) analisaram 2.344 cepas de *E. coli* isoladas de 290 crianças com diarreia. Os autores verificaram que 10% desses isolados eram de ETEC.

A patogênese de ETEC se inicia com a colonização da superfície da mucosa do intestino delgado mediada por fatores de colonização (CFs), que podem ser de caráter não-fimbrial, fimbrial, helicoidal ou fibrilar (CROXEN E FINLAY., 2010; TURNER et al.,2006). A fixação mais íntima pode ser facilitada por duas proteínas

de membrana externa denominadas de Tia e TibA (TURNER et al.,2006). Um grande número de fatores de colonização foram identificados, no entanto, estudos epidemiológicos indicam que aproximadamente 75% das cepas de ETEC isoladas de seres humanos expressam os fatores CFA/I, CFA/II e CFA/IV (Figura 4) (KAPER, 2004; WOLF, 1997).

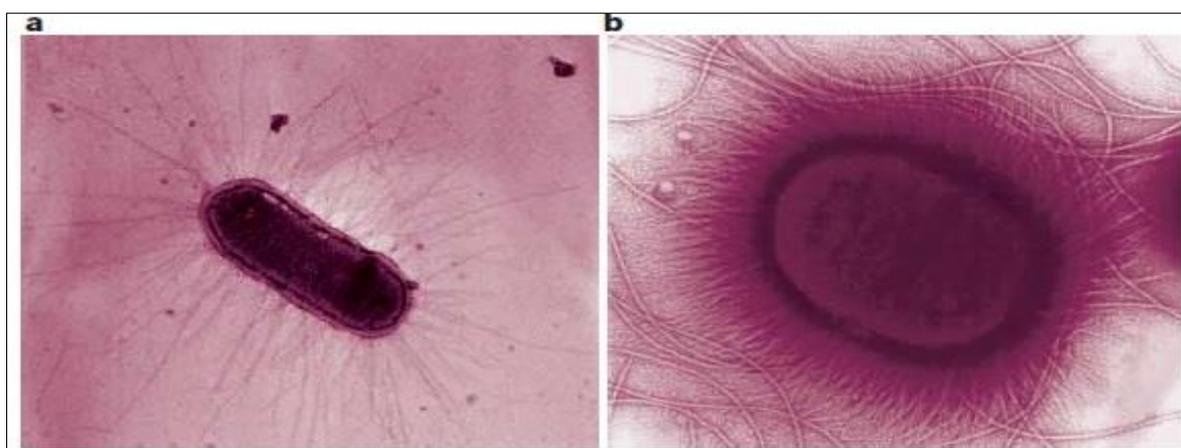


Figura 4. Fatores de colonização produzidos por ETEC (fímbrias/pili). A) Fator de colonização linear CFA/III produzidos por ETEC (fímbrias de 5-7 nm de diâmetro). B) Fator de colonização CFA/I. Fímbrias abundantes e longas medindo aproximadamente 5 a 7 nm. Fonte: Adaptado de Kaper, 2004.

A diarreia provocada por ETEC tem sido atribuída pela secreção das enterotoxinas termolábeis (LT) e enterotoxinas termoestáveis ao calor (ST) (ROY et al., 2010). As LTs de *E. coli* são toxinas oligoméricas que estão intimamente relacionadas, em estrutura e função, à enterotoxina da cólera (CT) expressa por *Vibrio cholerae* (NATARO e KAPER, 1998). As enterotoxinas termolábeis apresentam heterogeneidade, constituindo-se de duas classes: LT-I e LT-II. A LT-I é isolada tanto de amostras de origem humana como de animal, sendo formada por uma subunidade A e cinco subunidades B, apresentando um peso molecular de 86 KDa (DORSEY et al., 2006). A enterotoxina LT-II possui grande homologia com a LT-I em nível de subunidade A, mas é produzida por amostras de ETEC de origem animal.

As subunidades B fazem a ligação da holotoxina (LT) nos gangliosídios GM1 ou GD1 que estão presentes na superfície das células intestinais. A subunidade A é responsável pela atividade enzimática da toxina. A subunidade possui atividade de ADP-ribosil-transferase e transfere uma porção de ADP-ribosil de NAD, para a subunidade alfa da proteína estimuladora G. Isso resulta na ativação da enzima

adenilato ciclase. A ativação permanente da enzima aumenta os níveis de AMP cíclico intracelular. Com o aumento de AMPc, ocorre a ativação das quinases dependentes e também a ativação do canal principal de cloreto das células epiteliais, o regulador da condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR) (KAPER et al., 2004; SPANGLER, 1992).

A fosforilação desse canal resulta no efluxo de íons Cl^- , acúmulo de líquidos e diarreia aquosa (Figura 5) (KAPER, 2004; SEARS E KAPER, 1996; SPANGLER, 1992). As enterotoxinas termoestáveis (STs) incluem duas classes independentes de toxinas (STa e STb) que diferem em estrutura e mecanismo de ação. A classe STa apresenta peso molecular de 2 KDa, é solúvel em água e em solventes orgânicos, sendo a classe associada a doenças humanas. STa liga-se a receptores da enzima guanilato ciclase e estimula a sua atividade. Com a ativação da enzima, ocorre um aumento dos níveis intracelulares de GMP cíclico, que ativa o canal CFTR, o que resulta na absorção deficiente de Na^+ (sódio) provocando o efluxo de água para o lúmen intestinal (Figura 5) (KAPER et al., 2004).

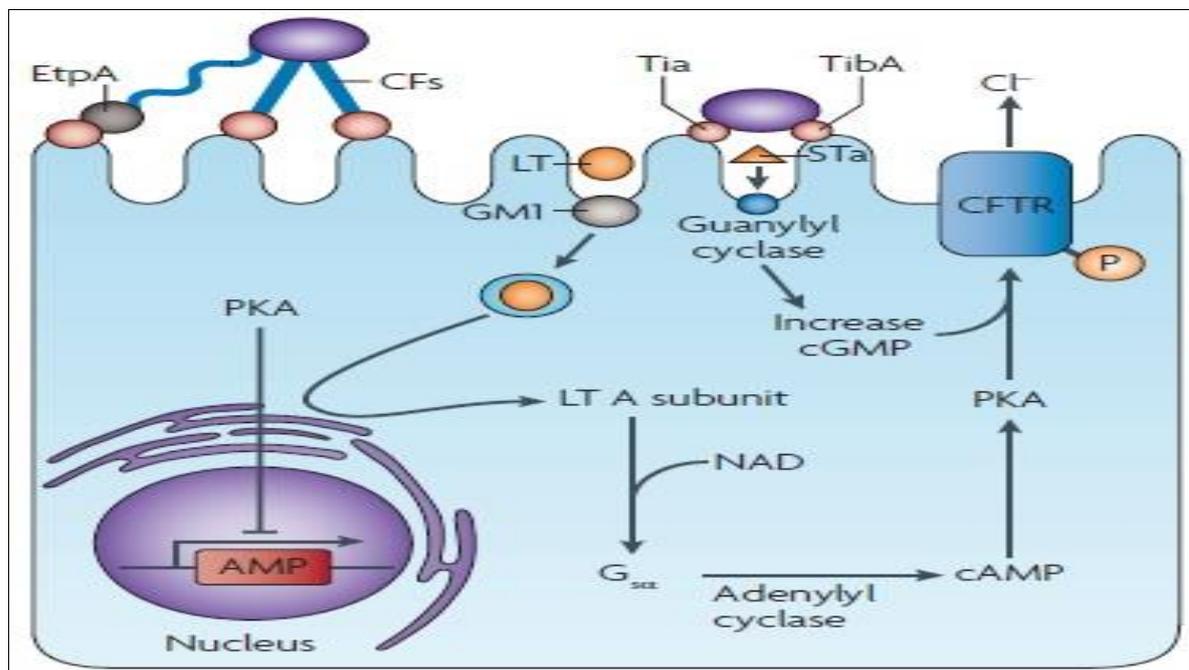


Figura 5. Mecanismos de ancoragem e patogênese de ETEC. Fonte: Adaptado de CROXEN e FINLAN, 2010.

Os estudos empreendidos como uma investigação inicial de respostas imunes que se desenvolveram com a exposição repetida a ETEC, demonstraram que os antígenos são reconhecidos durante a infecção experimental em camundongos ou

em infecções naturais em humanos. Estes antígenos são compostos por uma variedade de proteínas de virulência que foram descobertas no decurso das mais recentes investigações moleculares com a linhagem H10407 de ETEC. Dentre esses antígenos incluem, flagelina, TibA, ClyA, proteínas autotransportadoras EatA e a exoproteína descrita como EtpA, objeto de estudo do presente trabalho (CROXEN E FINLAY., 2010; ROY et al., 2009; PATEL et al., 2004).

2.4 O fator de adesão EtpA

A adesão ao epitélio intestinal por ETEC é um processo muito complexo, que pode envolver várias estruturas, incluindo os flagelos. O papel dos flagelos na patogênese desse patógeno ainda não foi suficientemente explorado (GIRON, 2002; WOLF, 1997). Os flagelos são estruturas cilíndricas complexas montadas a partir de aproximadamente 20.000 flagelinas (FliC - subunidade proteica). Essas moléculas viajam para baixo do cilindro flagelar nascente até a ponta distal, onde elas são dirigidas por proteínas cap (FliD) para o flagelo crescente. A flagelina possui um domínio central que se projeta sobre a superfície do eixo flagelar e representa a variação antigênica utilizada na sorotipagem H de *E. coli*. As regiões conservadas da flagelina (amino e carboxi) interagem com as subunidades adjacentes viradas para o eixo do núcleo inacessível do flagelo. (YONEKURA et al., 2000; YONEKURA et al., 2003).

A adesina descrita como EtpA é uma proteína extracelular grande que pertence a família das proteínas conhecida como TPS (*two-partner secretion*) e foi recentemente identificada em ETEC por Roy e colaboradores (2009). EtpA interage com as regiões altamente conservadas da flagelina. Essas interações são críticas para a adesão e a colonização intestinal de ETEC (Figura 6). Os recentes esforços levaram à identificação de dois loci descobertos no mesmo plasmídeo de virulência da cepa H10407 de ETEC que codifica o fator de colonização CFA/I. Estes, incluem o *etpBAC* que é o responsável pela produção e a exportação de EtpA (FLECKENSTEIN et al., 2006).

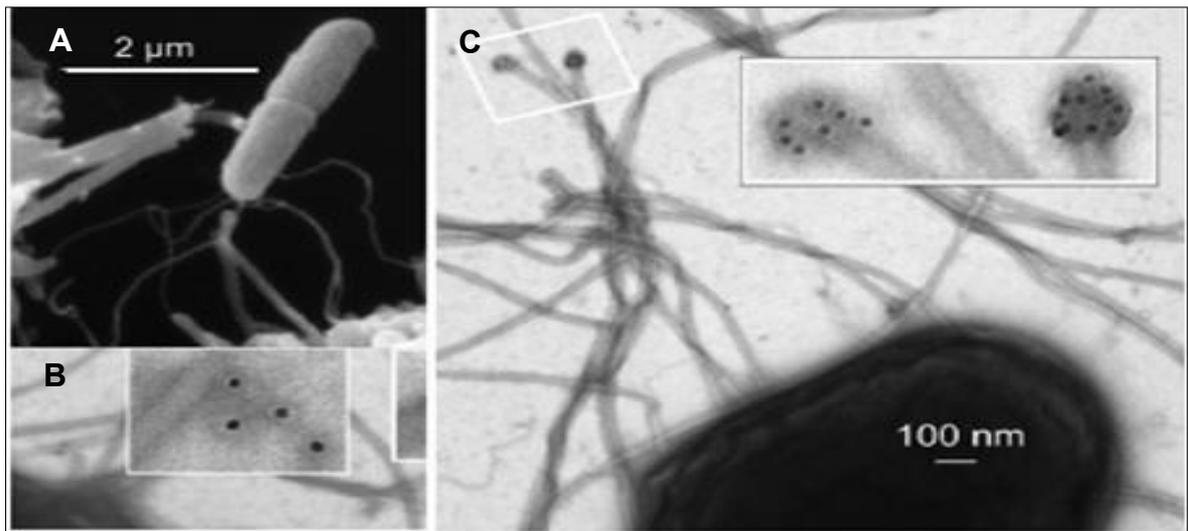


Figura 6. A) ETEC fazendo a ancoragem nas células hospedeiras através das pontas dos flagelos. B e C) EtpA se concentra nas pontas dos flagelos se interagindo com regiões altamente conservadas de flagelina. Fonte: Adaptado de Roy e colaboradores, 2009.

Luo e colaboradores (2015) demonstraram que a proteína EtpA é amplamente representada em um conjunto diversificado de isolados de ETEC. Segundo os autores, a adesina EtpA é expressa em mais da metade de diferentes ETEC, distribuídas ao longo de diversas linhagens filogenéticas pertencentes a vários grupos de fatores de colonização e exibiu surpreendentemente pouca variação de suas sequências. Os autores utilizaram 181 cepas no estudo, das quais 56% expressaram a adesina EtpA.

Embora tanto a adesão bacteriana e colonização intestinal sejam considerados pré-requisitos importantes para entrega eficiente das toxinas, o papel preciso da EtpA na entrega da toxina era até então desconhecido. No entanto, como mostrado por Roy e colaboradores (2012), em algumas cepas de ETEC foi realizado a deleção de EtpA. Como resultado, estas cepas foram menos eficientes na estimulação de respostas de AMP cíclico nas células-alvo em relação ao tipo selvagem de ETEC H10407. Estes dados suportam os pressupostos anteriores sobre a importância de aderência bacteriana e fornecem evidências adicionais de que a entrega da toxina é um processo complexo que envolve vários genes de virulência.

Os novos dados sobre esse antígeno podem complementar de forma significativa as abordagens atuais e promover melhores estratégias para o

desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico e vacinas amplamente protetoras de ETEC.

2.5 Diagnóstico para detecção de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

O diagnóstico dos patógenos que causam as doenças diarreicas é usualmente obtido por meio de vários ensaios, incluindo, sorotipagem, ensaios de cultura em placa, microscopia, biologia molecular e imunoenaios. As principais características de um teste ideal para o diagnóstico dessas doenças devem incluir a rapidez, os custos relativamente baixos e a sensibilidade e especificidade do método devem ser elevados (ANTIKAINEN et al., 2013; ZBOROMYRSKA, 2014).

O diagnóstico para detecção de ETEC iniciou-se por meio da identificação dos sorogrupos dessa bactéria. No entanto, o seu uso foi limitado em Bangladesh, quando se tornou evidente a existência de um número muito elevado de sorotipos de *E. coli* (QADRI et al., 2005). A Identificação direta das enterotoxinas de ETEC têm evoluído ao longo dos últimos anos, e se tornou relevante pela interferência direta que a detecção dessa bactéria têm nas investigações epidemiológicas direcionadas para medidas de controle, no monitoramento dos pacientes infectados para o tratamento imediato, na prevenção de procedimentos invasivos desnecessários e nos tratamentos inadequados, como o uso errado de antibióticos (KARCH et al., 1999; QADRI et al., 2005).

De acordo com Nataro e Kaper (1998), ETEC foi um dos primeiros micro-organismos patogênicos para os quais foram desenvolvidas técnicas de diagnóstico molecular. Os métodos de detecção para o diagnóstico de ETEC estão diretamente relacionados com a identificação de suas enterotoxinas LT/ST. Dentre os vários métodos revistos por Quadri e colaboradores (2005), estão listados os ensaios fisiológicos em coelhos, para detecção da toxina LT, e em ratos recém-nascidos, para toxina ST, tidos como padrão ouro nos primeiros diagnósticos; além destes, a partir da década de 70, foram desenvolvidos dois ensaios com linhagens de cultura de tecidos para detecção da toxina LT, sendo amplamente utilizados até o surgimento da tecnologia de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Os ensaios por aglutinação (ITO et al., 1983), ensaio de aglutinação de látex passiva reversa e ensaio de coaglutinação estafilocócica (SCOTLAND et al., 1989),

também mostraram-se específicos para o diagnóstico de ETEC, no entanto, não foram amplamente utilizados para fins de diagnóstico.

Com o advento das técnicas moleculares, a partir da década de 80, novas metodologias de diagnóstico foram elaboradas para a detecção das toxinas LT/ST e dos fatores de colonização (CFs) de ETEC. Tais métodos foram baseados em análises com sondas radioativas, reações em cadeia da polimerase e imunoenaios (FUJIOKA et al., 2009; STEINSLAND et al., 2003).

A técnica de reação em cadeia da polimerase emergiu como uma ferramenta útil para a detecção desse patógeno. Essa técnica pode ser realizada isoladamente ou em combinação com eletroforese em gel, hibridização de sondas, ou em tempo real para a detecção de fluorescência (LIU et al., 2012). Diversos estudos têm explorado a metodologia baseada na PCR para fins de diagnóstico de ETEC e também de outros agentes causadores da diarreia como EPEC, EHEC e EIEC (ANTIKAINEN et al., 2013; FUJIOKA et al., 2009; LIU et al., 2012). No entanto, ressalta-se que ainda não existe um teste de diagnóstico perfeito para ETEC, e os testes por PCR podem ser caros, demorados e exigir mão de obra bem treinada e especializada (SHEN et al., 2014).

Ensaio utilizando anticorpos são ferramentas essenciais que têm sido utilizadas no desenvolvimento de ensaios diagnósticos. De modo geral, anticorpos policlonais são obtidos a partir do soro de animais imunizados com o antígeno alvo e conferem a sensibilidade ao teste (HORNBECK, 1991). O imunoensaio convencional de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) têm elevada reprodutibilidade e possibilidade para a quantificação simultânea de um grande número de ensaios. Esse método tem sido amplamente utilizado para detectar a presença de bactérias, vírus e proteínas (CHUNGLOK et al., 2011; ZHU et al., 2013). No entanto, o limite de detecção de ELISA convencional para cepas de *E. coli* é de 10^5 a 10^7 UFC mL⁻¹, o que torna o método inadequado quando a dose infecciosa é menor que 100 células (SHEN et al., 2014).

Nos últimos anos, com surgimento da nanotecnologia, novos horizontes e perspectivas têm sido exploradas para avançar sobre os limites de detecção de patógenos (ZHOU et al., 2012). Diferentes formas, tamanhos e composições de nanopartículas têm sido utilizadas para a detecção de diversos microrganismos (NAJAFI et al., 2014; SUNG et al., 2013; YANG et al., 2007). Além disso, um dos

focos centrais no uso das nanopartículas é o aumento da amplificação do sinal de detecção. Um exemplo, é a utilização de nanopartículas magnéticas que têm sido utilizadas para melhorar o limite de detecção de ELISA convencional (SHEN et al., 2014; WANG et al., 2012).

A produção de uma nova ferramenta de diagnóstico para detecção de ETEC por meio de nanopartículas magnéticas associadas a anticorpos policlonais específicos contra o fator de adesão EtpA, foi desenvolvido na presente pesquisa.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma nova ferramenta de diagnóstico para detecção da bactéria *E. coli* enterotoxigênica.

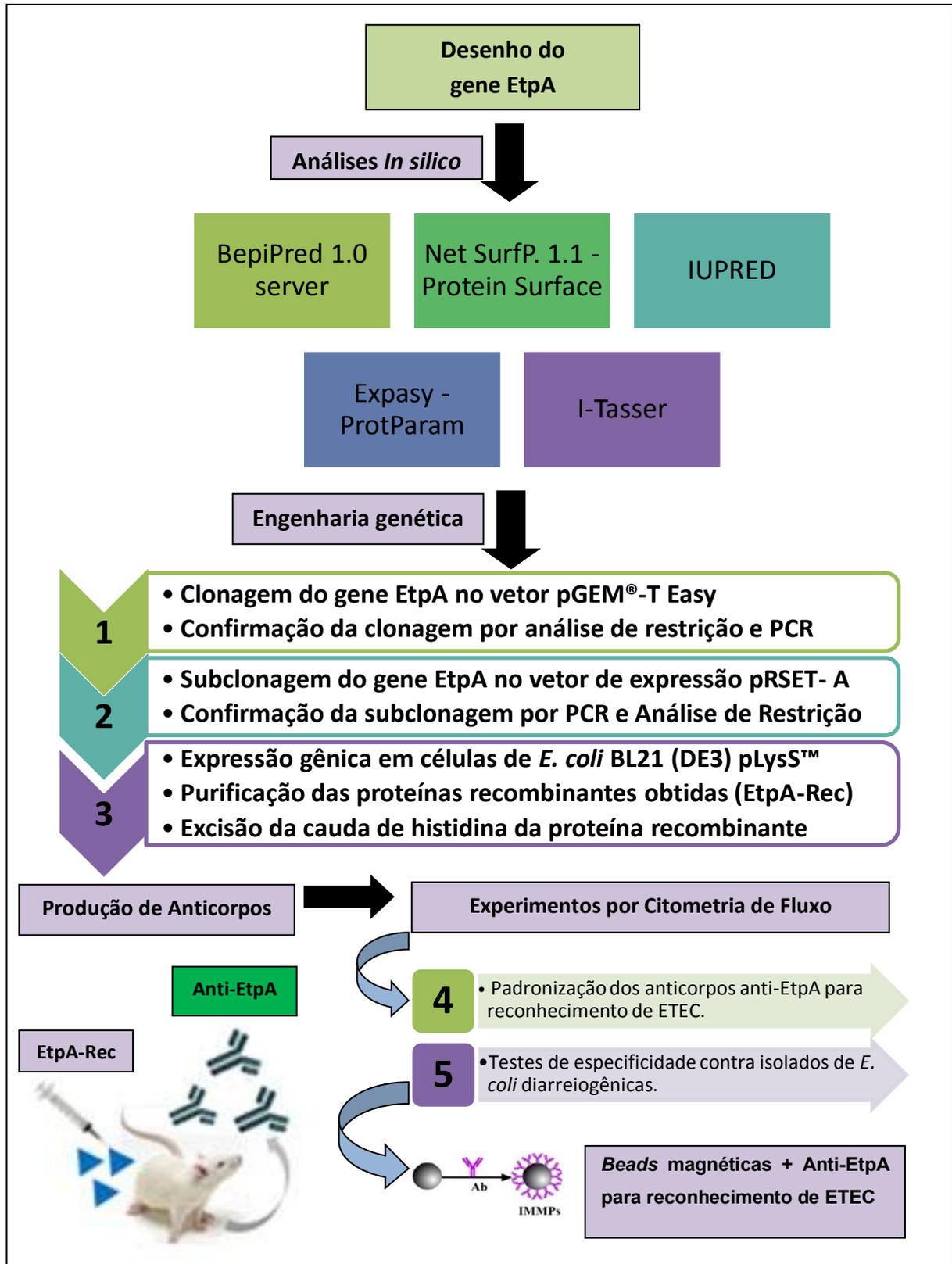
3.2 Objetivos específicos

- Determinar a melhor sequência antigênica da proteína quimérica EtpA por ensaios de predição *in silico*
- Avaliar a produção de anticorpos policlonais anti-EtpA em camundongos estimulados com a proteína recombinante EtpA de ETEC.
- Avaliar a sensibilidade e especificidade da técnica de detecção de ETEC, utilizando nanopartículas magnéticas associadas aos anticorpos anti-EtpA.

