PRISCILA APARECIDA DAL POZO GOMES

**Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra Síndrome Hemolítica
Urêmica utilizando linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis*
capazes de expressar a toxina Stx2 de EHEC**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação do Departamento de
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas.

**SÃO PAULO
2007**

PRISCILA APARECIDA DAL POZO GOMES

**Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra Síndrome Hemolítica
Urêmica utilizando linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis*
capazes de expressar a toxina Stx2 de EHEC**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós Graduação do Departamento de
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas.

**SÃO PAULO
2007**

PRISCILA APARECIDA DAL POZO GOMES

**Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra Síndrome Hemolítica
Urêmica utilizando linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis*
capazes de expressar a toxina Stx2 de EHEC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

**SÃO PAULO
2007**

PRISCILA APARECIDA DAL POZO GOMES

**Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra Síndrome Hemolítica
Urêmica utilizando linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis*
capazes de expressar a toxina Stx2 de EHEC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira.

Co-orientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira

**SÃO PAULO
2007**

Este trabalho foi realizado sob a orientação da Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT-GENE 3), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da FAPESP (processo 05/57534-0).

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, por todo incentivo
e apoio incondicional
Ao Renato, pela paciência,
companheirismo e carinho

AGRADECIMENTOS

Esta tese é a realização do trabalho em conjunto com várias pessoas, cuja ajuda foi fundamental, e que sem elas a execução desta tese não seria possível.

À Profa Rita de Cássia Café Ferreira, por me oferecer esta oportunidade, pela orientação, paciência, conselhos, pela alegria da convivência com a sua presença no laboratório, zelando por todos os alunos, por estar sempre presente dando sugestões., contribuindo muito para o desenvolvimento não só do meu projeto, como também o meu desenvolvimento pessoal e profissional, sendo mais que uma orientadora e sim uma amiga.

Ao Prof. Luis Carlos de Souza Ferreira, pela co-orientação prestada neste projeto e também pelos ensinamentos, pelas críticas construtivas, pela paciência, pelas brilhantes idéias e sugestões.

Aos meus pais José Francisco Gomes e Eugênia Dal Pozo Gomes, por estarem sempre me incentivando, muitas vezes se sacrificando para que eu possa conquistar meus objetivos, por toda compreensão, pela confiança, pelo interesse, pelo zelo, pelo amor incondicional. Meus sinceros agradecimentos por TUDO que vocês me possibilitaram realizar.

Ao meu namorado Renato, por todo apoio desde a época da faculdade, por ser além do meu amor meu melhor amigo, e também um excelente companheiro, sempre disposto a me fazer companhia no laboratório, mesmo em um sábado à noite, sou muito agradecida a toda paciência demonstrada nesses seis anos de convivência e de carinho.

A Elisa Oshiro, por me ensinar o básico da prática em biologia molecular, pela confiança e também por compartilhar seus conhecimentos com toda calma e doçura.

A todo pessoal do grupo *Bacillus* Milene, Bruno, Renata, Juliano Paccas, Rafael e Wilson pelas interessantes discussões de artigos e reuniões, especialmente Juliano e Wilson por me ajudarem nas imunizações, nas sangrias e também pelas interessantes dicas, compartilhando suas experiências e ao Rafael por me ajudar nas purificações da proteína.

À Maria Elisabete Sbrogio de Almeida pelo exemplo de dedicação e seriedade, pela ajuda e ensinamentos.

Às amigas de Laboratório Catarina, Juliana, Liliana, Camila Santos pelas conversas científicas, pela ajuda esclarecendo muitas dúvidas, pelas interessantes sugestões e também pelas descontraídas conversas.

Aos demais colegas de laboratório: Otto, Marcelo, Aline, Cristiane, Roberto,

Suzana, Estela, Sabrina, Natália, Karine, Alexandre.

Ao meu melhor amigo Hugo e também vizinho de bancada, por todas as nossas conversas descontraídas, pelos conselhos, pela companhia no laboratório.

À minha companheira mesmo que por pouco tempo, Livia, por me ajudar na bancada e ao Robert, meu novo companheiro de projeto, pelo seu bom humor, e pelas interessantes sugestões de metodologia.

À Camila Calderon e a Loren pelo apoio técnico e também por manterem o laboratório sempre organizado.

Às minhas companheiras de república Renata e Bruna pela amizade, ajuda, pelos momentos de descontração e também pelo apoio e incentivo nos momentos desanimadores.

Ao pessoal do biotério de parasitologia Juliane e Israel pelo auxílio com os animais de experimentação e ao Carlos Augusto dos Santos do biotério de microbiologia pelo excelente trabalho ao cuidar dos animais com respeito e carinho.

Às secretarias do departamento Alice, Naíde e Aninha pelos excelentes serviços prestados.

À Profa. Dra Roxane do instituto Butantan, por emprestar os anticorpos e ao Prof. Dr. Antônio Pestana por ceder a cepa de *Escherichia coli*.

À Letícia Verônica Bentancor, minha companheira de projeto, por toda ajuda metodológica, mesmo estando na Argentina, você foi uma pessoa fundamental para a realização deste trabalho.

A todos da minha família, meus irmão Paulo e minha cunhada Mônica, minha irmã Patrícia e meu cunhado Maurício, pelo incentivo, aos meus tios e primos, especialmente meu tio Celestino pelo apoio financeiro no período em que estive sem bolsa, aos meus lindos sobrinhos que mesmo sendo muito pequeninhos sou muito grata por vocês existirem.

E a Deus, por estar sempre me protegendo e guiando.

“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”
Martin Luther King

GOMES, P. A. D. P. Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra Síndrome Hemolítica Urêmica utilizando linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* capazes de expressar a toxina Stx2 de EHEC. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

A Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) é a principal doença associada à infecção com linhagens de *Escherichia coli* produtoras de toxina de Shiga (Stx), doença para qual não há uma vacina ou tratamento específico. A toxina Stx é formada por uma subunidade A enzimaticamente ativa e uma B pentamérica responsável pela ligação da toxina na célula hospedeira. Neste trabalho propomos o uso de *Bacillus subtilis*, uma bactéria não patogênica e formadora de esporos, como veículo vacinal para a expressão de formas atóxicas da Stx2, sob o controle de um promotor induzível por estresse (*PgsiB*). Camundongos BALB/c imunizados com células vegetativas ou esporos das linhagens vacinais de *B. subtilis*, por diferentes vias, induziram baixos níveis de anticorpos anti-Stx em soro (IgG) e fezes (IgA). Avaliamos também o potencial imunogênico da Stx gerada em linhagens recombinantes de *E. coli*, mas os anticorpos gerados não foram capazes de neutralizar a toxina nativa. Os resultados indicam que formas alternativas de expressão e/ou o uso de adjuvantes são necessárias para gerar formulações vacinais eficazes contra a SHU.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, toxina de Shiga, Síndrome Hemolítica Urêmica

GOMES, P. A. D. P. Development of a new vaccine approach against Hemolytic Uremic Syndrome using genetically modified *Bacillus subtilis* strains expressing Stx2 EHEC toxin. 2007. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

The Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) is the main disease associated with infections with Shiga toxin (Stx) – producing *Escherichia coli* strain and no effective vaccine or treatment exist. The Stx toxin consist of an enzymatically active A subunit and a pentameric B subunit responsible toxin binding to host cells. In this work we propose the use of *Bacillus subtilis*, a harmless spore form bacteria as a vaccine vehicle for the expression atoxic forms of Stx2, under the control of stress inducible (*PgsiB*) promoter. BALB/c mice immunized with vegetative cells and spores of the *B. subtilis* vaccine strain using different immunization routes elicited low specific antibody levels at serum (IgG) or fecal extracts (IgA). We also investigated the immunogenic potencial of StxB purified from recombinant *E. coli* strain, but the induced anti-StxB antibodies did not neutralize the native toxin. The results indicate that alternative expression system or the incorporation of the adjuvants are required for the generation of vaccine formulation active against HUS.

Key words: *Bacillus subtilis*, Shiga toxin, Hemolitic Uremic Síndrome.