4 METODOLOGIA

4.1 Fluxograma das atividades desenvolvidas

O esquema abaixo ilustra as principais atividades realizadas no presente trabalho



4.2 Desenho da sequência de EtpA e análises genéticas *in silico*

A sequência do gene correspondente à proteína EtpA foi adquirida na base de dados do *genbank* (número de registro: AAX13509.2 - ncbi.nih.org). O desenho da proteína recombinante foi realizado em estrutura de quimera e na sua extremidade foi inserida uma sequência de restrição para a enzima enterokinase e uma cauda de histidina (6XHis). Por meio de análises *in silico* foram escolhidas três regiões da proteína nativa que apresentaram maior imunogenicidade. O programa utilizado para prever as regiões imunogênicas foi o *BepiPred 1.0 Server*. Também foram realizadas as análises *in silico* de predição da acessibilidade à superfície proteica utilizando o programa NetSurfP (ver.1.1); predição da desordem proteica por meio do programa IUPRED.enzim.hu e a predição do peso molecular pelo programa ExPASy-ProtParam. A estrutura da proteína EtpA nativa foi visualizada no programa I-TASSER que também corroborou para o desenho da quimera. Após as análises genéticas *in silico*, a sequência recombinante foi enviada para empresa IDT (Integrated DNA Technologies) para realizar a síntese química da sequência gênica.

4.3 Linhagens de micro-organismos utilizados

- *Escherichia coli* TOP10™ (Invitrogen) genótipo: F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*. Esta linhagem possibilitou que o DNA correspondente à EtpA, presente nos vetores de clonagem e expressão, fossem manipulados e multiplicados por meio da transformação e clonagem dessas bactérias.

- *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS™ (Life Technologies) genótipo: F- *ompT* *hsdSB* (*r_B*⁻, *m_B*) *galdcmrne131* (DE3) pLysS (Cam^R). Esta linhagem foi utilizada para expressão da proteína recombinante EtpA.

- *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). As linhagens de ETEC que foram utilizadas no desenvolvimento da pesquisa, pertencem ao banco de amostras do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ).

4.4 Meios de cultivo para bactérias

- Meio LB (Luria-Bertani) Ágar: peptona bacteriológica 10g; extrato de levedura 5g; NaCl 10g; Agar bacteriológico 10,5g; H₂O destilada q.s.p. 1L, pH 7.5

(ajustado com NaOH). Este meio de cultivo foi utilizado para o crescimento das colônias bacterianas após os eventos de clonagem e subclonagem.

- Meio LB (Luria-Bertani) Líquido: peptona bacteriológica 10g; extrato de levedura 5g; NaCl 10g; H₂O destilada q.s.p. 1L, pH 7.5 (ajustado com NaOH). Este meio de cultivo foi utilizado para crescimento das linhagens de *E. coli* e também para a expressão da proteína recombinante.

- Meio SOC Líquido. Composição do meio: Bacto-triptona 2,0 %; extrato de levedura 0,5 %; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM; estoque de magnésio 1 mL; estoque de glicose 1 mL. Este meio foi utilizado na transformação bacteriana por eletroporação para recuperação das células após o pulso elétrico.

4.5 Estratégias de Clonagem

Após a síntese química da sequência gênica EtpA foi realizada a inserção de dATP (2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato) nas extremidades do gene seguindo a metodologia proposta pelo manual Cloning-Quick Instructions (Empresa IDT). Essa inserção foi necessária para a realização da clonagem do gene no vetor pGEM®-T Easy (Promega) (Figura 7). O vetor pGEM®-T Easy apresenta um tamanho de 3015 pares de bases, gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, origem de replicação funcional em *E. coli*, um gene *lacZα* (e seu promotor) para a enzima β-galactosidase, e uma região do fago f1.

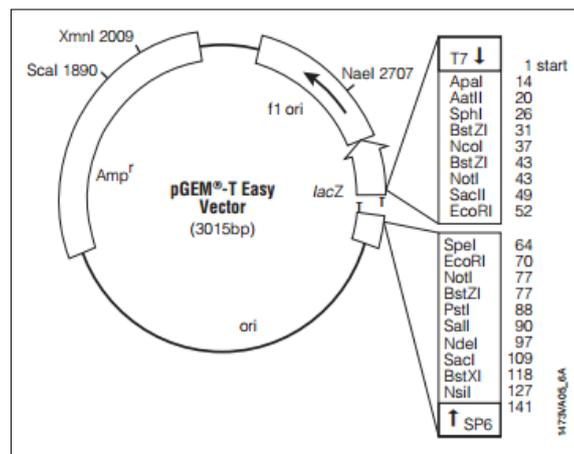


Figura 7. Mapa e sequência de pontos de referência do vetor pGEM®-T Easy (Promega) utilizado para clonagem do gene EtpA.

O fragmento gênico correspondente à proteína EtpA foi clonada no vetor pGEM®-T Easy com a utilização da enzima T4 DNA ligase e seu tampão (2X). A ligação ocorreu por meio do pareamento das adeninas 3' terminais do gene com as

terminas 5' terminais do vetor linearizado. A relação vetor/inserto utilizado na clonagem foi de 1:3 respectivamente, e a reação ocorreu em um volume final de 20 μ L. Após a clonagem, o sistema de ligação foi precipitado com 1/10 V de acetato de amônia 7,5M e 2,5 V de etanol 100% gelado.

Em seguida, foi realizada a transformação do sistema de ligação em células de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Foi adicionado 1,5 μ L do sistema de ligação precipitado em 50 μ L de células eletrocompetentes. As células foram submetidas a pulso elétrico de 1,8kV (200 Ω) em eletroporador (Mod. Eletroporator 2510 Eppendorf) com o objetivo de permitir a entrada do vetor recombinante na bactéria. Posteriormente as células foram inoculadas em 1 mL de meio SOC e o conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL. Esse microtubo foi incubado a 37° sob agitação (150 rpm) por 1 hora. Em seguida a suspensão bacteriana foi semeada nos volumes de 50, 100 e 150 μ L em 3 placas contendo meio LB sólido e 200 μ g/mL de ampicilina. As placas por sua vez, foram incubadas a 37°C durante 18 horas. Devido à presença do antibiótico ampicilina, foi possível fazer a seleção das bactérias transformadas.

4.5.1 Confirmação da construção do vetor de clonagem por PCR e análise de restrição

Após o crescimento dos transformantes, foram coletadas 10 colônias aleatoriamente. Em seguida, estas colônias foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 μ g/mL de ampicilina para a extração do DNA plasmidial recombinante. Após 16 horas de crescimento, foi realizado a Mini-prep utilizando o *kit*: "QIAprep Spin Miniprep Kit" de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN). Em seguida a etapa de extração do DNA plasmidial, foi realizada uma corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1X (40mM Tris, 40 mM ácido bórico e 0,5M EDTA) para a confirmação do produto de extração.

A confirmação da construção do vetor de clonagem foi feita por PCR e análise de restrição. O gene EtpA foi amplificado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando-se a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) e os iniciadores R-EtpA e F-EtpA previamente sintetizados (Tabela 1). Foram inseridos nas extremidades dos oligonucleotídeos R-EtpA e F-EtpA as sequências de corte

correspondentes às enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI* respectivamente, para realizar posteriormente a clonagem direcional do gene ao vetor de expressão.

Tabela 1. Sequencia nucleotídica dos iniciadores R-EtpA e F-EtpA

Iniciadores	Sequência	Sítio de restrição
R-EtpA	5` - TCTAGAGAATTCTTATGCTGATCCTGCAGCA - 3`	<i>EcoRI</i>
F-EtpA	5` - GGATCCGATGATGACGATAAG - 3`	<i>BamHI</i>

A reação de amplificação foi elaborada em um volume total de 25 µl em termociclador *Mastercycler® personal* (Eppendorf). Foram utilizados aproximadamente 20 ng de DNA, 1 U (unidade) de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™), tampão da enzima *Taq* 1X; 0,25 mM de uma mistura de dNTPs (2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfatos), 1 mM de MgCl₂, 5 pmol de cada iniciador e água deionizada esterilizada que completasse o volume de 25 µL. O programa utilizado para amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/5 minutos; seguidos de 35 ciclos (ciclo = 94°C/1 minuto; 60°C/40 segundos; 72°C/1,5 minutos); e um ciclo de extensão final a 72°C/5 minutos. O *amplicon* foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação.

A correta construção do vetor de clonagem também foi confirmada por uma digestão analítica utilizando as endonucleases de restrição *BamHI* e *EcoRI* conforme descrito na tabela 2. A confirmação da liberação da sequencia codificante de EtpA foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (0,5µg/ml) e visualizado em luz ultravioleta.

Tabela 2. Sistema utilizado para digerir o vetor pGEM-T Easy com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*.

Reagentes	Volume (µL)
H ₂ O	15,25
Tampão (10X)	2,5
BSA	0,25
<i>EcoRI</i> (20 U/µL)	1,0
<i>BamHI</i> (10 U/µL)	1,0
Vetor	5
Total	25

4.6 Construção do vetor de expressão pRSET- EtpA

O vetor utilizado para expressar a proteína EtpA na bactéria *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS™, foi o vetor de expressão pRSET-A (Invitrogen™) (Figura 8). Este vetor possui um tamanho de 2.9 kb, gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, uma região de origem de replicação para vetores tipo pUC, uma região do fago f1 e o forte promotor T7 que regula a expressão do gene heterólogo.

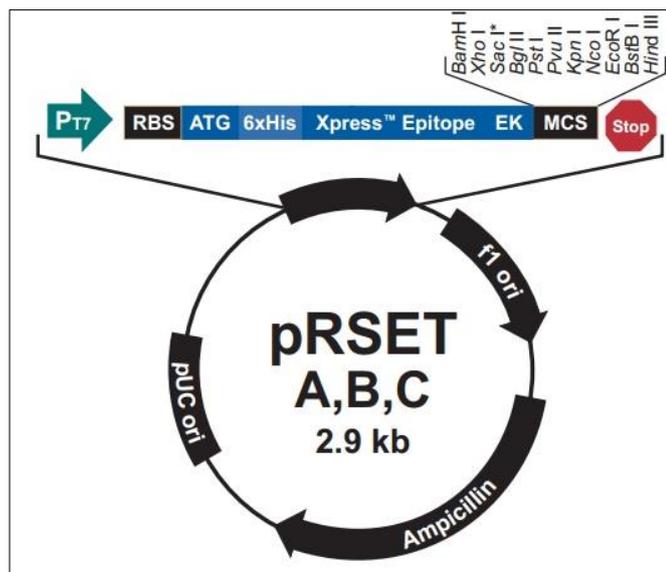


Figura 8. Mapa do vetor de expressão pRSET A,B,C. Este vetor foi utilizado para a expressão da proteína recombinante EtpA de ETEC.

A construção do vetor de expressão se iniciou com a retirada do inserto EtpA do vetor de clonagem pGEM-T Easy e finalizou com ligação do mesmo ao vetor de expressão pRSET-A. A primeira etapa da construção foi feita por uma dupla digestão enzimática em ambos os vetores com as mesmas endonucleases de restrição. Os vetores pGEM-T Easy e pRSET-A foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Eco*RI (New England Biolabs). O sistema de digestão foi incubado em estufa a 37 °C durante 2 horas, sendo utilizado 1 U/μg de cada enzima e aproximadamente 100ng de DNA. Em seguida procedeu-se uma análise qualitativa dos produtos das digestões por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta (UV). A segunda etapa consistiu do processo de purificação em gel de agarose dos insertos liberados e do vetor de expressão pRSET-A. O procedimento de purificação foi realizado utilizando o *kit* comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit Protocol*” seguindo as

recomendações do fabricante (QIAGEN). Este processo foi necessário para a realização da subclonagem dos genes no vetor de expressão pRSET-A.

4.6.1 Subclonagem do gene EtpA no vetor de expressão pRSET-A

A subclonagem ocorreu por meio da ligação do gene purificado EtpA ao vetor de expressão pRSET-A linear. Foram utilizados os seguintes reagentes nas determinadas concentrações: enzima T4 DNA ligase (400 U/uL), tampão da enzima (10X); vetor pRSET linearizado (500 ng/uL); inserto EtpA (150 ng/uL) e água deionizada estéril. O sistema de ligação foi elaborado em um volume final de 20 uL. A reação foi incubada por 18 horas a 16 °C obedecendo às especificações do fabricante da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs). Após a reação de ligação, foi realizado o processo de precipitação do sistema com 1/10 V de acetato de amônio 7,5M e 2,5 V de etanol 100% gelado. A mistura foi incubada por 4 horas e após procedeu-se a centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 70% gelado. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco em temperatura ambiente. O *pellet* seco foi dissolvido em 10 µL de água deionizada estéril e estocado a 4 °C.

4.7 Confirmação da construção do vetor de expressão pRSET-EtpA

Depois do evento de subclonagem, foi realizada a transformação do plasmídeo recombinante (cassete de expressão) em células de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen). Os eventos de transformação bacteriana seguiram a mesma metodologia supracitada para o vetor de clonagem. Após a transformação, foi selecionado aleatoriamente das placas oito colônias para a realização da extração do DNA plasmidial. Estas colônias foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina. Após 16 horas de crescimento, as culturas foram centrifugadas e a extração do DNA plasmidial foi realizada com o *kit*: “QIAprep Spin Miniprep Kit” de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN). A construção do vetor de expressão foi confirmada por três metodologias diferentes que incluíram análise de restrição, PCR e sequenciamento.

Inicialmente o DNA plasmidial extraído foi digerido com as endonucleases *Bam*HI e *Eco*RI. No sistema de digestão foi pré-estabelecido uma concentração de 1 Unidade/ μ L de cada enzima e aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial. A reação foi incubada em estufa a 37 °C por 2 horas. A análise do resultado foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1%, sob luz ultravioleta.

Na reação de PCR, os iniciadores R-EtpA e F-EtpA foram utilizados para amplificar o DNA plasmidial extraído das oito colônias. As reações foram elaboradas em um volume final de 25 μ L e incubadas em termociclador *Mastercycler® personal* (Eppendorf). O programa para as amplificações constituiu-se de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/5 minutos; seguido de 35 ciclos (94°C/35 s, 60°C/40 s, 72°C/90 s); e um ciclo de extensão final a 72°C/5 minutos. Para a análise da presença do produto da PCR correspondente ao gene de interesse, procedeu-se uma corrida eletroforética em gel de agarose 1%.

A terceira e última metodologia empregada para a confirmação da construção foi o sequenciamento do vetor pRSET-EtpA e também dos *amplicons* gerados pela PCR. O iniciador T7 *sense* foi usado para o sequenciamento do vetor e os iniciadores R-EtpA e F-EtpA foram usados para o sequenciamento dos *amplicons*. As reações foram elaboradas com o *Kit Big Dye Terminator 3.1* (Life Technologies) e sequenciadas no equipamento ABI 3130 *Genetic Analyzer* 96 poços (Applied Biosystems). Os fragmentos obtidos no sequenciamento foram comparados com a sequência original do gene EtpA por meio do programa BLASTn (ncbi.nih.org).

4.8 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS™

As bactérias *Escherichia coli* da linhagem BL21 (DE3) pLysS™ foram preparadas para se tornar eletrocompetentes e receber o cassete de expressão resultante da subclonagem. Uma colônia do estoque dessa linhagem de *E. coli* foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 3 mL de meio LB líquido. Esse tubo foi incubado em agitador a 37°C por 16 horas. Em seguida, o pré-inóculo foi transferido para um Erlenmeyer de 1L contendo 500 mL de meio LB líquido e 34 mg/mL do antibiótico cloranfenicol (as cepas de BL21 (DE3) pLysS™ apresentam resistência ao antibiótico cloranfenicol). Após a transferência, o inóculo foi levado ao agitador à temperatura de 37°C até atingir 0,6 de transmitância (λ 600) medido em

espectrofotômetro. O frasco contendo a cultura com a D.O desejada foi resfriado em gelo por 1 hora e seu volume foi distribuído em tubos de 50 mL. O conteúdo de cada tubo foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e em seguida ressuspensão gentilmente com 10 mL de glicerol 10% gelado e estéril. As etapas de centrifugação e lavagens dos *pellets* foram repetidas seis vezes. Na última lavagem, o *pellet* foi ressuspensão em 1 mL de glicerol 10% gelado, aliquotado em volume de 50 µL, congelados imediatamente e estocados em *freezer* – 80°C, tornando assim as células eletrocompetentes.

4.9 Transformação de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS™ por eletroporação e expressão proteica

A transformação foi realizada com a adição de 1 µL do cassete de expressão recombinante em 50 µL de células eletrocompetentes. A cubeta de eletroporação e as células misturadas com o DNA recombinante foram previamente resfriadas em gelo e em seguida submetidas a um pulso elétrico de 1,9 kV (200 Ω) no Eletroporador 2510 (Eppendorf). Posteriormente as células foram inoculadas em 1 mL de meio SOC e o conteúdo foi transferido para um microtubo de 2,0 mL. O microtubo foi incubado a 37° sob agitação (150 rpm) por 1 hora para a recuperação das células recém transformadas. Os volumes de 100 e 150 µL das células foram semeados em duas placas contendo meio LB sólido com 200 µg/mL de ampicilina e 34 mg/mL de cloranfenicol. As placas por sua vez, foram incubadas a 37°C durante 16 horas.

A expressão proteica foi realizada com cinco colônias de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS™ que cresceram após o evento de transformação com o cassete de expressão. Estas colônias foram escolhidas aleatoriamente das placas e pré-inoculadas separadamente em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio LB líquido com 100 µg/mL de ampicilina e 34 mg/mL de cloranfenicol. Os tubos foram incubados em agitador a 37°C durante 16 horas. Em seguida, houve a transferência dos pré-inóculos para um frasco Erlenmeyer de 2 L contendo 1L de meio LB líquido e os antibióticos ampicilina (100 µg/mL) e cloranfenicol (34 mg/mL). Após a transferência, o inóculo foi levado novamente ao agitador na mesma temperatura até atingir uma transmitância de λ600 de 0,6 medido em espectrofotômetro. Nesse

momento, foi acrescido na cultura bacteriana 1 mM de IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside). Esse reagente é um análogo sintético de lactose altamente estável. Sua função é inativar o repressor *lac* e induzir a síntese de beta-galactosidase, uma enzima que promove a utilização de lactose. O IPTG é utilizado para induzir a expressão de genes clonados em vetores que possui o controle do *operon lac*, como por exemplo, o vetor pRSET-A. A indução da expressão com IPTG foi mantida por 4 horas e depois a cultura foi centrifugada à 4000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* bacteriano formado foi armazenado em *freezer* – 20 °C para o posterior processo de sonicação.

4.10 Purificação da proteína recombinante EtpA

Para proceder a purificação da proteína recombinante, inicialmente o *pellet* das bactérias induzidas foi lisado por sonicação. A sonicação foi realizada com a adição de 2,5 mL do tampão MCAC-O (20 mM de Tris pH = 7,9; 0,5 M de NaCl; 10% de glicerol e 1 mM de PMSF) nos tubos de 50 mL que continham os *pellets* bacterianos. Em seguida, o conteúdo sonicado foi centrifugado a 12.000 rpm a 4 °C e o sobrenadante nativo formado foi utilizado para a purificação da proteína recombinante.

A proteína recombinante foi purificada em coluna Ni-NTA-Agarose de 5 mL de acordo com as recomendações do fabricante (QIAGEN). Essa coluna é uma matriz de cromatografia de afinidade para a purificação de proteínas recombinantes que possuem uma cauda de Histidina. A coluna de purificação é constituída de níquel ligado ao ácido nitrilotriacético, associada a uma matriz de agarose a 6% que tem afinidade à histidina. A eluição da proteína EtpA foi realizada por diferença de concentração de imidazol adicionado na coluna Ni-NTA-Agarose de acordo com o fabricante (QIAGEN). Após a eluição, foi feita a confirmação da purificação em gel SDS-PAGE e *western blot*.

4.11 Análise da proteína recombinante em gel SDS-PAGE e Imunoblot

A análise do resultado da expressão e da purificação da proteína recombinante EtpA foi feita por meio de eletroforese em gel desnaturante de poli(acrilamida) (SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989) e por

Western blot seguindo o protocolo de imunodeteção cromogênica Western Breeze (QIAGEN).