BSA – soro albumina bovina
B. subtilis – *Bacillus subtilis*
B. anthracis – *Bacillus anthracis*
CT – toxina colérica
DO – densidade óptica
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
HCl – ácido clorídrico
IgA – imunoglobulina de classe A
IgG – imunoglobulina de classe G
IPTG – isopropil-tio-β-galactosídeo
kDa - kilodaltons
KOAc – Acetato de potássio
KH₂PO₄ – fosfato de potássio
LB – Luria Bertani
LPS – lipopolissacarídeo
LT- toxina termo-lábil
mL – mililitros
mA - miliampère
MgSO₄.7H₂O
NaOH – hidróxido de sódio
(NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio
Na₂HPO₄ – fosfato de sódio
ng - nanograma
OPD – Ortho-Phenylenediamine
pb – pares de bases
PBS – tampão salina fosfato
PBST - tampão salina fosfato acrescido de 0,5 % de tween 20
PCR – reação em cadeia da polimerase
PEG – polietilenoglicol
PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride.
PSA – persulfato de amônio
p/v – relação peso volume
qsp – quantidade suficiente para
rpm – rotações por minuto
SDS – duodecil sulfato de sódio
SFB – soro fetal bovino
Stx – Shiga like toxin
SHU – Síndrome Hemolítica Urêmica
ST- toxina termo-estável
µg – microgramas
µL - microlitros
UFC – unidade formadora de colônia
V- volume
V. cholerae – *Vibrio cholerae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da Stx produzidas por linhagens de EHEC	19
Figura 2. Sequência do gene <i>stx2</i> de EHEC O157:H7 (EDL 933).	35
Figura 3. Amplificação dos fragmentos contendo os genes <i>stxB</i> e <i>stxΔAB</i>	44
Figura 4. Análise de restrição dos vetores plasmidiais construídos.	45
Figura 5. Representação esquemática dos vetores de expressão de StxB e StxΔAB para <i>B. subtilis</i>	46
Figura 6. Imunodeteção da StxB expressa por <i>B. subtilis</i> ou <i>E. coli</i>	47
Figura 7. Avaliação da resposta de anticorpos anti-StxB (IgG sérico) em camundongos imunizados com linhagens vacinais de <i>B. subtilis</i> por diferentes vias de administração.	48
Figura 8. Avaliação da resposta de anticorpos anti-StxB (IgA secretado) em camundongos imunizados com linhagens vacinais de <i>B. subtilis</i> por diferentes vias de administração.	49
Figura 9. Avaliação da resposta de anticorpos anti-StxB e anti-StxΔAB (IgG sérico) em camundongos imunizados com linhagens vacinais de <i>B. subtilis</i> pela via subcutânea.	50
Figura 10. Representação esquemática do vetor de expressão para <i>E. coli</i> pET22b e o fragmento StxΔAB inserido.	53
Figura 11. Detecção da expressão da proteína StxΔAB expressa por linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>	54
Figura 12. Detecção da expressão da proteína StxΔAB expressa por linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>	54
Figura 13. Determinação da solubilidade da StxΔAB expressas pelas linhagens de <i>E. coli</i> BL21SI e BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor pLStxB.	55
Figura 14. Purificação por cromatografia de afinidade ao níquel da toxina StxΔAB expressa por linhagens recombinantes de <i>E. coli</i>	56
Figura 15. Avaliação da resposta de anticorpos anti-StxΔAB (IgG sérico) em camundongos BALB/c imunizados com a proteína purificada a partir da linhagem recombinante de <i>E. coli</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados no presente trabalho.	34
Tabela 2. Lista de iniciadores com suas seqüências e sítio de restrição.....	34
Tabela 3. Avaliação in vitro da atividade neutralizante frente a toxina Stx dos soros dos animais imunizados com a linhagem vacinal de <i>B. subtilis</i> LDVP1 e LDVP2.	51
Tabela 4. Avaliação in vivo da atividade neutralizante frente a toxina Stx nativa dos soros dos animais imunizados com a linhagem vacinal de <i>B. subtilis</i> LDVP1.....	52
Tabela 5. Avaliação do efeito protetor frente à toxina Stx2 em camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais.....	52
Tabela 6. Avaliação in vivo da atividade neutralizante dos soros dos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB produzida em linhagem de <i>E. coli</i>	58

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia das infecções com linhagens de EHEC.....	17
1.2 Patogênese de EHEC	17
1.3 Infecção e disseminação de linhagens de EHEC.....	22
1.4 Estratégias terapêuticas contra a SHU.....	22
1.5 Vacinas contra SHU	23
1.6 <i>B. subtilis</i> como veículo vacinal	24
2 OBJETIVO	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Meio de cultura.....	29
3.2 Tampões, soluções e outros reagentes.....	30
3.3 Anticorpos e outros reagentes biológicos	33
3.4 Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados	33
3.5 Obtenção da sequência gênica	34
3.6 Iniciadores utilizados	34
3.7 Extração de DNA total de <i>E. coli</i>	35
3.8 Amplificação dos fragmentos de <i>stx</i> por PCR	36
3.9 Purificação e digestão do produto de PCR	36
3.10 Clonagem no vetor de expressão pHCMC03.....	36
3.11 Análise da expressão <i>in vitro</i>	37
3.11.1 Condições de expressão das proteínas StxB e Stx Δ AB nas linhagens de <i>B. subtilis</i> recombinantes.....	37
3.11.2 Imunodeteção em filtro de nitrocelulose (Immuno Blot)	37
3.12 Indução da expressão do gene <i>stxΔAB</i> em células de <i>E. coli</i>	38
3.13 Extração da proteína Stx Δ AB recombinante produzidas por linhagens de <i>E. coli</i>	39
3.14 Purificação da proteína Stx Δ AB produzidas em linhagens de <i>E. coli</i>	39
3.15 Dosagem da proteína Stx Δ AB recombinante produzidas em linhagens de <i>E. coli</i>	39
3.16 Produção de anticorpo anti- Stx Δ AB	40
3.17 Preparação da Stx2 para ensaios celulares e ensaios <i>in vivo</i>	40
3.17.1 Preparo do pellet	40
3.18 Análise das amostras de soro por ensaios de neutralização em células VERO.....	41

3.19 Ensaio de neutralização <i>in vivo</i>	41
3.20 Coleta e processamento das amostras	41
3.21 Ensaio de ELISA para a titulação de anticorpos produzidos contra a proteína Stx Δ AB	42
3.22 Imunização.....	43
4 RESULTADOS	44
4.1 Clonagem de derivados da Stx2 em <i>B. subtilis</i> e análise da expressão <i>in vitro</i>	44
4.1.1 Amplificação dos genes <i>stxB</i> e <i>stxΔAB</i>	44
4.1.2 Clonagem do <i>stx</i> em vetor de expressão	44
4.1.3 Análise da expressão <i>in vitro</i> da proteína StxB e Stx Δ AB da linhagem de <i>B. subtilis</i> LDVP1 e LDVP2	46
4.2 Avaliação do potencial vacinal das linhagens recombinantes de <i>B. subtilis</i> LDVP1 e LDVP2	47
4.2.1 Avaliação da produção de anticorpos séricos (IgG) e secretados na mucosa (IgA) em camundongos imunizados com a linhagem LDVP1	47
4.2.2 Avaliação da produção de anticorpos séricos (IgG) em camundongos imunizados com a linhagem LDVP2	49
4.2.3 Ensaio de soroneutralização da toxina Stx2 <i>in vitro</i> com anticorpos anti-StxB gerados em animais imunizados com a linhagem vacinal de <i>B. subtilis</i>	50
4.2.4 Ensaio <i>in vivo</i> de neutralização da toxina Stx2 com anticorpos anti-StxB gerado em animais imunizados com linhagens vacinais de <i>B. subtilis</i>	51
4.2.5 Ensaio de desafio com a toxina Stx2 purificada em animais imunizados subcutaneamente com as linhagens vacinais LDVP1 e LDVP2	52
4.3 Expressão de derivados de Stx em <i>E. coli</i>	53
4.3.1 Amplificação do gene <i>stxΔAB</i> e clonagem no vetor de expressão pET22b	53
4.3.2 Caracterização da produção da proteína Stx Δ AB pelas linhagens de	

<i>E. coli</i>	53
4.3.3 Solubilidade da proteína Stx Δ AB recombinante expressa em <i>E. coli</i>	54
4.3.4 Purificação da Stx Δ AB	55
4.3.5 Produção de anticorpos policlonais anti-Stx Δ AB em camundongos.....	56
4.3.6 Ensaios <i>in vivo</i> de neutralização da toxina Stx2 com anticorpos policlonais anti-Stx Δ AB gerados em camundongos BALB/c	57
5 DISCUSSÃO	59
6 CONCLUSÕES GERAIS	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das infecções com linhagens de EHEC