Foram preparados quatro géis de poliacrilamida para a corrida eletroforética. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida Tris-glicina 1X pH 8,3 por 2 horas em voltagem de 110V. Foi utilizado como marcador de massa molecular o marcador PageRuler™ Unstained-Protein ladder (Fermentas Life Sciences). As amostras que apresentavam a proteína recombinante foram ressuspensas em tampão de amostra de eletroforese 1X (200 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% azul de bromofenol p/v; 4% SDS v/v; β-mercaptoetanol 4%; 20% glicerol v/v), incubadas a 95 °C por 5,0 minutos e aplicadas nos géis. Após a corrida, três géis foram corados por 18 horas com a solução de Azul Brilhante de *Coomassie* G250 para a deteção da expressão e da purificação proteica. Em seguida, os géis foram descorados com solução descorante (100mL ácido acético; 450 mL de água; 450 mL de etanol 100%) para as análises e fotografia.

O outro gel foi submetido à técnica de *western blot* revelado com um anticorpo monoclonal anti-histidina seguindo as instruções do fabricante (QIAGEN). A última etapa consistiu da fotografia do gel para as análises dos resultados.

4.12 Excisão da cauda de histidina

Antes de proceder as imunizações dos camundongos com a proteína recombinante EtpA, foi necessário retirar a cauda de histidina presente na proteína expressa. Esse experimento foi realizado para excluir a possibilidade de geração de resposta imune contra a cauda após as imunizações. Para a produção de anticorpos específicos apenas contra a proteína EtpA recombinante, esta etapa exclui possíveis reações cruzadas no reconhecimento de *E. coli*. A excisão foi feita pela ação da enzima enterokinase (NEB).

A proteína purificada (5 mL) foi concentrada na coluna *Centriprep Centrifugal Filter devices* YM-3 (Millipore) por 50 minutos a 3.000 g. Após a centrifugação, o volume recuperado foi ressuspenso no tampão da enzima enterokinase (20 mM de Tris-HCl pH = 8,0; 50 mM NaCl; 2 mM de CaCl₂) e então foi adicionado a enzima. O sistema de digestão da cauda foi incubado por 20 horas a 23 °C. Em seguida, a amostra foi adicionada à resina de níquel por 10 minutos. A cauda excisada foi ligada ao níquel e o sobrenadante contendo apenas a proteína EtpA purificada foi

eluída. Também foi retirada a enzima enterokinase do sistema por meio da resina *Tripsin Inibidor Agarose* de acordo com as instruções do fabricante (SIGMA-ALDRICH). A confirmação da excisão da cauda de histidina foi feita em gel SDS-PAGE.

4.13 Imunização dos camundongos contra a proteína EtpA recombinante

Foram utilizados para a produção dos anticorpos anti-EtpA, dez camundongos da linhagem Balb/C. A solicitação de autorização para uso de animais em experimentação, foi submetida ao CEUA/INPA de acordo com a Lei Arouca 11.794/2008. O parecer consubstanciado sobre o protocolo da presente pesquisa foi aprovado sob o número 019/2014 conforme o anexo A.

Cinco camundongos dessa linhagem foram utilizados para o primeiro teste de imunização. Os animais foram capturados e imobilizados por um curto período de tempo. Em seguida, foram contidos pela parte posterior da cabeça e seguros na palma da mão. Quatro animais foram imunizados com a proteína recombinante purificada EtpA e um animal serviu de controle sendo imunizado apenas com adjuvante de Freund completo. Após as imunizações, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com 90 mg.Kg⁻¹ de Quetamina (Dopalen, Vetbrands) em associação com 16 mg.Kg⁻¹ de Xilazina (Anasedan, Vetbrands) para a coleta do sangue por meio de venopunção da veia caudal. Todas as imunizações foram realizadas na região intraperitoneal. Foram imunizados 50µg da proteína recombinante purificada EtpA somadas (volume/volume) com o adjuvante de Freund completo. Quinze dias depois, os camundongos foram novamente imunizados (reforço) com a proteína recombinante e com adjuvante de Freund incompleto (volume/volume). No total foram realizadas três imunizações com um intervalo de 15 dias cada, totalizando 45 dias. Ao final dos 45 dias, os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia para a coleta do sangue total. Os soros obtidos foram analisados pelo método de ELISA que será descrito no próximo tópico.

Após a confirmação da produção dos anticorpos policlonais, foi realizado uma segunda etapa de imunização com os outros 5 animais restantes. O desenho experimental seguiu a mesma metodologia supracitada, afim de se obter maiores concentrações de anticorpos anti-EtpA.

4.14 Confirmação da produção de anti-EtpA por ELISA “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays”

Os soros obtidos após a coleta foram utilizados nos testes de reatividade. O teste de ELISA foi realizado para avaliar a resposta dos camundongos contra a proteína recombinante imunizada. Esse teste detecta a ligação de um antígeno ao seu anticorpo específico. Quando os anticorpos reconhecem o antígeno, ocorre uma ligação específica e forma o complexo antígeno-anticorpo. A fase subsequente é a detecção do anticorpo primário por um anticorpo secundário acoplado a uma enzima. Um substrato cromogênico para a enzima produz uma mudança de cor visível, o que indica a presença do antígeno (GAN e PATEL, 2013).

O antígeno EtpA recombinante e purificado em fase fluida foi sensibilizado na placa de microtitulação de 96 poços durante 18 horas e incubada a 37 °C. Em seguida, foi realizado o bloqueio da placa com BSA 3% e PBS 1X por duas horas. Após o bloqueio foi feita lavagens da placa com PBS 1X. A próxima etapa foi a adição dos soros dos animais imunizados que possuíam os anticorpos policlonais produzidos. Nessa fase, a placa foi incubada por uma hora a 37 °C. Em seguida, a placa foi novamente lavada com PBS 1X e então foi adicionado o anticorpo secundário biotinizado anti-camundongo (KPL) diluído 1/5000. Após uma hora de incubação e lavagens, houve a adição de Streptavidina peroxidase (1/5000). A última etapa consistiu da revelação com a solução cromogênica TMB 0,1 mg/mL e peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,04%) diluído em tampão fosfato-citrato. A leitura colorimétrica após a revelação foi feita em 450 nm em leitor de ELISA (BIORAD).

4.15 Purificação e quantificação dos anticorpos anti-EtpA obtidos após as imunizações em Balb/C

A purificação dos soros dos camundongos imunizados foi feita em coluna de proteína A - *high salt*. Foi misturado 1/10 do volume da solução de NaCl 3.3 mM e 1 M de borato de sódio pH 8,9 aos soros. Em seguida, os soros foram adicionados na coluna de proteína A - *high salt*. A próxima etapa consistiu da lavagem da coluna com a solução 3 M de NaCl e 50 mM de Borato de Sódio pH 8,9. Foi feita dez lavagens seguidas da coluna com a adição de 1 mL por vez da solução supracitada. A coluna foi novamente lavada por dez vezes, porém, com a diminuição da concentração do Borato de sódio para 10 mM. Os anticorpos foram eluídos da

coluna pela passagem do tampão Tris-glicina 0,1 M pH 3,0 e então foram estocados a temperatura de – 20 °C.

A quantificação dos anticorpos purificados seguiu o método de Bradford. Para realizar a quantificação, fez-se necessário a construção de uma curva padrão de BSA. A construção da curva foi realizada pelas variações de concentração de BSA 1% variando de 0 a 32. As leituras das absorbâncias em espectrofotômetro foram feitas em filtro de 595 nm. As diferentes concentrações de BSA gerou uma equação da reta que foi utilizada para fazer a quantificação dos anticorpos.

4.16 Dot Blot com peptídeos sintéticos da proteína recombinante EtpA

Foram sintetizados pela empresa Peptidase 2.0 dez peptídeos baseados na sequência da proteína quimérica EtpA conforme a tabela 3.

Tabela 3. Sequências dos peptídeos sintéticos baseado na proteína recombinante EtpA.

Sequências dos peptídeos Epítoto 1	Sequências dos peptídeos - Epítoto 2	Sequência do peptídeo Epítoto 3:
1.1-VGNAKATGSVEGEKSPRRGV 1.2-EGEKSPRRGVRAMALSLLSG 1.3-RAMALSLLSGMMIMAH PAMS 1.4-MMIMAH PAMSANLPTGGQIV 1.5-NLPTGGQIVAGSGSIQTPSG 1.6-AGSGSIQTPSGNQMNHQNS 1.7-QMNIHQNSQNMVANWNSFDI	2.1 - ITATGGQGGGEVYVGGGWQG 2.2 - GQGGGEVYVGGGWQKDSNI	VSKTETTQSPPH TQFAPTAA

Esses peptídeos foram utilizados para o determinar quais regiões da proteína recombinante foram imunogênicas. O mapeamento dos epítotos foi realizado pela técnica de dot blot utilizando os peptídeos sintetizados contra um *pool* de soros dos animais imunizados com a proteína recombinante EtpA.

A membrana de nitrocelulose (MN) foi recortada e disposta num aparelho de blot (Minifoldtm SRC-96) de 96 poços onde adicionou-se, em cada poço, 50 µL de uma solução de PBS 1X. As membranas contendo os peptídeos sintéticos foram lavadas três vezes com tampão PBS 1X pH 7.4 e então saturadas em solução contendo 1 mL de tampão de bloqueio (coating buffer, Sigma) e 0,5 g de sacarose, em 20 mL de tampão PBS-Tween 0,1%, overnight. Em seguida, a membrana foi lavada com o tampão PBS-Tween 0,1% e incubada com o *pool* de soros dos camundongos, diluído na mesma solução bloqueio, durante 1h e 30 min sob

agitação constante. Após a incubação, a membrana foi lavada com PBS-Tween 0,01% por 10 min. A revelação foi realizada com o anticorpo secundário ligado à fosfatase alcalina.

4.17 Imunofenotipagem de bactérias por citometria de fluxo

4.17.1 Teste de padronização dos anticorpos anti-EtpA para reconhecimento de bactérias ETEC.

Para a detecção da proteína EtpA encontrada nos flagelos das bactérias ETEC nativa foi utilizado os anticorpos anti-EtpA purificados (concentração de 1µg/µL). O reconhecimento específico dos anticorpos anti-EtpA contra a proteína alvo de ETEC foi avaliado por citometria de fluxo, a fim de se obter valores numéricos precisos desse reconhecimento por meio da análise de fluorescência de anticorpos anti-IgG mouse (2°) conjugados ao fluorocromo Alexa flúor 488 na concentração de 1µL/200 µL de PBS-Wash 1X.

Os experimentos foram realizados por citometria de fluxo no equipamento BD FACSCanto™ II (BD). Inicialmente duas amostras clínicas de ETEC padrão mais um controle negativo para EtpA (EPEC) pertencentes ao banco de amostras da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Amazônia) foram utilizadas no teste. As amostras foram crescidas em meio LB líquido a 37 °C por 16 horas e após foram centrifugadas a 14.000 rpm em temperatura ambiente. O *pellet* formado foi lavado três vezes com PBS-Wash filtrado (PBS 1X; 5% de Albumina; 1% de Azida pH 7,2) e ressuspensos com 300 µL da mesma solução. Foram adicionados aos *pellets* os anticorpos policlonais purificados (diluído 1/50 em PBS-Wash) e posteriormente as amostras foram incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as amostras foram lavadas três vezes por centrifugação (5000 rpm) com PBS-Wash. A etapa seguinte foi da adição do anticorpo secundário Anti-IgG Mouse (Alexa Fluor 488) diluído 1/200 em PBS-Wash. Após a adição do anticorpo secundário as amostras foram incubadas por 45 minutos, lavadas novamente com PBS-Wash por três vezes por centrifugação e lidas no citometro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD). O experimento supracitado foi realizado três vezes, a fim de analisar a reprodutibilidade e gerar confiabilidade nos resultados obtidos.

4.17.2 - Padronização do experimento de especificidade dos anticorpos anti-EtpA contra isolados de *E. coli* diarreio gênicas.

Após a padronização dos títulos dos anticorpos primários e secundários, foi avaliado por citometria de fluxo a especificidade do anticorpo anti-EtpA contra as cepas de ETEC. Deste modo, os anticorpos anti-EtpA produzidos foram analisados contra diferentes cepas de *E. coli* diarreio gênicas.

Inicialmente as amostras de *E. coli* diarreio gênicas EHEC; EAEC; EIEC; EPEC; DAEC e ETEC pertencentes ao banco de amostras da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Amazônia) foram crescidas separadamente em tubos de ensaio contendo meio LB líquido. Após o crescimento das cepas (37 °C por 16 horas), as bactérias foram centrifugadas a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Os *pellets* formados foram lavados três vezes com PBS-Wash filtrado (PBS 1X; 5% de Albumina; 1% de Azida pH 7,2) e ressuspensos com 300 µL da mesma solução. Foram adicionados aos *pellets* os anticorpos policlonais purificados anti-EtpA (diluído 1/50 em PBS-Wash) e posteriormente as amostras foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente. Após o período de incubação, as amostras foram novamente lavadas por três vezes por centrifugação (5000 rpm) com PBS-Wash. Em seguida foram adicionados aos tubos o anticorpo secundário Anti-IgG Mouse (Alexa Fluor 488) diluído 1/200. Em seguida as amostras foram incubadas por 45 minutos, lavadas novamente com PBS-Wash por três vezes por centrifugação e levadas ao citometro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD) para as leituras e análises.

O experimento supracitado também foi repetido três vezes, a fim de analisar a reprodutibilidade e gerar confiabilidade nos resultados obtidos.

4.17.3 Avaliação da detecção da proteína EtpA entre diferentes isolados de ETEC por citometria de fluxo.

Com o objetivo de avaliar o grau de reconhecimento dos anticorpos anti-EtpA entre diferentes isolados de ETEC, foram contabilizados por citometria de fluxo as porcentagens de reconhecimento da proteína EtpA entre 11 isolados diferentes de ETEC. Esses isolados foram escolhidos aleatoriamente do banco de amostras clínicas de *E. coli* da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz Amazônia). A busca pelas

bactérias classificadas como ETEC foram feitas por PCR utilizando um par de iniciadores dirigidos contra a região conservada de EtpA.

O gene EtpA foi amplificado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando-se a enzima Taq DNA Polimerase (Invitrogen™) e os *primers* previamente sintetizados (R-EtpA 5'-CTAGAGAATTCTTATGCTGATCCTGCAGCA-3' e F-EtpA 5'-GGATCCGATGATGACGATAAG-3').

A reação de amplificação foi elaborada em um volume total de 25 µl em termociclador *Mastercycler® personal* (Eppendorf). Foram utilizados aproximadamente 20 ng de DNA de cada amostra, 1 U (unidade) de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), tampão da enzima Taq 1X; 0,25 mM de uma mistura de dNTPs (2'-desoxinucleotídeos 5'-trifosfatos), 1 mM de MgCl₂, 5 pmol de cada iniciador e água deionizada esterilizada que completasse o volume de 25 µL. O programa utilizado para amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C/5 minutos; seguidos de 35 ciclos (ciclo = 94°C/1 minuto; 60°C/40 segundos; 72°C/1,5 minutos); e um ciclo de extensão final a 72°C/5 minutos. O *amplicon* foi visualizado por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta em equipamento de fotodocumentação.

Os diferentes isolados confirmados como ETEC foram crescidos em meio LB a 37°C por 16 horas e após foi realizado o experimento de imunofenotipagem conforme descrito no item 4.17.1.

4.18 Acoplamento dos anticorpos anti-EtpA às nanopartículas magnéticas (Beads).

As nanopartículas magnéticas foram inicialmente ativadas para o acoplamento dos anticorpos produzidos. Foram pesado 20 mg de *beads* e após foi adicionado 1 mL de água ultrapura. Em seguida a mistura foi agitada por vórtex e submetido à base magnética para a decantação das *beads*. O sobrenadante foi retirado e então foi adicionado o tampão de acoplamento (10 mM potássio fosfato + 0,15 M NaCl pH 5,5). Após a adição do tampão, a solução foi agitada no vórtex. Em seguida, a solução foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente sem agitação, e o sobrenadante foi retirado após o processo de decantação. Esse procedimento foi repetido 2 vezes.

O acoplamento dos anticorpos às *beads* foi realizado após a retirada do sobrenadante. Foi adicionado 1 µg/µL dos anticorpos anti-EtpA purificados e sem a cauda de histidina na solução de *beads* previamente ativadas. Após a adição dos anticorpos a solução foi homogeneizada por agitação em vórtex durante 3 minutos. Foi adicionado à solução um volume de 400 µL de EDAC [Cloroeto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] a 570 µg/mL. Em seguida a solução foi incubada durante 24 horas sob agitação lenta.

Após o tempo de incubação, a solução foi colocada na base magnética e o sobrenadante foi retirado e armazenado a 4 °C. As *beads* com os anticorpos anti-EtpA acoplados foram então lavadas 2 vezes com 1 mL do tampão de lavagem (10 mM tris base + 0,15 M NaCl + 0,1% BSA + 1 mM EDTA+ 0,1% Azida - pH 7.5). Após as lavagens foi realizado o bloqueio da solução contendo os anticorpos adicionados às *beads*. A solução foi incubada por uma 1 hora em 500 µL de tampão de bloqueio (1 M de glicina pH 8.0). Após o período de bloqueio, a solução foi novamente lavada por 2 vezes com tampão de lavagem e após foi ressuspensa com o tampão de acoplamento. Após esses procedimentos, às *beads* acopladas foram armazenadas a 4 °C.

4.19 Ensaios de separação imunomagnético por *Beads* associadas ao anticorpo Anti-EtpA.

4.19.1 Padronização da marcação do material genético das bactérias ETEC com o corante Brometo de Etídeo para detecção em citometria de fluxo.

Para avaliar a detecção das bactérias ETEC utilizando *beads* magnéticas associadas ao anticorpo anti-EtpA, foi realizado um ensaio de padronização com o corante Brometo de Etídio – EtBr (FL3- Percp) para marcar o material genético das bactérias. Inicialmente as bactérias cresceram por 16 horas em meio LB líquido e após foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. Os *pellets* formados foram resuspensores em 50 µL de brometo diluído (8 µL de Brometo em 5 mL de PBS 1X). Em seguida, a solução foi incubada por 30 minutos no escuro. Após o período de incubação, os *pellets* foram lavados duas vezes por centrifugação utilizando PBS 1X para retirar o excesso de brometo. A marcação das bactérias foi analisada por meio do deslocamento da fluorescência no citometro de fluxo.

Depois dos ensaios de padronização das concentrações do corante brometo de etídeo, anti-EtpA e anti-IgG Mouse Alexa fluor 488, foi realizado o teste de captura com *beads* magnéticas com dois isolados diferentes de ETEC confirmados anteriormente por PCR e citometria.

4.19.2. Detecção de bactérias ETEC por *Beads* magnéticas associadas ao anticorpo Anti-EtpA.

As amostras clínicas de ETEC pertencentes ao banco de amostras do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ) nomeadas como 144 e 178 foram utilizadas nos ensaios para a detecção por *beads*. As culturas puras de bactérias foram cultivadas em caldo nutriente a 37 °C durante 16 horas antes da sua utilização. Após o crescimento, as cepas foram marcadas com o corante brometo de etídeo conforme descrito no item anterior. Em seguida, as bactérias marcadas foram ressuspensores em 450 µL de PBS 1X e então foi adicionado 2 µL das *beads* magnéticas associadas ao anticorpo anti-EtpA. Após a adição das *beads*, a solução foi incubada em agitação lenta por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas com PBS 1 X utilizando a rack magnética. Primeiro adicionou-se 1 mL de PBS 1X na solução que continha as *beads* mais bactérias marcadas com FL3- Percp; após o

tubo foi condicionado na rack magnética e então as *beads* foram puxadas pela força magnética para a lateral do tubo, após o sobrenadante foi retirado. Esse procedimento de lavagem foi realizado 10 vezes com as amostras ETEC e também com os tubos identificados como controles da reação.

Após as lavagens o anticorpo secundário anti-IgG mouse conjugados ao fluorocromo Alexa flúor 488 na concentração de 1 μ L/200 μ L foi adicionado nos tubos. As amostras foram incubadas durante 30 minutos e depois foi realizado novamente a etapa de 10 lavagens com PBS 1X utilizando a magna rack. Depois das últimas lavagens, as amostras foram ressuspensas em 200 μ L de PBS e transferidas para tubos de ensaio para serem lidas no citometro de fluxo BD FACSCanto™ II (BD).

Os controles da reação foram divididos em 6 tubos denominados de C1: apenas *beads* magnéticas; C2: *beads* bloqueadas + anticorpos secundários; C3: *beads* + anticorpo primário (anti-EtpA) + anticorpo secundário; C4: Bactéria marcada com brometo; C5: somente a cepa bacteriana 144; C6: somente a cepa bacteriana 178. Esse experimento foi repetido por três vezes, a fim de analisar a reprodutibilidade e gerar confiabilidade nos resultados obtidos.

Também foi realizado o mesmo experimento supracitado para avaliar a especificidade de captura das *beads* acopladas com anti-EtpA contra diferentes isolados de *E. coli* diarreiogênicas (DAEC; EPEC; EIEC; EAEC e ETEC).

4.20 Análises de citometria e confecção dos gráficos

Os gráficos obtidos de todos os resultados submetidos ao citometro de fluxo foram analisados pela intensidade de fluorescência dos anticorpos utilizados nos experimentos e também das bactérias marcadas com EtBr (FL3- Percp). As análises foram feitas pelos programas FACS DIVA e posteriormente reanalisadas pelo programa Flow-Jo versão 10.0. A confecção dos gráficos após análises de citometria de fluxo foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises *in silico* de EtpA

A sequência da proteína EtpA nativa obtida no *genbank* (AAX13509.2 - ncbi.nih.org) e modelada no programa I-TASSER gerou uma estrutura tridimensional conforme a figura 9. De acordo com Zhang (2008), o programa I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) é uma abordagem hierárquica de modelagem de estrutura de proteínas baseada na estrutura secundária aprimoradas pelo perfil de alinhamentos. Segundo o autor, o programa de bioinformática gerou as melhores previsões de estrutura 3D entre todos os servidores automatizados.