Nas últimas duas décadas EHEC emergiu como uma ameaça para a saúde pública mundial como causa de diarreia severa (colite hemorrágica) e, em alguns casos, desenvolvendo-se na SHU (Síndrome Hemolítica Urêmica), uma doença que pode ser letal, particularmente em crianças menores de 5 anos e idosos atingindo índices de mortalidade de 5 a 10% (KARMALI et al., 1983; PATON e PATON, 1998; PATON et al., 2000; CLEARY et al., 2004; BYUN et al., 2001; PERNA et al., 2001). A SHU é caracterizada por falência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática (KARMALI et al., 1983; KARMALI et al., 1985; NATARO e KAPER, 1998). Outras complicações agudas incluem apoplexia, diabetes mellitus e colite necrozante. Alguns indivíduos sofrem também de letargia, cefaléia severa, convulsão e encefalopatia. (PATON e PATON, 1998). Inicialmente pacientes infectados sofrem de diarreia aquosa que progride em um a dois dias para diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica, com dor abdominal severa e freqüente (PATON e PATON, 1998). Embora diálise peritoneal tenha significativamente reduzido a mortalidade, 12 a 30% terão seqüelas, incluindo disfunção renal crônica, hipertensão ou manifestações no Sistema Nervoso Central, (NATARO e KAPER, 1998; CAPOZZO et al., 2003).

Dentre os vários sorotipos de EHEC, linhagens do sorotipo O157:H7 receberam maior destaque pois foram responsáveis por surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Argentina, Chile e alguns países europeus (KARMALI et al., 1985; SCOTLAND et al., 1985; KARMALI et al., 1986; TAKEDA, 1997; BYUN et al., 2001; FRIEDRICH et al., 2002; FRASER et al., 2004).

1.2 Patogênese de EHEC

A habilidade de EHEC produzir lesão A/E, assim como em EPEC, é importante para que a bactéria possa causar a diarreia, característica codificada pela ilha de patogenecidade de 35 kb conhecida como região LEE, presente na maioria das EHEC (NATARO e KAPER, 1998). Entretanto, a capacidade de produção da citotoxina Stx é essencial para o desenvolvimento de diarreia sanguinolenta e colite hemorrágica por linhagens de EHEC (NATARO e KAPER, 1998). Esta citotoxina foi descrita pela primeira vez em 1977 em filtrados de linhagens de *E. coli* como sendo capaz de

induzir mudanças citopáticas irreversíveis em células Vero com propriedades distintas das toxinas LT e ST produzidas por linhagens de ETEC (KONOWALCHUK et al., 1977).

As citotoxinas produzidas por EHEC pertencem a dois grupos serologicamente distintos: Stx1 e Stx2. A Stx1 está relacionada a toxina de Shiga produzida por *S. dysenteriae* tipo I, já que é capaz de ser neutralizada por anticorpos preparados contra essa toxina. Por outro lado, a Stx2 não é capaz de ser neutralizada pelos anticorpos anti-toxina de Shiga e, portanto, possui composição e propriedades imunológicas distintas (KARMALI et al., 1986; SCOTLAND et al., 1985). A toxina Stx2 se subdivide em vários subtipos como, Stx2c, Stx2d, Stx2e, e Stx2f. As EHEC podem produzir as toxinas isoladamente ou em combinações. Algumas linhagens produzem apenas Stx1, outras Stx1 e Stx2, muitas apenas Stx2 e poucas produzem múltiplas toxinas incluindo Stx1, Stx2 e variantes de Stx2 (FRIEDRICH et al., 2002). Os variantes de Stx2 são diferenciados pela atividade biológica, reatividade imunológica e afinidade aos receptores ao qual se ligam (FRASER et al., 2004).

As toxinas da família Stx de EHEC são compostas por uma única subunidade A enzimaticamente ativa de peso molecular 32 kD, possuindo 319 aminoácidos e uma subunidade B ligante composta por um anel pentamérico, sendo que cada monômero tem 7,7 kD, totalizando 89 aminoácidos, responsável pela ligação da toxina ao receptor glicolípídico encontrado na superfície da célula alvo, mediando a entrada da Stx dentro da célula (FRASER et al., 2004; PATON e PATON, 1998). A toxina Stx1 de EHEC difere da Stx de *S. dysenteriae* apenas pela troca de um resíduo de serina na posição 45 por um resíduo de treonina (FRASER et al., 2004). No entanto, a homologia na sequência de aminoácidos entre Stx1 e Stx2 é de apenas 55% e 57% de identidade entre as subunidades A e B respectivamente (NATARO e KAPER, 1998).

Figura 1. Representação da Stx produzidas por linhagens de EHEC. Estão demonstrados na figura a subunidade A inteira, responsável pela atividade enzimática da Stx e a subunidade B pentamérica responsável pela ligação no receptor glicolipídico da célula hospedeira. O sítio ativo da subunidade A está demonstrado pela letra A rosa, o local de ligação entre os fragmentos A1 e A2 está demonstrado em amarelo e os locais de ligação do pentâmero B ao Gb3 está demonstrado pelos números em rosa. (reproduzido de FRASER et al., 2004).

Análise mutacional nos códons 32, 42 e 59 correspondendo aos aminoácidos arginina, alanina e glicina na subunidade B da toxina Stx2 abrogou atividade citotóxica da toxina, interferido na montagem e na sua capacidade de ligação ao receptor, porém coelhos inoculados com mutantes da Stx2 produziram anticorpos neutralizantes (PERERA et al., 1991). Alteração no ácido glutâmico 167 por um ácido aspártico na Stx2A e deleção dos aminoácidos 203 a 213 na toxina de Shiga não afetou a imunorreatividade nem a montagem da toxina, entretanto causou um significativo decréscimo na atividade citotóxica. Estas duas regiões possuem homologia entre a subunidade A da toxina de Shiga, Stx e ricina e pertencem ao sítio ativo da subunidade A. (JACKSON et al., 1990).

O receptor para a ligação da subunidade B de Stx1, Stx2 e seus variantes é o glicosfigolipídeo Gb3 (globotriaosil ceramida Gal α [1-4]Gal β [1-4]glicosil ceramida), com exceção da Stx2e que liga preferencialmente ao Gb₄. (FRASER et al., 2004; PATON et al., 2000). Em humanos, o glicosfigolipídeo Gb3 é encontrado em elevadas concentrações no tecido renal e células de endotélio microvascular (PATON et al., 2000), trato gastrointestinal e outros órgãos como cérebro, pâncreas e pulmões (BIELASZEWSKA et al., 1997).

A Stx é capaz de mediar sua própria entrada na célula por um processo dependente da concentração da toxina e endocitose clatrina dependente, este efeito estimulatório próprio de captação da Stx parece ser mediado por um aumento do recrutamento do complexo Stx-Gb3 por clatrina coated pits. A subunidade A da Stx ligada a célula via pentâmero B é responsável pela estimulação da endocitose, portanto sua presença demonstra ser crucial para a captação da Stx pela célula ocorrer (TORGERSEN et al., 2005).

A Stx assim como algumas outras toxinas são endocitadas pela célula antes de traslocar para o citossol e exercerem seus efeitos tóxicos. Toxinas como a diftérica e o antras entram no citossol em resposta ao baixo pH encontrado no endossomo, enquanto outras toxinas, tal como a toxina de planta ricina e de bactérias como a toxina colérica e a de Shiga são transportadas não apenas para o endossomo, mas retrogradamente através do aparato de Golgi até o retículo endoplasmático antes da parte enzimaticamente ativa entrar no citossol. (SANDVIG e DEURS, 2002).

O prognóstico da SHU causado por linhagens de EHEC está envolvido com a produção de Stx (BUTTERTON et al., 1997; PATON et al., 2001). Inicialmente ocorre a colonização do intestino pela EHEC sem a invasão de tecidos mais profundos. Localmente a Stx produzida é absorvida pela circulação se ligando a tecidos alvos específicos de acordo com o conteúdo de Gb3 (PATON et al., 2000). Após a ligação do pentâmero da subunidade B ao receptor, a célula do hospedeiro internaliza toda a toxina ocorrendo a dissociação da subunidade A em dois novos fragmentos A1 (27,5 kD) e A2 (4,5 kD) (FRASER et al., 2004). O fragmento A1 tem atividade N-glicosilásica, clivando uma ligação N-glicosídica do resíduo de adenina na posição 4324 do RNA ribossômico eucarioto 28S da subunidade ribossomal 60S (MARCATO et al., 2001; SU et al., 1992; TAKEDA, 1997). Desta forma, a toxina inibe o alongamento da cadeia peptídica tornando-se citotóxica para as células-alvo (MARCATO et al., 2001; PATON e PATON, 1998).