A quimera foi desenhada com três epítomos conforme a predição da acessibilidade para a superfície proteica, regiões imunogênicas e análises da estrutura tridimensional. As regiões imunogênicas analisadas no programa BepiPred 1.0 foi de acordo com a localização de epítomos lineares de células B usando uma combinação de um modelo de Markov oculto e um método de propensão em escala. De acordo com Pushpakumara e colaboradores (2016), este modelo destina-se principalmente às propriedades dos epítomos, tais como hidrofobicidade, flexibilidade, acessibilidade, voltas, exposição, superfície, polaridade e propensão antigênica. Os epítomos escolhidos após as análises *in silico* estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4. Sequências dos três epítomos escolhidos para a síntese do gene EtpA.

Epítomos	Sequência de Aminoácidos
1	VGNAKATGSVEGEKSPRRGVRAMALSLLSGMMIMAH PAMSANLP TGGQIVAGSGSIQTPSGNQMN IHQNSQNMVANWNSFDI
2	ITATGGQGGGEVYVGGGWQ GKDSNI
3	VSKTETTQSP PHTQFAPTAAGSA

Os aminoácidos escolhidos para os epítomos 1, 2 e 3 da proteína nativa foram nos intervalos do 25° ao 107°; 350° ao 374° e do 470° ao 492°, respectivamente. Após a escolha dos epítomos alvo, foi realizado a síntese química das sequencias do gene conforme demonstrado no anexo B.

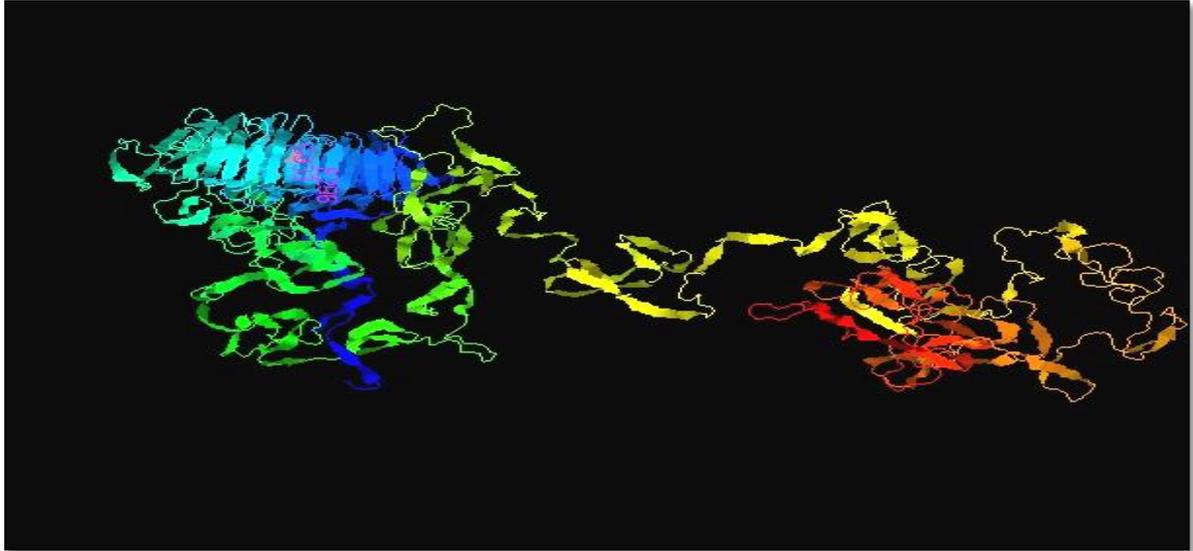


Figura 9. Modelagem tridimensional da proteína nativa EtpA para análises e desenho da quimera (I-Tasser).

5.2 Análise da construção do vetor de clonagem por PCR e digestão enzimática

As hospedeiras de *E. coli* TOP10 foram transformadas com o vetor de clonagem pGEM T- Easy ligado com a sequência EtpA recombinante. Diversos transformantes foram obtidos em meio de cultivo LB sólido. Após a extração do DNA plasmidial dos transformantes, os plasmídeos foram utilizados para a confirmação da construção do vetor de clonagem via PCR e análise de restrição. A confirmação da clonagem da sequência do gene sintético de EtpA feita por PCR com os *primers* R-EtpA e F-EtpA pode ser observada na figura 10. O tamanho do *amplicon* gerado foi de 500 pb como o esperado.

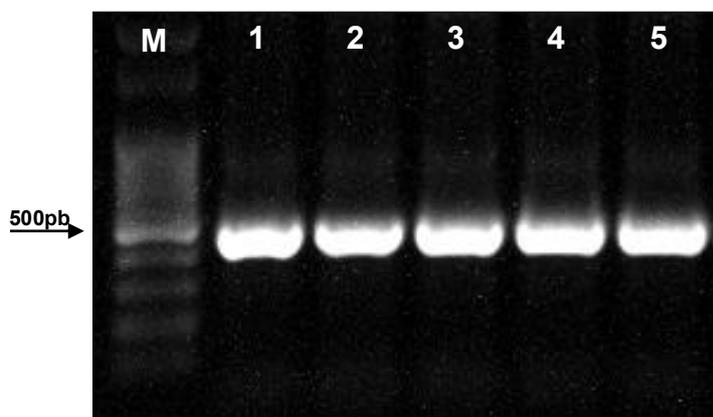


Figura 10. Análise dos produtos da PCR das amostras 1; 2; 3; 4; 5 que foram amplificadas no vetor pGEM T-EtpA. M - Marcador de massa molecular de 500 pb (Ludwigbiotec).

A proteína EtpA nativa possui um tamanho de 177 kDa (FLECKENSTEIN et al., 2006). Normalmente proteínas de membrana e proteínas com pesos moleculares acima de 60 kDa se tornam mais difíceis de expressar, principalmente pela possível formação de corpos de inclusão e o problema da toxicidade proteica. Quando um gene estranho é introduzido em *E. coli*, o controle tempo/espço de sua expressão é perdido. O polipeptídeo recombinante pode diferir da fonte original em termos de pH, osmolaridade, potencial redutor, cofatores e mecanismos de dobragem. O problema da toxicidade da proteína pode surgir quando a proteína recombinante de elevado peso molecular desempenha uma função desnecessária e prejudicial na célula hospedeira. Esta função interfere com a proliferação normal e a homeostase do microrganismo, e o resultado visível é a taxa de crescimento mais lenta, a baixa densidade celular final e a morte (DONG et al., 1995; ROSANO e CECCARELLI, 2014).

Desta forma, nós resolvemos optar pela construção de uma proteína recombinante quimérica com um peso molecular bem menor quando comparada à proteína nativa. No resultado acima podemos observar o *amplicon* de 500pb que corresponde apenas a quimera construída com as regiões mais imunogênicas anteriormente analisadas *in silico*.

Após a reação da PCR, também foi realizada uma digestão analítica para a confirmação do inserto no vetor de clonagem. Foi utilizada para a montagem do sistema de digestão a amostra número 1. O plasmídeo foi duplamente digerido com as endonucleases *EcoRI* e *BamHI* conforme mostrado na figura 11.

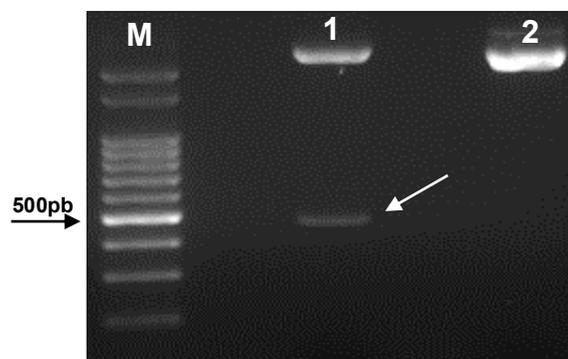


Figura 11. 1) Análise do perfil de restrição do plasmídeo recombinante com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. 2) Vetor não digerido. M - Marcador de massa molecular 1 Kb (Ludwigbiotec).

Podemos observar na figura 11 a liberação do inserto (indicado pela flecha) que apresenta peso molecular de aproximadamente 500 pares de bases conforme o esperado. Também visualizamos o vetor linear pGEMT-Easy não digerido com 3015 pb. Após a confirmação da construção do vetor pGEM T-EtpA foi realizado a construção do vetor de expressão.

5.3 Análise da construção do vetor de expressão pRSET-EtpA

Na montagem do vetor de expressão o plasmídeo pGEM T-EtpA e o vetor de expressão pRSET-A foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *BamHI*. Após a digestão, o gene liberado e o vetor de expressão linearizado foram purificados do gel de agarose. O gene purificado pelo *kit QIAquick Gel Extraction Kit Protocol* foi visualizado analiticamente em gel de agarose 1% conforme mostrado na figura 12.

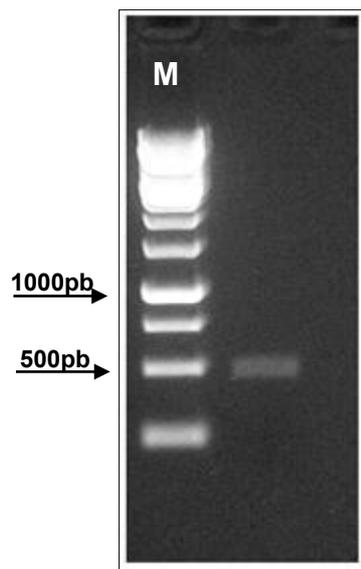


Figura 12. Perfil eletroforético do gene EtpA purificado. M - marcador de massa molecular 1 Kb (Ludwigbiotec).

O gene EtpA purificado foi subclonado ao vetor de expressão pRSET-A pela ação da enzima T4 DNA ligase. O sistema de ligação foi precipitado e as hospedeiras da linhagem TOP10 foram transformadas por eletroporação. Após a transformação, seis colônias foram selecionadas aleatoriamente do meio de cultivo contendo ampicilina. Procedeu-se então a extração do DNA plasmidial e a

confirmação da construção do cassete de expressão via PCR, análise de restrição e sequenciamento. O resultado da construção do plasmídeo recombinante pRSET-EtpA por digestão com as endonucleases *EcoRI* e *BamHI*, foi avaliado em gel de agarose. O fragmento correspondente ao gene de estudo foi liberado da amostra 2 e 5 e apresentou um tamanho de 500 pb. O vetor de expressão apresentou um tamanho de aproximadamente 2.900 pares de bases, assim como representado na figura 13.

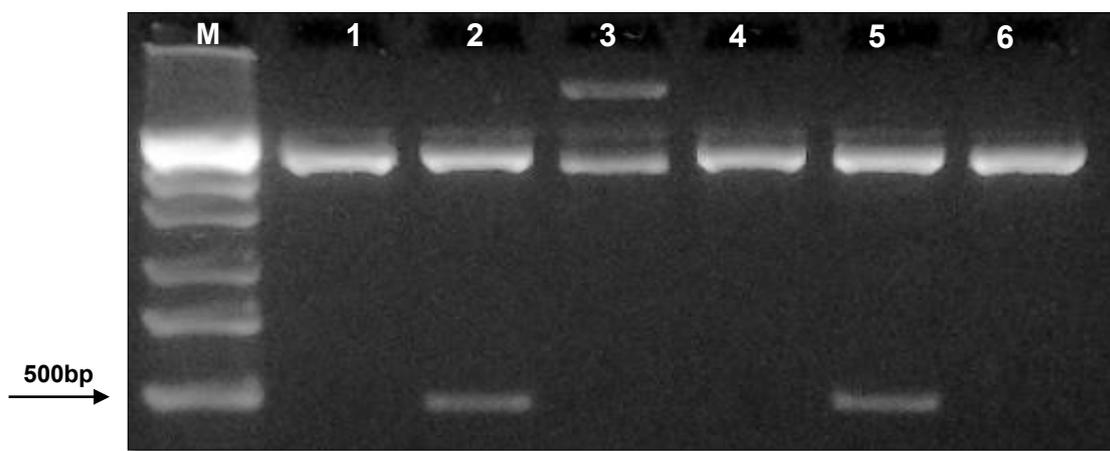


Figura 13. Perfil de Análise de restrição do cassete de expressão pRSET-Etpa. Amostras 2 e 5 confirmando a correta construção do vetor com o tamanho das bandas esperadas. M - Marcador de massa molecular 1Kb (Ludwigbiotec).

As amostras 2 e 5 foram utilizadas no sequenciamento. As sequencias de EtpA que estavam no vetor de expressão apresentaram 99% de similaridade com a sequencia depositada no banco de dados após as análises no programa BLASTn. Com esse resultado foi confirmada a correta construção do cassete de expressão.

5.4 Confirmação da expressão proteica por imunoblot

O imunoblot do *pellet* das proteínas insolúveis e do sobrenadante nativo que foram formados após a indução proteica seguido das sonicações é apresentado na figura 14. O resultado foi positivo na detecção da proteína recombinante expressa por meio do reconhecimento do anticorpo monoclonal anti-histidina à cauda de histidina que estava acoplado na proteína EtpA.

A cauda de purificação mais comum e utilizada em laboratórios em todo o mundo é a cauda de Poli-histidina ou His-tag. O pequeno tamanho, o custo

relativamente baixo e seu efeito mínimo ou nenhum na estrutura ou função da proteína alvo, fizeram da cauda de histidina um sucesso de utilização nos processos de detecção da expressão e purificação proteica (WOOD, 2014).

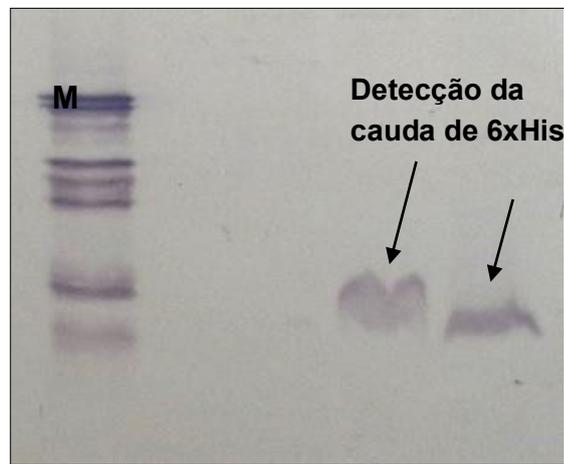


Figura 14. Imunoblot contra a cauda de histidina para a detecção da proteína EtpA expressa em *E. coli* BL21. M - Marcador de massa molecular preparado com diferentes proteínas (caseiro).

5.5 Expressão de pRSET-EtpA em BL21 e purificação proteica

A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS™ foi transformada com as amostras 2 e 5 para realizar a expressão de EtpA. Esta linhagem foi escolhida pois possui diversas vantagens para a expressão de genes heterólogos. Essas células são deficientes na protease Lon, que degrada muitas proteínas estranhas. Outro gene ausente do genoma de BL21 é o que codifica para a protease de membrana externa OmpT, cuja função é degradar proteínas extracelulares. Como essa linhagem não possui OmpT, a proteína recombinante expressa não pode ser clivada por esse mecanismo (GRODBERG e DUNN, 1988). Além disso, a perda plasmídica é impedida graças à mutação denominada hsdSB presente na linhagem parental (B834) que deu origem a BL21. Como resultado desta mutação, a metilação e degradação do DNA é interrompida (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

Quando o gene de interesse é clonado sob um promotor T7, a enzima T7 RNA polimerase deve ser fornecida. A popular linhagem BL21 (DE3) pLysS™ contém o gene da RNA polimerase T7 controlado pelo promotor lacUV5 no seu DNA cromossômico e o gene da lisozima T7 no plasmídeo pLysS. A RNA-polimerase T7 é expressa por adição de isopropil-1-tio-p-D-galactopiranosídeo (IPTG) que induz uma

expressão proteica de alto nível a partir de vetores de expressão que são acionados pelo promotor T7 (por exemplo, pRSET). A lisozima T7 suprime a atividade da RNA polimerase T7, que reduz a expressão da proteína a nível basal a partir do gene de interesse. Esse mecanismo é importante caso a proteína seja tóxica para as células bacterianas. A presença da lisozima T7 aumenta a tolerância dessas *E. coli* contra a toxicidade. O plasmídeo pLysS também contém um gene de resistência ao cloranfenicol e uma origem de replicação p15A que é compatível com os vetores pBR322 e plasmídeos derivados de pUC. Todas essas características fazem de BL21 (DE3) pLysS™ e os seus derivados as linhagens mais utilizadas para a expressão de proteínas heterólogas (MOFFATT e STUDIER, 1988; PAN e MALCON, 2000; (ROSANO e CECCARELLI, 2014).

A indução da expressão de pRSET-EtpA em *E. coli* BL21 (DE3) pLysS™ foi realizada pela adição do indutor IPTG e teve a duração de 4 horas. Após esse período as culturas foram centrifugadas e os *pellets* formados foram sonicados para proceder à purificação proteica. Após a sonicação, os sobrenadantes nativos formados foram purificados três vezes em coluna Ni-NTA-Agarose. A análise dos resultados da expressão e da purificação da proteína recombinante EtpA feita por SDS-PAGE estão representadas nas figuras 15 e 16. A Figura 15 mostra as sequencias das primeiras lavagens com MCAC - 0, MCAC - 20; MCAC - 40; MCAC - 60 e MCAC - 80 e as quatro primeiras eluições da proteína EtpA realizadas com 100 e 200 mM de Imidazol, respectivamente.

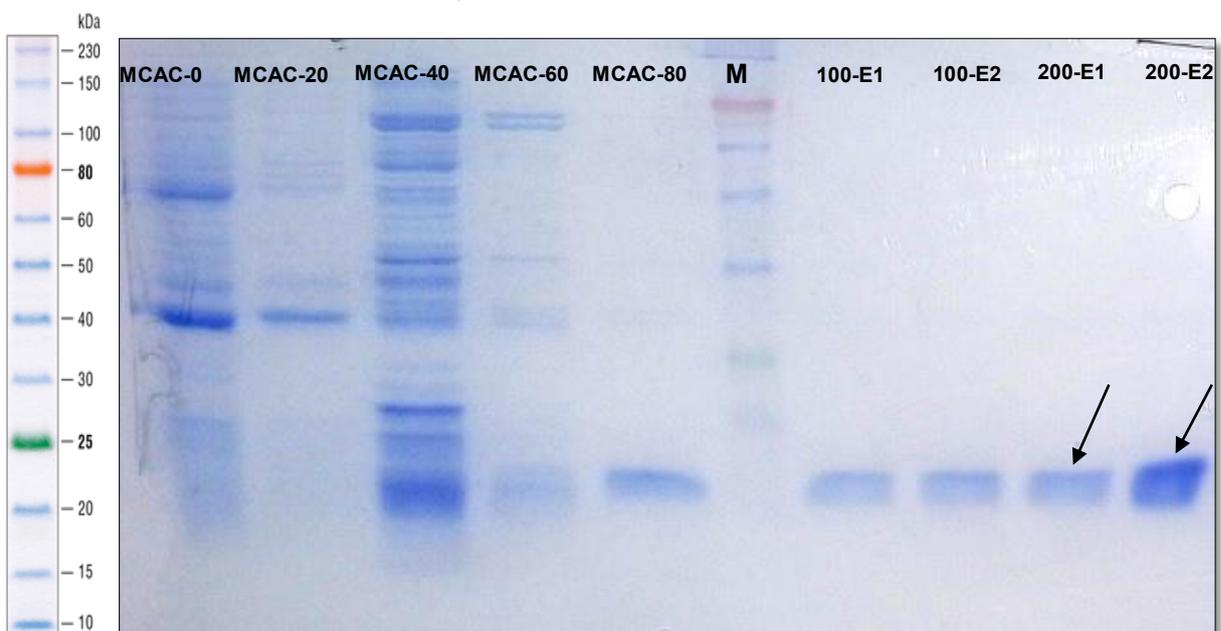


Figura 15. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE da proteína recombinante EtpA expressa pelos clones 2 e 5. Lavagens e primeiras eluições com diferentes concentrações de Imidazol. Setas indicam as bandas correspondentes à proteína expressa. M – Marcador de massa molecular (Color Plus Biolabs: 10-230 kDa).

A figura 16 mostra as eluições utilizando diferentes concentrações de Imidazol (de 300 até 700 mM). A eluição 300-E2 apresentou a maior concentração proteica (indicado pela seta).

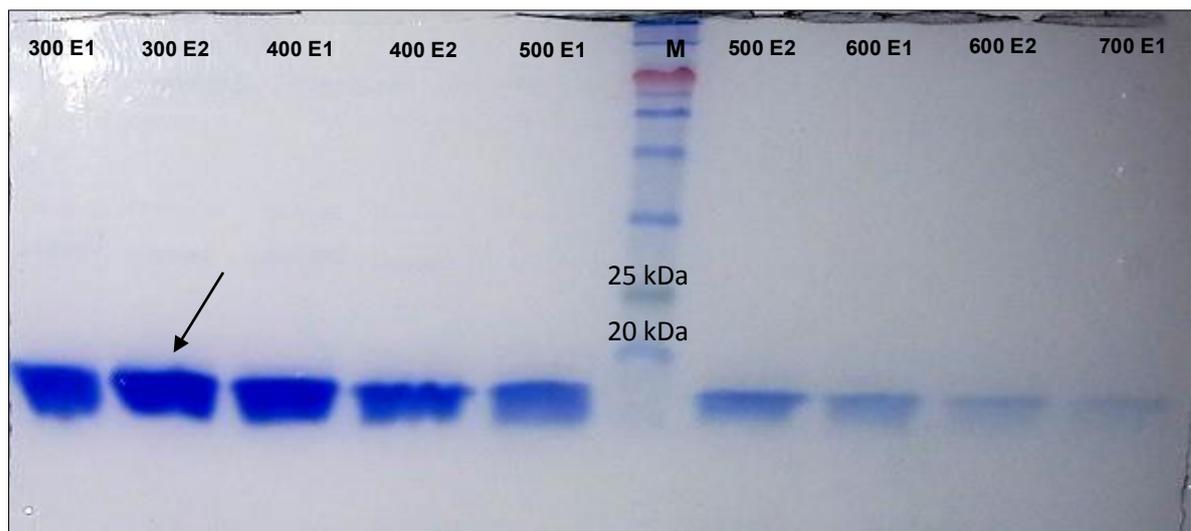


Figura 16. Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE das eluições da proteína EtpA purificada em coluna Ni-NTA-Agarose. M – Marcador de massa molecular (Color Plus Biolabs: 10-230 kDa).

A proteína recombinante EtpA purificada apresentou um tamanho de aproximadamente 16 kDa, resultado consistente com as análises *in silico* realizadas anteriormente.

5.6 Análise da excisão da cauda de histidina

Embora os marcadores de afinidade como a cauda de histidina sejam frequentemente utilizados para facilitar a expressão e purificação de proteínas recombinantes, cada marcador, seja grande ou pequeno, tem o potencial de interferir na estrutura e função da proteína recombinante na qual ele está fusionado. Por esta razão, são necessários métodos confiáveis para a remoção dessas caudas de afinidade e apenas algumas enzimas têm a especificidade requerida para agir neste propósito (WAUGH, 2011).

A enterokinase ou enteropeptidase é um heterodímero ligado por pontes de dissulfeto composto de cadeias "pesadas" e "leves" (com pesos moleculares aparentes de 110 e 35 kDa, respectivamente), que são extensivamente glicosiladas. Avanços recentes facilitaram a produção de uma cadeia leve recombinante no periplasma de *E. coli* (New England Biolabs). Essa protease específica catalisa a hidrólise das ligações peptídicas em proteínas e, ao contrário de outras quinases, não catalisa a transferência de grupos fosfato. A enterokinase exibe atividade semelhante à tripsina, clivando as proteínas após a lisina no sítio específico (Asp-Asp-Asp-Lys) (ANDERSON et al., 1977; LIEPNIEKS e LIGHT, 1979; WAUGH, 2011).

Desta forma, utilizamos a enzima enterokinase (NEB) para a clivagem da cauda de histidina que estava fusionada à proteína EtpA. A excisão da cauda de histidina pode ser observada na figura 17. Visualmente é possível notar que a banda proteica sem a cauda apresenta um menor peso molecular quando comparada com a banda que representa EtpA fusionada com His-tag.

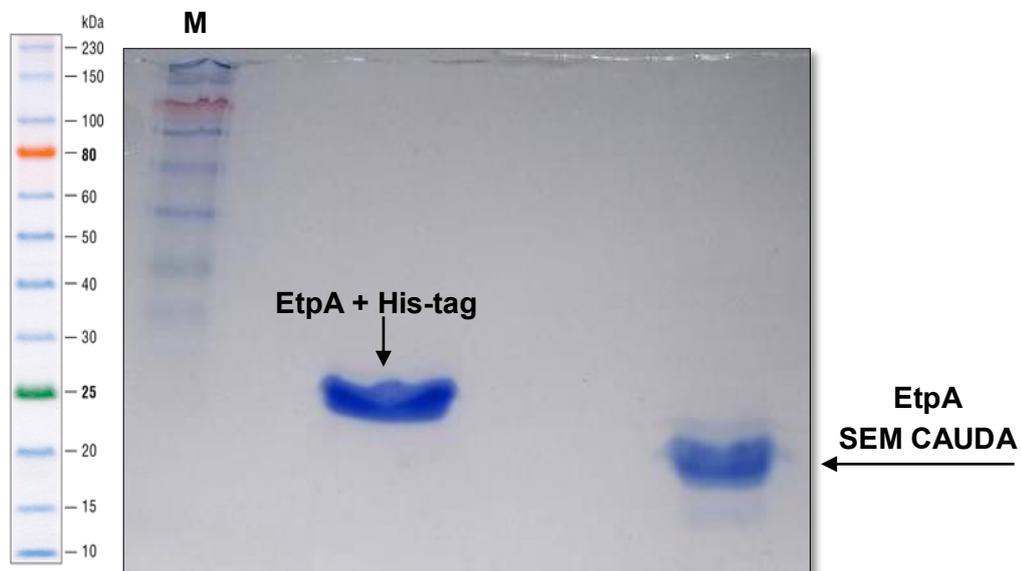


Figura 17. Perfil Eletroforético da excisão da cauda de histidina pela ação da enzima enterokinase. Seta mostrando as bandas proteicas com e sem cauda respectivamente. M – Marcador de massa molecular (Color Plus Biolabs: 10-230 kDa).

5.7 ELISA indireto com os anticorpos policlonais produzidos

Um teste de ELISA indireto foi realizado com os anticorpos policlonais anti-EtpA produzidos por quatro animais contra a proteína EtpA imobilizada na placa. Os resultados do teste com a imunização da proteína EtpA recombinante purificada e sem cauda de histidina estão representados na figura 18. O animal que melhor respondeu às imunizações foi o camundongo denominado como C4. Esse animal produziu anticorpos policlonais anti-EtpA que na leitura do teste de ELISA apresentou após a terceira imunização uma D.O de aproximadamente 0,7. O segundo animal que melhor respondeu às imunizações foi o camundongo C1 (D.O = 0,6). Um animal serviu de controle, sendo imunizado apenas com adjuvante de Freund completo. Esse camundongo está representado no gráfico pela linha preta. Os resultados do teste de ELISA indireto confirmam que após três imunizações seguindo intervalos de 15 dias em 15 dias, os camundongos respondem imunologicamente contra a proteína recombinante imunizada, produzindo assim anticorpos policlonais.

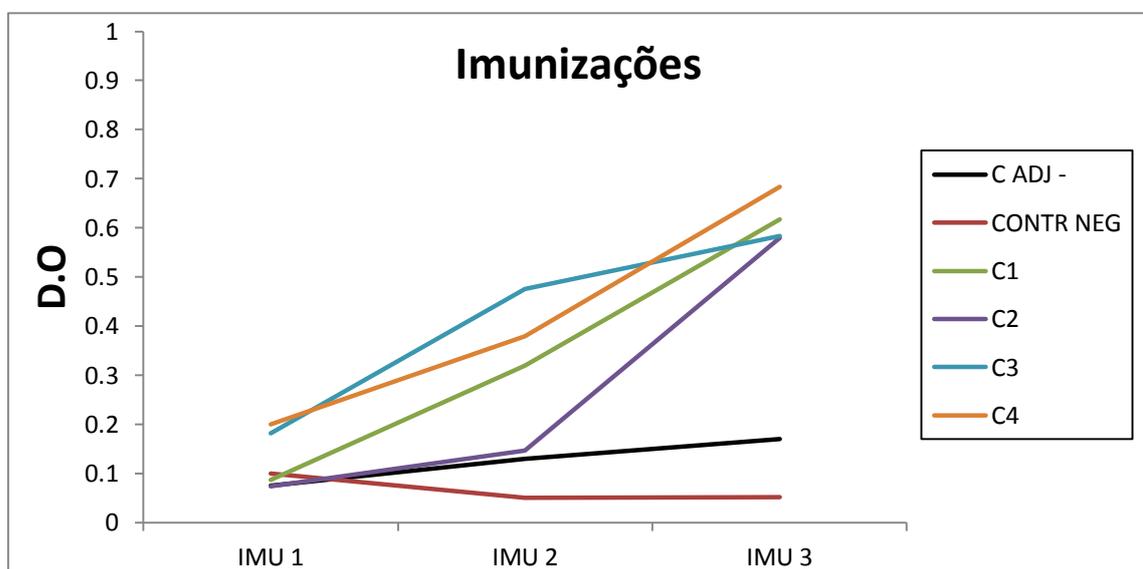


Figura 18. Gráfico representando os resultados do primeiro teste de ELISA indireto para os anticorpos policlonais produzidos contra a proteína EtpA. C1 à C4: animais imunizados com EtpA purificada. CADJ -: animal imunizado apenas com adjuvante.

5.8 Mapeamento de epítomos da proteína quimérica EtpA

Com o objetivo de determinar as regiões imunogênicas da proteína recombinante, realizamos o mapeamento de epítomos utilizando peptídeos sintéticos conforme descritos na tabela 3. Foi reativo ao *pool* de soros dos animais imunizados apenas o peptídeo 1.1, conforme demonstrado na figura 19.



Figura 19. Dot blot com peptídeos sintetizados a partir da sequência quimérica de EtpA. Circulo amarelo destaca a revelação do peptídeo número 1.1 do epítopo 1 contra o *pool* de soros dos camundongos imunizados. O quadro verde representa os controles positivos de 2 lisados bacterianos, e o dot apontado pela flecha representa a proteína EtpA-Recombinante.

Após as análises da sequência da proteína quimérica no programa BepiPred 1.0 Server, foi possível observar que a região correspondente ao peptídeo 1.1 apresenta uma alta probabilidade de ser reconhecido por células B (Figura 20). Porém, outras regiões também apresentaram alta probabilidade de serem reconhecidas segundo o programa como, por exemplo, a região C-terminal da proteína recombinante. Contudo, os resultados obtidos no dot blot indicam uma reatividade específica na porção N-terminal da proteína recombinante.

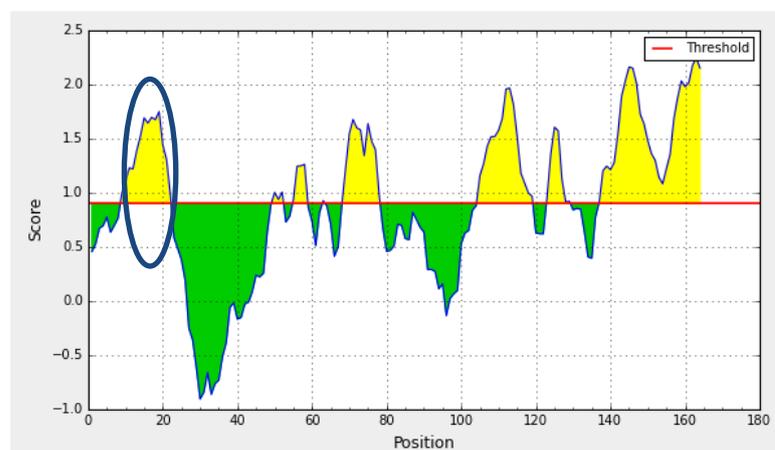


Figura 20. Perfil das regiões imunogênicas da proteína recombinante EtpA. Análise predita no programa BepiPred 1.0 Server.

5.9 Imunofenotipagem de bactérias por citometria de fluxo

Os resultados dos experimentos de imunofenotipagem com as amostras clínicas de ETEC e outras cepas de *E. coli* diarreio gênicas foram analisados por citometria de fluxo. As populações de bactérias foram analisadas por tamanho (FSC), granulosidade (SSC) e fluorescências emitidas por meio das marcações.

A citometria de fluxo permite análises multiparamétricas de características morfológicas das células, interações entre moléculas celulares e avaliação qualitativa e quantitativa da composição de bactérias diretamente do material analisado sem a necessidade do cultivo (JUZWA e CZACZYK, 2012). O uso de citometria de fluxo em microbiologia foi originalmente limitado à quantificação de células de culturas puras, uma vez que partículas inorgânicas podem interferir fortemente com as contagens bacterianas (CZECHOWSKA et al., 2008).

Uma das alternativas mais promissoras consiste na contagem de células por citometria de fluxo após a coloração do ácido nucleico ou marcação de anticorpos ou partículas proteicas usando fluorocromos que também são empregados nas contagens diretas de células na microscopia. A citometria de fluxo supera as duas principais desvantagens da microscopia por fluorescência, o viés do observador e o baixo rendimento da amostra. Deste modo, as análises por citometria aumenta a confiabilidade das estimativas de abundância celular, e reduz muito o tempo de processamento das amostras (HAMMES e EGLI, 2010; FROSSARD et al., 2016).

O equipamento de citometria avalia as células em suspensão e partículas que fluem por meio da câmara de fluxo. As células da suspensão são convertidas em corrente de fluido, e após são escaneadas pela interceptação do feixe de laser à medida que passam pelo ponto de observação. Os parâmetros medidos são a dispersão de luz do laser e a emissão de luz de fluorocromos (fluorescência) quando são excitados pelo laser. O citómetro de fluxo permite a medição simultânea da intensidade de emissão de fluorescência (proveniente de fluorocromos excitados marcando diretamente a estrutura celular específica ou conjugada com anticorpos) e a luz do laser quando é dispersa em cada evento (SHAPIRO, 2003; COMAS-RIU e RIUS, 2009; JUZWA e CZACZYK, 2012).

Deste modo, a utilização desta técnica no presente trabalho foi essencial para a validação da ferramenta desenvolvida.

5.9.1 Análise do Reconhecimento de EtpA por citometria de fluxo.

Para a detecção da proteína EtpA encontrada nos flagelos das bactérias ETEC foi utilizado os anticorpos anti-EtpA purificados (concentração de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$). O reconhecimento específico dos anticorpos anti-EtpA contra a proteína EtpA das bactérias ETEC foram avaliados por citometria de fluxo, a fim de se obter valores numéricos precisos desse reconhecimento por meio da análise de fluorescência de anticorpos anti-IgG mouse (2°) conjugados ao fluorocromo Alexa flúor 488 na concentração de $1\mu\text{L}/200\mu\text{L}$ de PBS 1X. O resultado deste teste pode ser observado na figura 21. Os resultados indicam que o anticorpo desenvolvido (anti-EtpA) foi capaz de reconhecer a proteína EtpA nativa que está presente nos flagelos das bactérias ETEC. Na figura 21 (A) é possível observar a gate que representa a população das bactérias que foram analisadas no citômetro. A figura 21 (D) demonstra um deslocamento dos eventos dentro da gate (quadrado rosa), resultantes do reconhecimento do anticorpo secundário ao anticorpo primário. Este mesmo deslocamento não é observado no gráfico B e C onde não foi adicionado os anticorpos anti-EtpA (controles da reação).

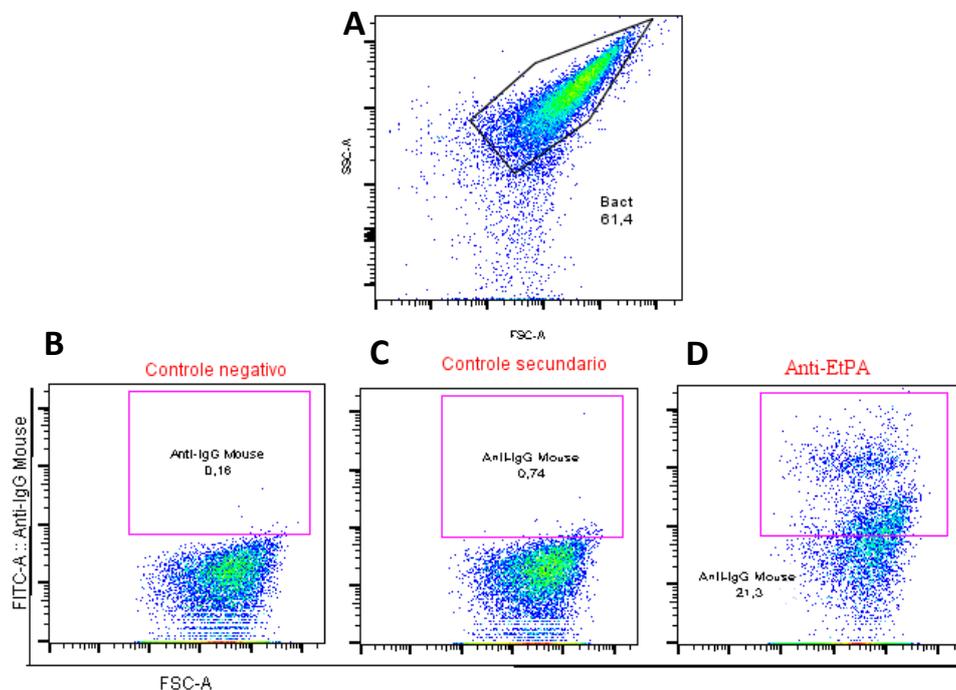


Figura 21. Análise do reconhecimento de EtpA por citometria de fluxo em amostras ETEC positiva confirmadas por PCR. (A) População das bactérias analisadas; (B) Controle negativo: bactérias sem marcação. (C) Controle secundário: Bactéria + Anti-IgG mouse Alexa flúor 488; (D) Bactéria + Anti-EtpA + Anti-IgG mouse Alexa flúor 488 (2°).

A adesina EtpA utilizada para a detecção das bactérias ETEC por meio de anticorpos policlonais acoplados a *beads* magnéticas foi escolhida como proteína alvo no desenvolvimento desse trabalho porque é uma proteína conservada dentro do patovar ETEC (LUO et al, 2015; KUMAR et al., 2016).

De acordo com Roy e colaboradores 2009, estudos recentes demonstraram que a patogênese de ETEC é consideravelmente mais complexa do que previamente apreciada, e envolve moléculas de virulência adicionais. Estas incluem a exoproteína EtpA.

Kansal e colaboradores (2012) demonstraram que as interações de ETEC com as células hospedeiras promovem alterações nítidas no transcriptoma de ETEC. Estas alterações são acompanhadas por uma modificação significativa da arquitetura destes organismos na interface patógeno-hospedeiro. Coletivamente, os dados obtidos pelos autores sugerem que as interações ETEC/hospedeiro são finamente orquestradas, com a implantação sequencial de múltiplas adesinas à medida que as bactérias se envolvem nas alças epiteliais culminando na liberação efetiva de suas toxinas.

No lúmen intestinal, as bactérias encontram glicoproteínas de mucina, incluindo MUC2 que é secretada por células de cálice dentro da mucosa. No cólon, a MUC2 forma uma barreira complexa e espessa entre a pesada carga de organismos comensais e o epitélio. A glicoproteína MUC2 localizada na região adjacente à superfície epitelial do cólon está fortemente empacotada e unida, excluindo de modo eficaz as bactérias. As cepas de ETEC colonizam preferencialmente o intestino delgado onde estes organismos conseguem de maneira efetiva entregar suas toxinas. Em contraste com a camada de mucina no cólon, a camada da glicoproteína MUC2 no intestino delgado é relativamente fina e ligeiramente ligada à superfície epitelial (JOHANSSON et al., 2008; BERGSTROM et al., 2010).

Os autores Kumar e colaboradores (2016) demonstraram que as bactérias ETEC podem estar equipadas para a adesão à glicoproteína MUC2. Os dados fornecidos sugerem que a colonização do intestino delgado mediada anteriormente por EtpA ocorre em parte por meio das interações desta adesina com MUC2 no lúmen intestinal. Além disso, verificou-se que molécula efetora principal de ETEC, a toxina termolábil (LT), pode aumentar as interações das bactérias com as células intestinais por meio da estimulação da produção de mucina MUC2 formadora de gel.

Alguns estudos mostraram que EtpA participa das interações mais complexas e dinâmicas entre ETEC e as mucosas gastrointestinais nas quais as glicoproteínas hospedeiras promovem a ligação bacteriana, ao mesmo tempo que limitam o engajamento epitelial necessário para a liberação eficaz das toxinas.

Knutton e colaboradores (1984) já haviam demonstrado que as bactérias ETEC interagem com o glicocálice na superfície apical dos enterócitos. Esta rica camada de glicoproteínas que revestem as microvilosidades do intestino delgado é formada por um certo número de mucinas transmembranares. A mucina mais abundante e melhor estudada é denominada de MUC3 (WEISS et al., 1996).

Roy e colaboradores (2009) já haviam demonstrado que a exoproteína EtpA também interage com a superfície das células epiteliais intestinais. Desta forma, os autores Kumar e colaboradores (2016) investigaram se esta adesina também poderia envolver a glicoproteína MUC3. Os autores incubaram a proteína EtpA com secções de intestino delgado de ratos. Após os experimentos, eles demonstraram que EtpA também se liga às vilosidades intestinais superficiais nos locais de expressão da glicoproteína MUC3. Esses resultados sugerem que a exoproteína EtpA pode engatar tanto nas mucinas segregadas formadoras de gel como nas moléculas transmembranares.

Esses dados fornecem uma visão adicional sobre a natureza das interações de ETEC com os epitélios intestinais e promove implicações potenciais para o uso da adesina EtpA como molécula alvo no diagnóstico de ETEC.

5.9.2 Teste de especificidade dos anticorpos anti-EtpA contra isolados de *E. coli* diarreio gênicas.

Após a padronização dos títulos de anticorpos primários e secundários, o reconhecimento dos anticorpos anti-EtpA contra diferentes cepas de *E. coli* diarreio gênicas foi avaliado por citometria de fluxo. Os resultados demonstrados na figura 22 indicam o reconhecimento dos anticorpos com maior porcentagem para o isolado classificado como ETEC (que possui o gene para a proteína EtpA), demonstrando assim a especificidade significativa dos anticorpos desenvolvidos.

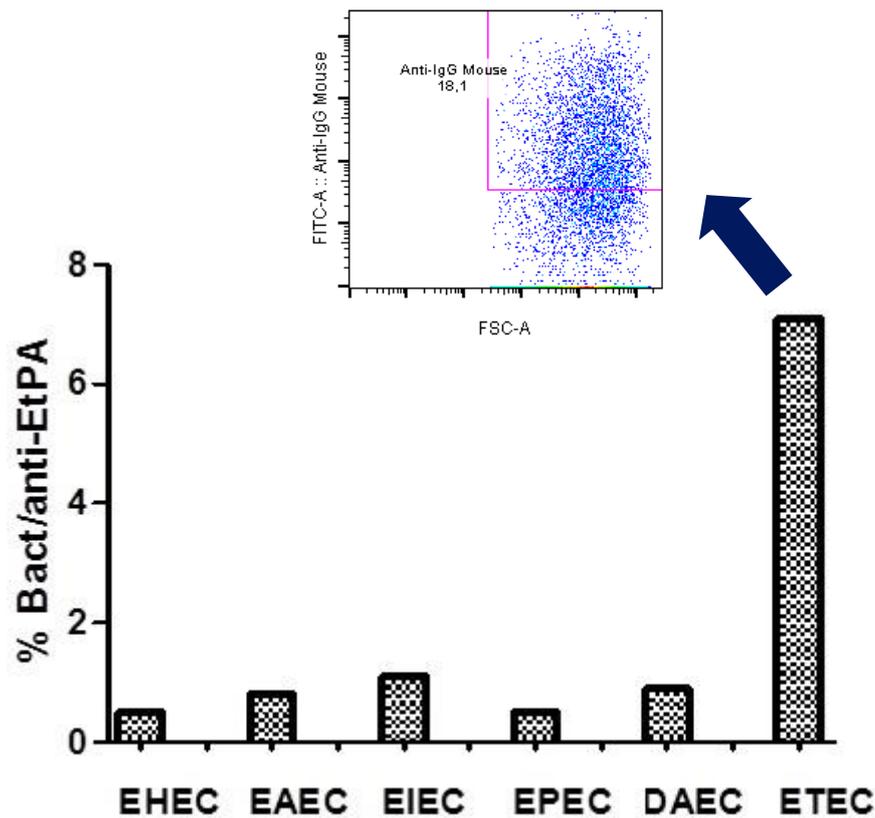


Figura 22. Avaliação da especificidade de anticorpos anti-EtpA contra diferentes cepas de *E. coli* diarreiogênicas. Foram analisados por citometria de fluxo, a porcentagem de bactérias reconhecidas por anticorpos anti-EtPA. EHEC (0.5%); EAEC (0,7%); EIEC (1,2%); EPEC (0.5%); DAEC (0,8%) e ETEC (7.2%).

Conforme os resultados demonstrados no gráfico 22, é possível observar que houve uma fluorescência basal quando foi avaliado a especificidade dos anticorpos anti-EtpA contra as cepas EHEC; EAEC; EIEC; EPEC e DAEC. Esses deslocamentos menores que 2%, provavelmente ocorrem pela interferência dos anticorpos secundários anti-IgG mouse conjugados ao fluorocromo Alexa flúor 488 que podem estar se ligando de forma inespecífica a algum *debrise* celular. Esse deslocamento basal também foi observado nas amostras controle, onde somente o anticorpo secundário foi adicionado na reação. Porém, quando analisamos a especificidade dos anticorpos anti-EtpA contra a cepa ETEC, é possível observar o maior deslocamento da fluorêncencia dentro da gate. Esses resultados corroboram com a validação da especificidade dos anticorpos anti-EtpA produzidos para o reconhecimento de ETEC. Como dito anteriormente, a proteína EtpA é conservada dentro das cepas de ETEC (LUO et al, 2015; KUMAR et al., 2016).

5.9.3 Avaliação da detecção da proteína EtpA em diferentes isolados de ETEC por citometria de fluxo.

Com o objetivo de avaliar o grau de reconhecimento dos anticorpos anti-EtpA em diferentes isolados de ETEC, as porcentagens de reconhecimento de EtpA foram contabilizadas por citometria de fluxo. Os resultados de acordo com a figura 23, demonstraram diferentes porcentagens de reconhecimento da proteína alvo quando comparados entre 11 isolados diferentes de ETEC.

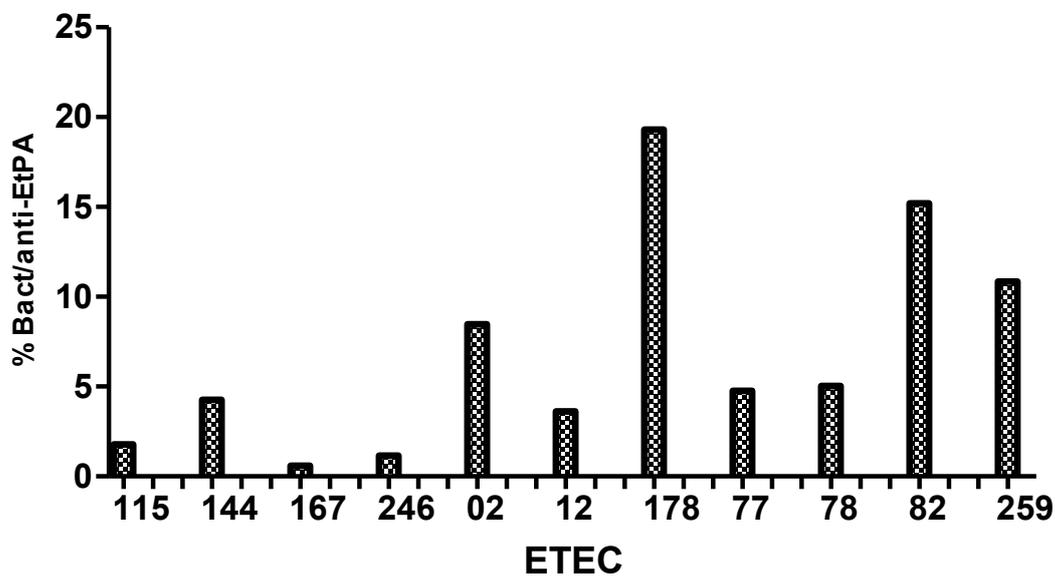


Figura 23. Diferentes isolados de ETEC evidenciando porcentagens variadas da proteína alvo EtpA.

Experimentos com microarranjo de DNA confirmaram que a transcrição de múltiplos genes de virulência, incluindo um número de genes de adesina, é modulada quer por exposição a meios condicionados por células hospedeiras ou por contato de células hospedeiras (KANSAL et al., 2016).

Os nossos resultados conforme demonstrado na figura 23, evidenciam a ocorrência de variação da expressão da proteína EtpA quando as cepas de ETEC são cultivadas *in vitro* e sem exposição a células hospedeiras. Contudo, esses níveis de expressão e detecção desta proteína podem ser ainda maiores se esse experimento for testado *in vivo*, visto que EtpA é modulada pelo contato de ETEC com as células hospedeiras intestinais.

A plasticidade inerente dos genomas de *E. coli* contribui substancialmente com a dificuldade da busca por antígenos únicos para o patótipo de ETEC que são amplamente conservados. Nenhum antígeno único exclusivo e conservado neste patótipo, foi descrito até a presente data. Alguns autores sugerem que isto poderia ser previsto com base no fato de que as toxinas LT e ST codificadas por plasmídeos, que definem ETEC, poderiam formar um complemento mínimo de genes de virulência numa grande variedade de estirpes de *E. coli*. No entanto, estudos anteriores conduzidos com cepas filogeneticamente díspares da Guiné Bissau e do Chile, sugeriram que genes que codificam dois antígenos específicos EatA e EtpA, estavam presentes na grande maioria das cepas (CROSSMAN et al., 2010; SAHL et al., 2011; DEL CANTO et al., 2011).

Neste contexto, Luo e colaboradores (2015) examinaram a conservação genética e a produção real das proteínas EatA e EtpA em uma grande coleção de cepas bem caracterizadas de Bangladesh, complementadas por outras cepas oriundas de outros locais que estavam associados com a doença diarreica grave provocada por ETEC. Os resultados obtidos demonstraram que os dois antígenos EatA (serina protease) e EtpA, são compartilhados amplamente entre as cepas pertencentes a diferentes grupos de fatores de colonização (FC), com exceção das cepas que produzem antígenos descritos como CS4, CS5 e CS6 que raramente produzem a exoproteína EtpA.

Como se observa nos nossos resultados, os níveis de detecção da exoproteína EtpA difere entre as onze cepas testadas. A cepa número 167 apresenta a menor porcentagem de detecção, enquanto a cepa 178 apresenta a maior porcentagem. Estas diferenças podem estar relacionadas com os diferentes grupos de fatores de colonização a que estas cepas pertencem. Desta forma, estudos adicionais futuros serão necessários para caracterizar estas cepas quanto aos grupos de fatores de colonização.

5.10 Ensaio de separação imunomagnético por *Beads* associadas ao anticorpo Anti-EtpA.

5.10.1 Marcação do material genético das bactérias ETEC com o corante Brometo de Etídeo para detecção em citometria de fluxo.

Para avaliar a detecção das bactérias ETEC por *beads* magnéticas associadas ao anticorpo anti-EtpA, foi realizado um ensaio de padronização utilizando o corante Brometo de Etídeo – EtBr (FL3- Percp). O brometo marcou o material genético das bactérias assim como demonstrado na figura 24. Na figura 24-A observamos as bactérias sem a marcação por brometo e na figura 24-B observamos por meio do deslocamento da fluorescência as bactérias marcadas com o corante.

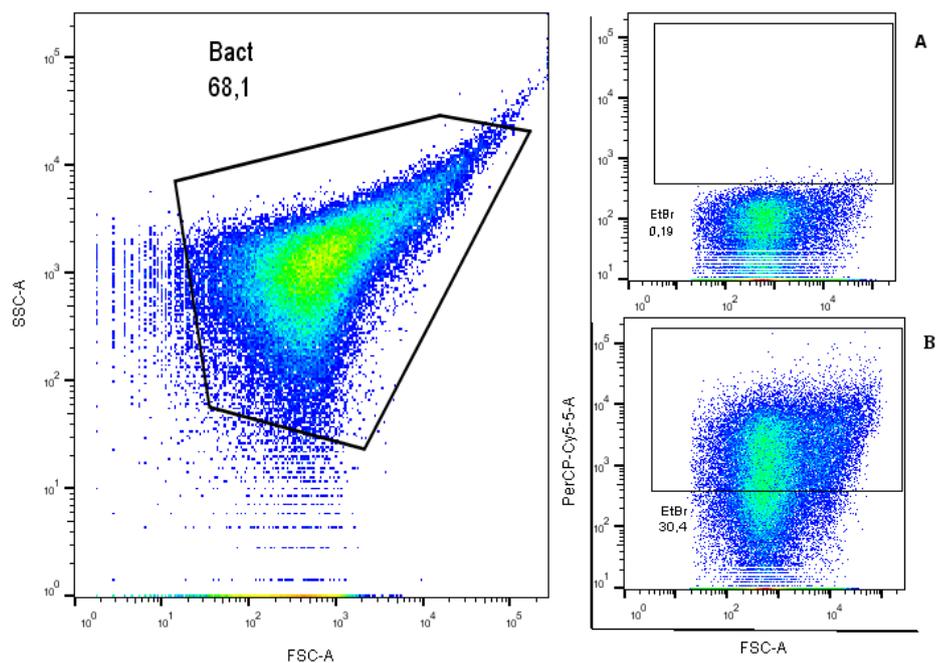


Figura 24. Avaliação da marcação de bactérias por brometo de etídeo. (A) Bactérias sem marcação; (B) Bactérias marcadas com EtBr (FL3- Percp).

5.10.2 Detecção dos anticorpos anti-EtpA acoplados em *beads* magnéticas (Bioclone).

Para a detecção dos anticorpos anti-EtpA produzidos e acoplados às *beads* magnéticas foram utilizados o anticorpo monoclonal anti-IgG mouse conjugados ao fluorocromo Alexa flúor 488 na concentração de $1\mu\text{L}/200\mu\text{L}$ de PBS 1X. O resultado analisado por meio de citometria de fluxo demonstrou um acoplamento de 98% dos anticorpos anti-EtpA nas *beds* magnéticas conforme evidenciado na figura 25.

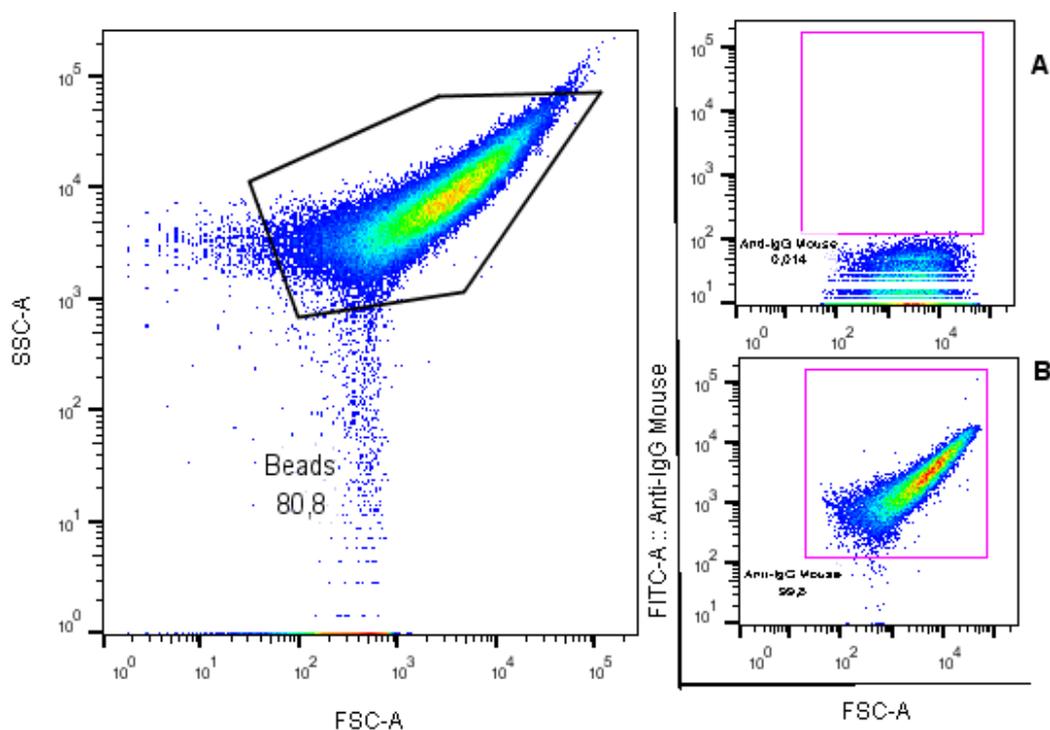


Figura 25. Avaliação do acoplamento dos anticorpos anti-EtpA em *beads* magnéticas. (A) *Beads* magnéticas não acopladas. (B) *beads* acopladas ao anti-EtpA e reconhecidas pelo anticorpo anti-IgG mouse Alexa flúor 488.

5.10.3 Detecção de bactérias ETEC por *Beads* magnéticas

Depois dos ensaios de padronização das concentrações do corante brometo de etídeo, anti-EtpA e anti-IgG Mouse Alexa flúor 488, foi realizado o teste de captura com *beads* magnéticas com dois isolados diferentes de ETEC confirmados anteriormente por PCR e citometria. Os resultados do ensaio de captura das duas

cepas foram positivas conforme analisado por citometria de fluxo (Figura 26). A fluorescência dentro da *gate* corresponde às bactérias marcadas com brometo de etídeo e que foram capturadas pelo anticorpo anti-EtpA acoplado às *beads* magnéticas conforme mostra o esquema da Figura 27. Foi observado que o isolado 178 apresentou uma porcentagem de marcação e detecção maior que o isolado 144, corroborando assim com os resultados anteriores demonstrados na Figura 23.

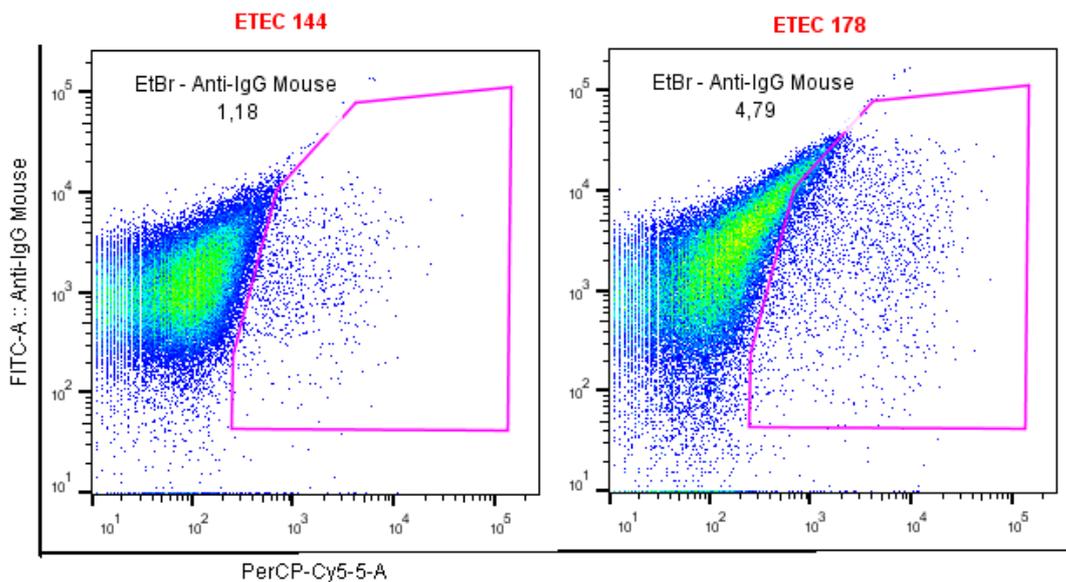


Figura 26. Avaliação da captura dos isolados 144 e 178 de ETEC-EtpA por citometria de fluxo utilizando *beads* associadas ao anticorpo Anti-EtpA.

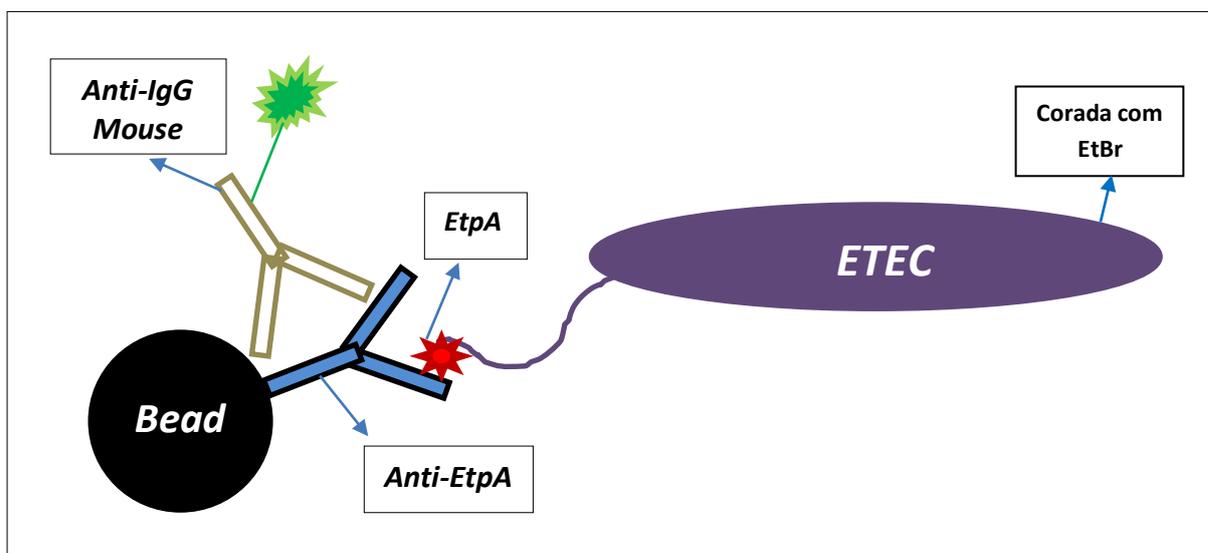


Figura 27. Esquema de captura da proteína EtpA de ETEC por *beads* magnéticas acopladas ao anticorpo Anti-EtpA.

5.10.4 Teste de especificidade e captura com diferentes isolados de *E. coli* diarreio gênicas.

Depois de avaliado o sistema de captura de isolados de ETEC-EtpA, foram realizados os testes de especificidade de captura das *beads* acopladas com anti-EtpA contra diferentes isolados de *E. coli* diarreio gênicas. Os resultados conforme mostrados na figura 28 evidenciam a diferença significativa da porcentagem de reconhecimento de ETEC pelas *beads* em relação as outras cepas de *E. coli* diarreio gênicas. As bactérias ETEC apresentaram a maior porcentagem de captura em comparação aos outros isolados de *E. coli*.

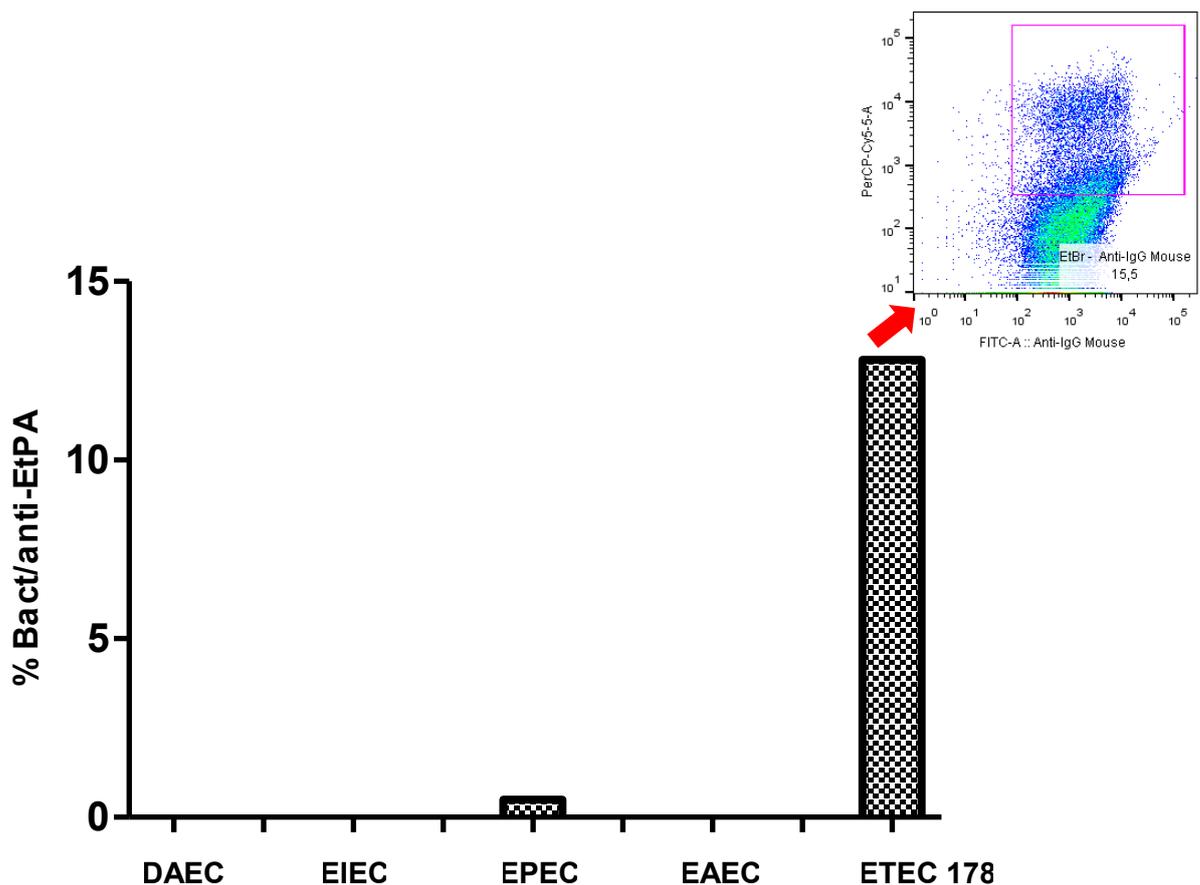


Figura 28. Porcentagem de captura de bactérias diarreio gênicas por *beads* acopladas ao anticorpo Anti-EtpA.

As nanopartículas magnéticas exibem propriedades únicas e têm sido amplamente utilizadas em diversas áreas, incluindo a médica, eletrônica, ambiental, farmacêutica e energética. Essas nanopartículas são plataformas sintéticas versáteis para revestimentos de superfície por meio de conjugação química a bioreceptores (tais como anticorpos, aptâmeros e outros agentes). Devido às suas excelentes propriedades, tornam-se ferramentas poderosas para o monitoramento de várias espécies sob diferentes propósitos biológicos e ambientais (KLOEPFER et al., 2003; KOEDRITH et al., 2015).

Métodos clássicos para a detecção de bactérias patogênicas envolvem os seguintes passos básicos: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, plaqueamento seletivo, triagem bioquímica e confirmação sorológica. Assim, os métodos clássicos, tais como a cultura e a contagem de colônias, a eletroforese em gel e as transferências de membrana, para a detecção de bactérias se tornam demorados e os resultados desses testes muitas vezes não estão disponíveis na escala de tempo desejada no laboratório clínico, razão pela qual o desenvolvimento de tecnologias alternativas de detecção e identificação tornou-se cada vez mais importante nos últimos anos (DOU et al., 2013; LI et al., 2014). Nesse sentido, diversas pesquisas têm sido feitas para melhorar a sensibilidade e rapidez da detecção de bactérias patogênicas por meio do uso de biossensores que incluem principalmente a imunossensibilidade, que se baseia nas interações anticorpo-antígeno específicos (LI et al., 2012; NADZIRAH et al., 2015).

Na literatura encontramos alguns exemplos da utilização de *beads* magnéticas para a detecção da cepa enterohemorrágica de *E. coli* O157:H7. Jayamohan e colaboradores (2015), desenvolveram um método de detecção eletroquímica indireta ultra-sensível de *E. coli* O157:H7 usando esferas primárias (magnéticas) funcionalizadas com anticorpos para a captura e esferas secundárias (poliestireno) funcionalizadas com oligonucleotídeos de poliguanina como uma marca eletroquímica. Segundo os autores, a quantidade de sinal de polyG pode ser correlacionada com a quantidade de *E. coli* na amostra. O método foi capaz de detectar concentrações de até 3 CFU/100 mL de *E. coli* O157:H7, o que é 67 vezes menor do que a técnica mais sensível relatada na literatura. Os autores também demonstraram a utilização funcional deste método para a detecção de *E. coli* O157:H7 semeado em amostras de efluentes de águas residuais.

Os autores Shen e colaboradores (2014), desenvolveram um método imunoenzimático (FNP-ELISA) para detecção de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7. As nanopartículas imunomagnéticas (IMMP) foram conjugadas com anticorpo monoclonal anti-O157:H7 para serem utilizadas para capturar esta cepa. Segundo os autores, o sinal foi significativamente amplificado com limites de detecção de 68 CFU mL⁻¹ em PBS e 6,8 × 10² a 6,8 × 10³ CFU mL⁻¹ nas amostras de alimento. O método desenvolvido por esses autores foi de quatro ordens de magnitude mais sensível do que o C-ELISA, e o processo de detecção completo de EHEC O157:H7 durou apenas 3 h, gerando assim uma grande economia de tempo.

Os autores Wang e colaboradores (2015), desenvolveram um imunossensor de impedância baseado no uso de beads magnéticas e eletrodos interdigitados com tela impressa para a detecção rápida de *E. coli* O157:H7. Segundo os autores, as beads magnéticas acopladas com anticorpos anti-EHEC O157:H7 foram misturadas com uma amostra de *E. coli* para realizar o isolamento e a concentração das células bacterianas. A amostra foi suspensa em solução de sonda redox e colocada num eletrodo interdigitado impresso em tela. Um campo magnético foi aplicado para concentrar as células na superfície do eletrodo e a impedância foi medida. O imunossensor de impedância detectou *E. coli* O157:H7 a uma concentração de 104,45 CFU/mL⁻¹ (~ 1400 células bacterianas em um volume aplicado de 25 µL) em menos de 1 h sem pré-enriquecimento. Uma relação linear entre a concentração de bactérias e o valor de impedância foi obtida entre 104 CFU/mL⁻¹ e 107 CFU/mL⁻¹. O campo magnético e a impedância foram simulados usando o software COMSOL Multiphysics.

Até o presente momento, não foi encontrado em nenhuma base de dados da literatura a utilização de anticorpos anti-EtpA acoplados às beads magnéticas para a detecção da bactéria *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). Desta forma, o presente trabalho visa contribuir para o avanço das pesquisas sobre a detecção deste patógeno a nível nacional. A ferramenta aqui desenvolvida, procurou adequar-se dentro das principais exigências de um método de detecção que se aproxima do ideal, ou seja, a alta especificidade (detectando apenas a bactéria de interesse), a alta sensibilidade (capacidade de detectar as bactérias em baixas concentrações nas amostras), e o tempo de execução operacional relativamente rápido.

6 CONCLUSÃO

- A sequência escolhida para a construção da proteína quimérica a partir das análises *in silico*, permitiram a produção de anticorpos policlonais que foram capazes de reconhecer a proteína EtpA nativa da bactéria *E. coli* enterotoxigênica de forma específica.
- Os anticorpos policlonais foram produzidos com êxito em modelo murino a partir das imunizações com a proteína recombinante.
- O mapeamento de epítomos demonstrou que os anticorpos produzidos neste modelo, possuem uma reatividade específica para a região N-terminal da proteína recombinante.
- O método de separação das bactérias ETEC realizado por *beads* magnéticas ligadas aos anticorpos anti-EtpA foi um método eficaz de separação desse patógeno.
- As análises por citometria de fluxo permitiram a caracterização dos anticorpos obtidos e demonstrou uma alta sensibilidade e especificidade do método de separação e detecção de bactérias ETEC por *beads* magnéticas ligadas aos anticorpos anti-EtpA.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, C. M. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae (+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect.Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- ABOU ZIKI, M.D.; VERJEE. M.A. Rare mutation in the SLC26A3 transporter causes life-long diarrhoea with metabolic alkalosis. **BMJ Case Reports**, 2015.
- ANDERSON, L.E; WALSH, K.A; NEURATH, H. Bovine enterokinase. Purification, specificity, and some molecular properties. **Biochemistry**, v. 16, p. 3354–3360, 1977.
- ANTIKAINEN, J.; KANTELE, A.; PAKKANEN, S.H.; LÄÄVERI,T.; RIUTTA, J.; VAARA, M.; KIRVESKARI, J. A quantitative polymerase chain reaction assay for rapid Detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.11, p.1-8, 2013.
- ARAÚJO, A.N; GIUGLIANO, L.G. Human milk fractions inhibit the adherence of di;usely adherent *Escherichia coli* (DAEC) and enteroaggregative E. coli (EAEC) to HeLa cells. **FEMS Microbiology Letters.**, v.184, p. 91-94, 2000.
- ASLANI, M.M; ALIKHANI ,M.Y; ALI ZAVARI, A; YOUSEFI, R; ZAMANI, A.R. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p.136–139, 2011.
- AVERY, M. E.; SNYDER, J. D. Oral therapy for acute diarrhoea: the underused simple solution. **New Engl. J. Med.**, v. 323, p. 891-894, 1990.
- BERGSTROM KS, KISSOON-SINGH V, GIBSON DL, MA C, MONTERO M, SHAM HP, RYZ N, HUANG T, VELCICH A, FINLAY BB, CHADEE K, VALLANCE BA. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa. **PLoS pathogens**, v.6 e1000902, 2010.
- BHUTTA, Z. A.; BLACK, R.E.; BROWN, K.H.; GARDNER, J.M.; GORE, S.; HIDAYAT, A.; KHATUN, F.; MARTORELL, R.; NINH, N.X.;PENNY, M.E.; ROSADO, J.L.; ROY, S.K.; RUEL, M.; SAZAWAL, S.; SHANKAR, A. Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: Pooled analysis of randomized controlled trials. **Pediatr.**, v.135, p.657-683, 1999.
- BINDER, H.J ; IAN BROWN, B. S. RAMAKRISHNA, AND GRAEME P. YOUNG. Oral Rehydration Therapy in the Second Decade of the Twenty-first Century. **Curr Gastroenterol Rep.**,v.16, n.3, p. 376, 2014.

BOISEN, N.; KROGFELT, K.A; NATARO, J.P. Enteroaggregative *Escherichia coli*. ***Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis***. Cap. 8, p. 247-273, 2013.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças infecciosas e parasitárias. **Guia de bolso, 8.Ed**, 2010.

BROOKS J.T; SOWERS E.G; WELLS J.G; GREENE K.D; GRIFFIN P.M; HOEKSTRA R.M; STROCKBINE N.A. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983–2002. **J. Infect. Dis.**, v.192, p.1422–1429, 2005.

BRUNDER, W. et al. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitolfermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H (-). **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4447-4457, 2001.

BRUNDER, W.; SCHIMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Mol. Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 767-778, 1997.

BRUSSOW, H. Enteroaggregative *E. coli*. **Encyclopedia of Food Microbiology** (Second Edition), p. 706-712, 2014.

CAMPELLONE K.G. Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFu and actin pedestal assembly. **FEBS J.**, v.277, p.2390–2402, 2010.

CANANI, R.B.; CASTALDO, G.; BACCHETTA, R.; MARTÍN G.; OLIVIER, M.O. Congenital diarrhoeal disorders: advances in this evolving web of inherited enteropathies. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v.44, p.1-10, 2015.

CAPRIOLI A, MORABITOA S, BRUGÈREB H, OSWALDB E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary research**, v.36, p. 298-311, 2005.

CASSELS, F.J.; WOLF, M.K. Colonization factors of diarrheagenic *E. coli* and their intestinal receptors. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.15, p. 214–226, 1995.

CHAUDHURI, R.R; HENDERSON, I.R. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 214–226, 2012.

CHEN, H.D; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.83–98, 2005.

CHUNGLOK W.; WURAGIL D.K.; OAEW S.; SOMASUNDRUM M.; SURAREUNGCHAI, W. Immunoassay based on carbon nanotubes-enhanced ELISA for *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. **Biosens Bioelectron**, v.26, p. 3584–3589, 2011.

CLARKE. S.C. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*—an emerging problem? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 41, p.93-98, 2001.

CLEARY J; LAI L.C; SHAW R.K; STRAATMAN-IWANOWSKA A; DONNENBERG M.S; FRANKEL G; KNUTTON S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v.150, p. 527-538, 2004.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

COLUCHI, N; MUNFORD, V.J; CYNTHIA, V; MABEL, E; ERNESTO W; PERLA, M; RÁCZ, L.M. Detection, subgroup specificity and genotype diversity of Rotavirus strains in children with acute in Paraguay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.1709-1714, 2002.

COMAS-RIU J., RIUS N., Flow cytometry applications in the food industry. **J. Ind. Microb. Biotechn.** v. 36, p.999-101, 2009.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Curr. Microbiol.**, v.3, p. 95–99, 1979.

CROSSMAN LC, CHAUDHURI RR, BEATSON SA, WELLS TJ, DESVAUX M, et al. A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. **Journal of bacteriology** v.192; p. 5822–5831, 2010.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature reviews**, v.8, p. 20-38, 2010.

CZECHOWSKA K., JOHNSON D. R., VAN DER MEER J. R. Use of flow cytometric methods for single-cell analysis in environmental microbiology. **Curr. Opin. Microbiol.** v.11, p. 205–212, 2008.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr.Opin. Microbiol.**, v. 8, n. 1, p. 28-34, 2005.

DEL CANTO F, VALENZUELA P, CANTERO L, BRONSTEIN J, BLANCO JE, et al. Distribution of Classical and Nonclassical Virulence Genes in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Chilean Children and tRNA Gene Screening for Putative Insertion Sites for Genomic Islands. **J Clin Microbiol.** V. 49; p. 3198–3203, 2011.

DONG, H., NILSSON, L., AND KURLAND, C. G. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. **J. Bacteriol.** 177, 1497–1504, 1995.

DONNENBERG, M.S.; YU, J.; KAPER, J.B. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. **J. Bacteriol.**, v.175, p. 4670–4680, 1993.

DORSEY, F. C.; FISCHER, J. F.; FLECKENSTEIN, J. M. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**,v.8, p. 1516–1527, 2006.

DOU W, TANG W, ZHAO G. A disposable electrochemical immunosensor arrays using 4-channel screen-printed carbon electrode for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Enterobacter sakazakii*. p. 79–85, 2013.

DUBREUIL, J.D. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). **Encyclopedia of Food Microbiology**, v.1, p. 728 – 734, 2014.

DUPONT, H. L.; S. B. FORMAL; R. B. HORNICK; M. J. SNYDER; J. P. LIBONATI, D. G. SHEAHAN; E. H. LABREC; J. P. KALAS. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **N. Engl. J. Med.**, v.285, p.1–9, 1971.

DUPONT, H.L. Travelers diarrhea: antimicrobial therapy and chemoprevention. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, p.191-198. 2005.

ELSAS, J.D; SEMENOV, A.V; COSTA, R; TREVORS, J.T. Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **The ISME Journal**, v.5, p.173–183, 2011.

FLECKENSTEIN J.M.; ROY K.; FISCHER J.F.; BURKITT M. Identification of a two-partner secretion locus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v.74, p. 2245–2258, 2006.

FRANKEL, G. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, n. 5, p. 911-921, 1998.

FROSSARD, A; HAMMES, F; GESSNER, M.O. Flow Cytometric Assessment of Bacterial Abundance in Soils, Sediments and Sludge. **Front Microbiol.** v.7: 903, 2016.

FUJIOKA, M.; KASAI, K.; MIURA, T.; SATO, T.; OTOMO, Y. Rapid diagnostic method for the detection of diarrheaiogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Jpn. J. Infect Disease**, v.62, p. 476-480, 2009.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A.M . Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends Microbiol.**, v.4, p.444–452, 1996.

GAN, S.D.; PATEL, K.R. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **Journal of Investigative Dermatology**, v.133, p. 1-3, 2013.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 5, p. 2573-2585, 2005.

GIRON, J. A. et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v.44, p. 361–379, 2002.

GOLDBERG M.B; SANSONETTI P.J. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. **Infect. Immun.**, v. 61, p.4941–4946, 1993.

GOMES, T. A. T.; GONZÁLEZ-PEDRAJO, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. **Sharjah, Bentham Science Publishers**, p. 25-47, 2010.

GOMES, T.A.T.; VIEIRA M.A.M.; ABE C. M.; RODRIGUES D.; GRIFFIN P.M.; RAMOS S.R.T.S. Adherence pattern and adherence-related DNA sequences in *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea in São Paulo City, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p. 3609-3613, 1998.

GRODBERG,J.; DUNN,J. J. OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. **J. Bacteriol.** 170,1245–1253, 1988.

GUERRANT, R.I.; KOSEK M.; LIMA A. M.; LORNTZ, B.; GUYATT, H.L. Updaing the DALYs for diarrhoeal disease. **Trends in Parasitology**, v.18, p. 191-193, 2002.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **J. Anim. Sci.**, v.85, p. 45-62, 2007.

HAAK, H.; CLAESON, M.E. Regulatory actions to enhance appropriate drug use: the case of antidiarrhoeal drugs. **Soc. Sci. Med.**, v. 42, n.7, p.1011-1019, 1996.

HAMMES F., EGLI T. Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications. **Anal. Bioanal. Chem.** v. 397, p. 1083–1095, 2010.

HERNANDES R.T; ELIAS W.P; VIEIRA M.A; GOMES T.A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett.**, v.297, p. 49-137, 2009.

HORNBECK, P. Assays for antibody production. **Current Protocols in Immunology**, v.2.1, p.1- 22, 1991.

HU, J.; TORRES, A.G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. **Clin Microbiol Infect.**, p.1 – 6, 2015.

HUANG DB, OKHUYSEN PC, JIANG ZD, DUPONT HL. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. **Am J Gastroenterol**, v. 99, p. 383–389, 2004.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 556-563, 2006.

IDE, T.; LAARMANN, S.; GREUNE, L.; SCHILLERS, H.; OBERIETHNER, H.; SCHMIDT, M.A. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type-III secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v.3, p.669–679, 2001.

ISIDEAN, S.D; RIDDLE, M.S; SAVARINO, S.J; PORTER, C.K. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine.**, v.29, p. 6167– 6178, 2011.

ITO, T.; KUWAHARA, S.; YOKOTA, T. Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 7-12, 1983.

JARVIS, K.G.; GIRO´N, J.A; JERSE, A.E.; MCDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc. Natl.**, p. 7996–8000, 1995.

JAYAMOHAN, H.; BRUCE K. GALE; BJ MINSON, CHRISTOPHER J. LAMBERT, NEIL GORDON; HIMANSHU J. SANT. Highly Sensitive Bacteria Quantification Using

Immunomagnetic Separation and Electrochemical Detection of Guanine-Labeled Secondary Beads **Sensors (Basel)**. v. 15(5), p. 12034–12052, 2015.

JOHANSSON ME, PHILLIPSON M, PETERSSON J, VELCICH A, HOLM L, HANSSON GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 105:15064-15069, 2008.

JOHNSON, K. E.; THORPE, C. M.; SEARS, C. L. The emerging clinical importance de non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p.1587-1595, 2006.

JUZWA, W; CZACZYK, K. Flow cytometric analysis of microbial contamination in food industry technological lines – initial study. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.** v. 11(2), p. 111-119, 2012.

KANG, G. Viral Diarrhea. **International Encyclopedia of Public Health**, v.1, p. 518-526, 2008.

KAPER, J.B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v.27, n.1, p.130–133, 1996.

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

KARCH,H.; MARTINA BIELASZEWSKA, M.; BITZAN, M.; SCHMIDT, H. Epidemiology and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Diagn Microbiol Infect Dis.**,v.34, p.229 – 243, 1999.

KARMALI, M. A., M. PETRIC, C. LIM, P. C. FLEMING, AND B. T. STEELE. *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. **Lancet ii**, p.1299–1300, 1983.

KARMALI, M. A.; STEELE, B.T; PETRIC, M.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet i.**, p.619–620, 1983.

KELLY, P. Infectious diarrhoea. **Medicine**. V.43, Issue 5, Pages 253–258, 2015.

KHAN, W.U & SELLEN, D.W. Zinc supplementation in the management of diarrhea. **eLibrary of Evidence for Nutrition Actions**, 2011.

KLOEPFER J. A., MIELKE R. E., WONG M. S., NEALSON K. H., STUCKY G., NADEAU J. L. Quantum dots as strain- and metabolism-specific microbiological labels. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69(7); p. 4205–4213, 2003.

KNUTTON S, LLOYD DR, CANDY DC, MCNEISH AS. In vitro adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to human intestinal epithelial cells from mucosal biopsies. **Infect Immun.** v. 44, p.514-518, 1984.

KOEDRITH, P; THASIPHU, T.; WEON, J.; BOONPRASERT, R.; TUITEMWONG, K.; PRAVATE, T. Recent Trends in Rapid Environmental Monitoring of Pathogens and Toxicants: Potential of Nanoparticle-Based Biosensor and Applications. **ScientificWorldJournal.** p. 1-12, 2015.

KONOWALCHUK, J., J. I. SPEIRS, AND S. STAVRIC. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.18, p.775–779, 1977.

KUMAR, P; KUHLMANN, M.F; BHULLAR,K.; YANG,H.; VALLANCE, B.A.; XIA, L.; LUO,Q.; FLECKENSTEIN, M.J. Dynamic interactions of a conserved enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin with intestinal mucins govern epithelial engagement and toxin delivery. **Infect. Immun.** v. 84:12 10, p.3608-3617, 2016.

KURMANOVA, A. et al. Structural requirements for furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 357, p.144–149, 2007.

LAMPEL, K.A. Enteroinvasive *Escherichia coli*: Introduction and Detection by classical Cultural and Molecular Techniques. **Encyclopedia of Food Microbiology**, p. 718-721, 2014.

LAN, R.; LUMB, B.; RYAN, D.; REEVES, P.R. Molecular Evolution of Large Virulence Plasmid in *Shigella* Clones and Enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.69, n.10, p. 6303–6309, 2001.

LI Y, AFRASIABI R, FATHI F, WANG N, XIANG C, LOVE R, et al. Impedance based detection of pathogenic *E. coli* O157:H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. p. 193–9, 2014.

LI Y, CHENG P, GONG J, FANG L, DENG J, LIANG W, et al. Amperometric immunosensor for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food specimens. **Analytical Biochemistry**, v. 421(1); p. 227–233, 2012.

LIEPNIEKS, J.J; LIGHT A. The preparation and properties of bovine enterokinase. **J Biol Chem.** 254:1677–1683, 1979.

LIOR, H. Classification of *Escherichia coli*. In: GYLES, C. L. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. **CAB International Wallingford**, p.3-72, 1994.

LIU J, GRATZ J, MARO A. Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, p. 98–103, 2012.

LUO, Q.; QADRI, F.; KANSAL, R.; RASKO, D.A.; SHEIKH, A.; FLECKENSTEIN, J.M. Conservation and Immunogenicity of Novel Antigens in Diverse Isolates of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 9, n.1, p. 1 – 19, 2015.

MAURELLI, A.T. Shigella and enteroinvasive *Escherichia coli*: Paradigms for pathogen evolution and host parasite interactions. **Escherichia Coli** (Second Edition) p.215-245, 2013.

MCDANIEL, T.K., JARVIS, K.G., DONNENBERG, M.S. AND KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad.**, v.92, p.1664–1668, 1995.

MCDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on K-12 *E. coli*. **Mol. Microbiol.**, v.23, p.399–407, 1997.

MCGREGOR, A.C.; WHITTY, C.J.M.; WRIGHT, S.G. Geographic, symptomatic and laboratory predictors of parasitic and bacterial causes of diarrhoea in travelers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.106, p. 549– 553, 2012.

MENEES, S.; SAAD, R; CHEY, W.D. Agents that act luminally to treat diarrhoea and constipation. **Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology**, v.9, p. 661-674, 2012.

MENTZER, A.V.; CONNOR, T.R.; WIELER, L.H.; SEMMLER, T.; IGUCHI, A.; THOMSON, N.R.; RASKO, D.A.; JOFFRE, E.; CORANDER, J.; PICKARD, D.; WIKLUND, G.; SVENNERHOLM, A.M.; SJÖLING, A.; DOUGAN, G. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. **Nature Genetics**, v.46, n.12, p.1321-1326, 2014.

MOFFATT BA, STUDIER FW. Entry of bacteriophage T7 DNA into the cell and escape from host restriction. **J Bacteriol.** V. 170(5), p. 2095–2105, 1988.

MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

MORRIS, S. S. et al. Diarrhoea-defining the episode. **Int. J. Epidemiol.**, v. 23, n. 3, p. 617-623, 1994.

MOUNIER J, POPOFF M. R.; ENNINGA J, FRAME M. C.; SANSONETTI P. J. The IpaC Carboxyterminal Effector Domain Mediates Src-Dependent Actin Polymerization during *Shigella* Invasion of Epithelial Cells. **PLoS Pathogens**, v.5, p.1, 2009.

NADZIRAH, SH.N.; AZIZAH, UDA HASHIM; SUBASH C. B. GOPINATH, E MOHD KASHIF Titanium Dioxide Nanoparticle-Based Interdigitated Electrodes: A Novel Current to Voltage DNA Biosensor Recognizes *E. coli* O157:H7. **PLoS One** v. 10(10), 2015.

NAJAFI, R.; MUKHERJEE, S.; HUDSON JR., J.; SHARMA, A.; BANERJEE, P. Development of a rapid capture-cum-detection method for *Escherichia coli* O157 from apple juice comprising nano-immunomagnetic separation in tandem with surface enhanced Raman scattering. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 89–97, 2014.

NARA, J. M. et al. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **J.Appl. Microbiol.**, v. 109, p. 35-43, 2010.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **clinical microbiology reviews**, v.11, p.142–201, 1998.

NAVANEETHAN, U.; GIANNELLA, R.A. Mechanisms of infectious diarrhea. **Nature clinical practice. Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p.637-647, 2008.

NGUYEN, T.V.; VAN, P.L, HUY, C.L.; GIA,K.N.; WEINTRAUB, A. Detection and Characterization of Diarrheagenic *Escherichia coli* from Young Children in Hanoi, Vietnam. **Journal of clinical Microbiology** 43(2):755, 2005.

NOWICKI, B.; SSELVARAGAN, R.; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesions: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **J. Infect. Dis.**, v.183, p.524-527, 2001.

NUNES, M. R. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with acute diarrhea and controls in Teresina/PI, Brazil: distribution of enterotoxin and colonization factor genes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 111, n. 1, p. 224-232, 2011.

O'BRIEN, A. D.; R. K. HOLMES. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 206–220, 1987.

O'LOUGHLIN, E. V.; ROBINS-BROWNE, R. M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. **Microb Infect.**, v.3, p. 493-507, 2001.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p.125-136, 2005.

OGAWA, M., HANDA, Y., ASHIDA, H., SUZUKI, M.; SASAKAWA, C. The versatility of *Shigella* effectors. **Nature Rev. Microbiol.**, v.6, p.11–16, 2008.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 4, p.507-517, 2006.

ORLANDI, P.P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G.F.; ALVES, F.; CUNHA, R.P.A.; DURLACHER, R.; PEREIRA DA SILVA, L.H. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: Preliminary Study . **Mem. Inst. Osw. Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, p.621-625, 2001.

PAN, S.H; MALCOLM, B.A. Reduced background expression and improved plasmid stability with pET vectors in BL21 (DE3). **Biotechniques**, v. 29(6):1234-8, 2000.

PATEL A.B, DHANDE LA, RAWAT MS. Therapeutic evaluation of zinc and copper supplementation in acute diarrhea in children: double blind randomized trial. **Indian Pediatrics**, v.42, n.5, p.433–42, 2005.

PATEL, S. K.; DOTSON J.; ALLEN, K.P.; FLECKENSTEIN J.M. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.72, p.1786–1794, 2004.

PENDARIES, C.; TRONCHÈRE, H.; ARBIBE, L.; MOUNIER, J.; OR GOZANI.; CANTLEY, L.; FRY M, J.; GAITS-IACOVONI, F.; SANSONETTI P, J.; BERNARD PAYRASTRE, B. PtdIns5P activates the host cell PI3-kinase/Akt pathway during *Shigella flexneri* infection. **EMBO J.**, v.25, p.1024–1034, 2006.

PEZZELLA, V.; DE MARTINO, L.; PASSARIELLO, A.; COSENZA, L.; TERRIN, G.; CANANI, R.B. Investigation of chronic diarrhoea in infancy. **Early Hum. Dev.**, v.89, p. 893–897, 2013.

PUSHPAKUMARA, P.D; PREMARATHNE, P.H; GOONASEKARA, C.L. Characterisation of B cell epitopes of dengue virus NS1 protein using bioinformatics approach. **J.Natn.Sci.Foundation**, v. 44 (4), p. 417-425, 2016.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A.M.; FARUQUE, A. S. G.; SACK, B.R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18(3), p.465 – 483, 2005.

RILEY, L. W., R. S. REMIS, S. D. HELGERSON, H. B. MCGEE, J. G. WELLS, B. R. DAVIS, R. J. HEBERT, E. S. OLCOTT, L. M. JOHNSON, N. T. HARGRETT, P. A. BLAKE; M. L. COHEN. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, v.308, p.681–685, 1983.

ROCHA, S.L.S. Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do Multiplex-PCR. **Dissertação de Mestrado**. 68 f. Universidade do Rio Grande do Sul, 2008.

RÖMER, W. et al. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. **Nature**, v. 450, p.670–675, 2007.

ROSANO, G.L; CECCARELLI, A.E. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Front Microbiol.** v.5:172, p.1-17, 2014.

ROY K.; BARTELS S.; QADRI F.; FLECKENSTEIN J.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Elicits Immune Responses to Multiple Surface Proteins. **Infect Immun.**, v.78(7),p.3027–3035, 2010.

ROY, K.; HILLIARD, G.M.; HAMILTON D.J.; LUO, J.; OSTMANN, M.M.; JAMES M. FLECKENSTEIN, J.M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. **Nature**, v. 457, p. 594 – 598, 2009.

ROY, K; HAMILTON, D.J; FLECKENSTEIN, J.M. Cooperative Role of Antibodies against Heat-Labile Toxin and the EtpA Adhesin in Preventing Toxin Delivery and Intestinal Colonization by Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.19, n.10, p. 1603–1608, 2012.

SAHL JW, STEINSLAND H, REDMAN JC, ANGIUOLI SV, NATARO JP, ET AL. A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals pathovar-specific conservation. **Infect Immun.** v. 79; p. 950–960, 2011.

SAL-MAN N.; BIEMANS-OLDEHINKEL E.; FINLAY B.B. Structural microengineers: pathogenic *Escherichia coli* redesigns the actin cytoskeleton in host cells. **Structure**, v.17, n.1, p.9-15, 2009.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor Laboratory Press.**, p.1659, 1989.

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

SCOTLAND, S. M.; R. H. FLOMEN; B. ROWE. Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin in culture supernatants. **J. Clin. Microbiol.**, v.27, p. 339–340, 1989.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, v.60, p.167–215, 1996.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.18, p. 264–292, 2005.

SHAPIRO H.M. Practical flow cytometry. **J. Wiley**, 2003.

SHEN, Z.; HOU, N.; JIN, M.; QIU, Z.; WANG, J.; ZHANG, B.; WANG, X.; WANG, J.; ZHOU, D.; LI, J. A novel enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 using immunomagnetic and beacon gold nanoparticles. **Gut Pathogens**, v.6, n.14, p.1-8, 2014.

SOHEL, I.; PUENTE, J.L.; RAMER, S.W.; BIEBER, D.W.; WU, C.; SCHOOLNIK, G.K. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. **J. Bacteriol.**, v.178, p.2613–2628, 1996.

SONODA C; TAGAMI A; NAGATOMO D; YAMADA S; FUCHIWAKI R; HARUYAMA M; NAKAMURA Y; KAWANO K; OKADA M; SHIOYAMA Y; IRYODA K; WAKAMATU H; HIDAKA Y. An enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26 outbreak at a nursery school in Miyazaki, Japan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.61, p. 92–93, 2008.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.

STEINSLAND, H.; VALENTINER-BRANTH,P.; GREWAL, H. M. ; GAASTRA, W.; MOLBAK, K. K.; SOMMERFELT, H. Development and evaluation of genotypic assays for the detection and characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.45, p.97–105, 2003.

STONE, K.D.; ZHANG, H.Z.; CARLSON, L.K; DONNENBERG, M.S. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the BFP ultra structure. **Mol. Microbiol.**, v.20, p. 325–338, 1996.

SUNG, Y.J.; SUK, H.J.; SUNG, H.Y.; LI, T.; POO, H.; KIM, M.G. Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* in milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 43, p. 432-439, 2013.

SWEENEY N. J.; P KLEMM.; B. A MCCORMICK.; E MOLLER-NIELSEN.; M. UTLEY.; M A SCHEMBRI.; D. C LAUX.; P. S. COHEN. The *Escherichia coli* K-12 gntP gene allows E. coli F-18 to occupy a distinct nutritional niche in the streptomycin-treated mouse large intestine. **Infection and Immunity**, v.64, p. 3497-3503, 1996.

TANIUCHI, M.; CAROL C.; WALTERS JEAN GRATZ.; ATHANASIA MARO.; HAPPINESS KUMBURU.; ORALAK SERICHANTALERGS.; ORNTIPA SETHABUTR.; LADAPORN BODHIDATTA.; GIBSON KIBIKI.; DENISE M. TONEY.; LYNETTE BERKELEY.; JAMES P. NATARO.; ERIC R. HOUPPT. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. and its evaluation on colonies, culture broths, and stool. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.73, p.121-128, 2012.

TOUCHON M.; HOEDE C.; TENAILLON O.; BARBE V.; BAERISWYL S.; BIDET P. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genet** , v.5, 2009.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect.**, v. 8, p.508–513, 2002.

TRABULSI, L.R. - **Microbiologia**, 4a ed., Atheneu, Rio de Janeiro, 2005.

TURNER, S. M.; SCOTT-TUCKER, A.; COOPER, L. M.; HENDERSON, I. R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.263, p.10–20, 2006.

VRANJAC, A. Diarréia e Rotavírus. **Revista Saúde Pública**, v.38, 2004.

WALKER, C.F.; SACK, D.; BLACK, R.E. Etiology of Diarrhea in Older Children, Adolescents and Adults: A Systematic Review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.4, N.8, 2010.

WANG, J.; MOORE, J.; LAULHE, S.; NANTZ, M.; ACHILEFU, S.; KANG, K.A. Fluorophore-gold nanoparticle complex for sensitive optical biosensing and imaging. **Nanotechnology**, 2012.

WANG, R; JACOB LUM, J ZACH CALLAWAY, JIANHAN LIN, WALTER BOTTJE; YANBIN LI, A. Label-Free Impedance Immunosensor Using Screen-Printed Interdigitated Electrodes and Magnetic Nanobeads for the Detection of E. coli O157:H7. **Biosensors (Basel)**, v. 5(4), p.791–803, 2015.

WAUGH, D.S. An Overview of Enzymatic Reagents for the Removal of Affinity Tags. **Protein Expr Purif.** v. 80(2), p. 283–293, 2011.

WEISS AA, BABYATSKY MW, OGATA S, CHEN A, ITZKOWITZ SH. Expression of MUC2 and MUC3 mRNA in human normal, malignant, and inflammatory intestinal tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 44, p.1161-1166, 1996.

WHITTAM T. Genetic variation and evolutionary processes in natural populations of *Escherichia coli*. **Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology**, v.1, p. 2708–2720, 1996.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p.569–584, 1997.

WOOD, D.W. New trends and affinity tag designs for recombinant protein purification, **Current Opinion in Structural Biology**, v. 26, p. 54–61, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Clinical management of acute diarrhoea. **Geneva, UNICEF**, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal disease. **Fact sheet N°330**, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Implementing the new recommendations of the clinical management of diarrhoea. **Geneva**, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The treatment of diarrhea. A manual for physicians and other senior health workers. **Geneva**, 2005.

XU, Z.; HU, W.; ZHANG, Y.; WANG, X.; ZHOU, M.; SU, H.; HUANG, C.; TONG, S.; GUO, Q. Exploration of diarrhoea seasonality and its drivers in China. **Scientific Reports**, v.5, p.1-9. 2015.

YAMAMOTO, T.; KANEKO, M.; CHANGCHAWALIT, S.; SERICHANTALERGS, O.; IJUIN, S.; ECHEVERRIA, P. Actin accumulation associated with clustered and localized adherence in *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **Infect. Immun.**, v.62, p. 2917–2929, 1994.

YANG, H.; QU, L.; WIMBROW, A.N.; JIANG, X.; SUN, Y. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle based immunomagnetic separation and real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n.2, p. 132-138, 2007.

YONEKURA, K. et al. The bacterial flagellar cap as the rotary promoter of flagellin self-assembly. **Science**, v. 290, p.2148–2152, 2000.

YONEKURA, K.; MAKI-YONEKURA, S.; NAMBA, K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. **Nature**, v. 424, p. 643–650, 2003.

YOUNIS, R. et al. SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 22, p. 6093-6098, 2010.

ZAMBONI, A.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with Infantile diarrhea in Brazil, **J. of Clin. Microbiol.**, v.42, p.1058-1063, 2004.

ZBOROMYRSKA, Y.; HURTADO, J.C.; SALVADOR, P.; ALVAREZ-MARTINEZ, M.J.; VALLS, M.E.; MAS, J.; MARCOS, M.A.; J. GASCON, J.; VILA, J. Aetiology of traveller's diarrhoea: evaluation of a multiplex PCR tool to detect different enteropathogens. **Clin Microbiol Infect.**, v.20, p.753-759, 2014.

ZHANG, H.Z.; DONNENBERG, M.S. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v.21, p.787–797, 1996.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9:40, p. 1-8, 2008.

ZHOU, F.; WANG, M.; YUAN, L.; CHENG, Z.; WU Z.; CHEN, H. Sensitive sandwich ELISA based on a gold nanoparticle layer for cancer detection. **Analyst**, v.137, p. 137:1779–1784, 2012.

ZHU J.; YANG Q.; CAO L.; DOU X.; ZHAO J.; ZHU W.; DING F.; BU R.E.; SUO S.; REN Y.; LI G.; REN, X. Development of porcine rotavirus vp6 protein based ELISA for differentiation of this virus and other viruses. **Virology**, v.10, p.91, 2013.

ANEXO-A: Parecer do CEUA/INPA

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

**PARECER CONSUBSTANCIADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO
 DE ANIMAIS**

Número do Protocolo: 019/2014	Data de Entrada: 26/08/2014
Pesquisador Responsável: HELBER ABELLINI ASTOLPHO	
Título do Projeto: Desenvolvimento de anticorpos policlonais e aplicação da técnica de <i>immuno-PCR</i> para detecção de <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica.	
Instituição Responsável: INPA	

INFORMAÇÕES SOBRE O MODELO ANIMAL EXPERIMENTAL

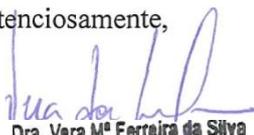
ESPÉCIE	LINHAGEM	IDADE	PESO APROX.	QUANTIDADE
				Macho/ Fêmea
Camundongo isogênico	<i>Balb/C</i>	6 semanas	25-50g	10

**RECOMENDAÇÃO
 FINAL**

Indicação:
APROVADO

Data de liberação do Parecer: 18.12.2014.

Atenciosamente,


 Dra. Vera Mª Ferreira da Silva

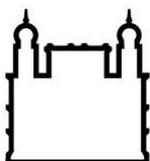
P<g]den(xCEUAüNP*
 PO x•006/2013

ANEXO – B**Sequencia – gene sintético (Quimera - gblocks gene fragments)**

Gene: EtpA_ep1_ep2_ep3.

```
GAATTCCATCATCACCATCACCATGATGATGACGATAAGGGGCCCCACGTGGTG
GGAAACGCTAAAGCAACGGGTTCTGTTGAGGGCGAGAAGTCTCCAAGACGAGG
TGTGAGAGCAATGGCCTTGTCATTGTTAAGTGGCATGATGATTATGGCTCACCC
TGCCATGTCTGCAAACCTTACCAACAGGAGGTCAAATCGTCGCAGGTAGTGGGTC
AATTCAAACTCCTTCCGGTAACCAGATGAATATTCATCAAAACTCTCAAAACATG
GTAGCTAATTGGAACCTTTTTGACATCACGCGTACTAGTGGGCCCATCACAGCT
ACTGGAGGGCAAGGAGGAGGAGAGGTCTACGTTGGAGGAGGTTGGCAGGGCA
AGGATTCCAATATCCACGTGCCCGGGACGCGTGTTTCAAAAACCTGAGACTACGC
AGTCTCCTCCCCACACACAGTTCGCCCAACTGCTGCAGGATCAGCACCCGGG
ACTAGTTAAGCGGCCGC
```

ANEXO C – SOLICITAÇÃO DE ESTUDO DE VIABILIDADE PATENTÁRIA



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
 Presidência
 Vice-presidência de Produção e Inovação em Saúde
 Coordenação de Gestão Tecnológica



DECLARAÇÃO

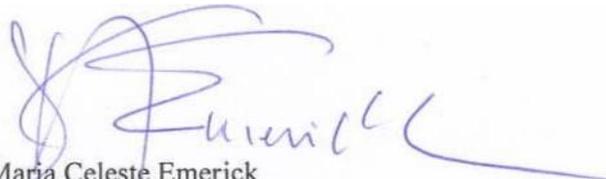
Declaro, para os devidos fins, que o conteúdo da tese de doutorado intitulada "Detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica por anticorpos anti-EtpA ligados a nanopartículas magnéticas", de autoria de Helber Abellini Astolpho, foi encaminhado à Coordenação de Gestão Tecnológica da Fundação Oswaldo Cruz (**código de solicitação SOL,,00700037.2016**) a fim de se verificar a pertinência da patenteabilidade dos resultados relacionados à mesma.

Conforme a legislação de Propriedade Industrial, Lei 9.279/96, em seu Art. 8º três requisitos devem ser preenchidos para a concessão de uma patente: novidade, atividade inventiva e aplicação industrial. Assim, para que o critério de novidade não seja prejudicado, orientamos que a referida tese NAO seja divulgada até:

- a) o término da análise por esta Coordenação, no caso dos resultados não serem passíveis de proteção; OU
- b) o pedido de patente ser depositado junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial, no caso da decisão ser pelo depósito de pedido de patente referente aos resultados da presente dissertação.

Informamos que o enquadramento como opção (a) ou (b), os quais influem nos prazos em que as divulgações podem ocorrer, lhes serão informados pelos respectivos interessados tão logo sejam conhecidos.

Rio de Janeiro, 01 de fevereiro de 2017.


 Maria Celeste Emerick
 Coordenação de Gestão Tecnológica
 Vice-Presidentência de Produção e Inovação em Saúde
 Presidência/FIOCRUZ