Danos nas células endoteliais predominantemente nos glomérulos renais desempenham importante papel na patogênese da doença, porém danos neurológicos representam a consequência mais relevante e intratável da SHU ocorrendo em mais de 30% das vítimas. Recentemente tem sido reportado que mediadores inflamatórios, tal como IL-1 α , IL-1 β (Interleucinas), TNF- β , TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), são sinergisticamente citotóxicos a células endoteliais das veias umbilicais humanas (HUVEC), (EISENHAUER et al., 2001; LOUISE e OBRIG, 1991; VAN DE KAR et al., 1992) e células endoteliais cerebrais humanas (HBEC) (EISENHAUER et al., 2001) promovendo um aumento na expressão do receptor Gb3. (VAN DE KAR et al., 1992).

TNF- α e IL-1 induzem a atividade da enzima galactosyl-transferase, a qual é necessária para a síntese de Gb3 em células endoteliais (VAN DE KAR et al., 1995). A presença de LPS também aumenta a citotoxicidade da Stx em células endoteliais humanas (LOUISE e OBRIG, 1992), esse mecanismo deve-se ao fato de LPS induzir a expressão de IL e TNF pelos macrófagos.

Em adição aos efeitos nas células endoteliais, células mesangiais também são alvos da Stx e estão envolvidas nas complicações histopatológicas glomerulares de SHU, a presença de citocinas próinflamatórias IL-1 α e TNF- α potencializa o efeito inibitório da Stx na síntese protéica nestas células (SIMON et al., 1998).

Três locais de ligação ao Gb3 são encontrados em cada monômero da subunidade B, totalizando 15 locais de ligação ao receptor. Estudos avaliando a ligação e citotoxicidade através de mutações sítio dirigidas sugerem que os dois locais periféricos 1 e 2 são mais importantes que o local 3 localizado próximo ao centro do pentâmero (BAST et al., 1999). Interessantemente Stx1 tem afinidade 10 vezes maior de ligação ao Gb3 em comparação com Stx2 (CLEARY, 2004; TESH et al., 1993), portanto, Stx1 liga-se mais eficientemente nas células do epitélio intestinal causando diarreia sanguinolenta e Stx2 poderia circular na corrente sangüínea, alcançando os rins ricos em Gb3, causando a SHU (FRASER et al., 2004).

Evidências sugerem que Stx2 é responsável pela maior severidade da doença do que Stx1 sozinha ou Stx1 e Stx2 (ACHESON et al., 1995; BIELASZEWSKA et al., 1997; FRIEDRICH et al., 2002). Linhagens que produzem Stx2 ou Stx2c são encontradas em pacientes com diarreia ou SHU, porém as que produzem os variantes Stx2d e Stx2e são associadas a diarreias em humanos, mas não a SHU, linhagens produtoras de Stx2f parecem não ser patogênicas aos humanos (FRIEDRICH et al., 2002).

Em ratos Stx2 demonstra uma LD₅₀ 400 vezes menor que Stx1 quando a administração é intravenosa ou intraperitoneal (TESH et al., 1993). A letalidade em de ratos infectados pela via oral com uma linhagem de EHEC que produza Stx1 e Stx2 é devida apenas à produção de Stx2 (WADOLKOWSKI et al., 1990). Em lisados celulares ocorre um predomínio de Stx1, enquanto que Stx2 é encontrada em sobrenadantes da cultura, quando ambas as toxinas são produzidas pela mesma linhagem. (STROCKBINE et al., 1986).

A toxina Stx1 é reprimida por um complexo co-repressor ferro-proteína Fur no nível transcricional e baixa temperatura (NATARO e KAPER., 1998). Quando mudanças nas condições de pH e temperatura são usadas como parâmetros da estabilidade de Stx, Stx1 parece ser menos estável que Stx2, já que sua atividade é

reduzida em 99% após aquecimento a 65 °C, pH 3, enquanto que Stx2 requer aquecimento a 95 °C (TESH et al., 1993). A atividade promotora de Stx2 não é afetada pela osmolaridade, pH, tensão de oxigênio, acetato, níveis de ferro ou fonte de carbono, porém há um pequeno efeito do aumento da temperatura. (MÜHLDORFER et al., 1996).

1.3 Infecção e disseminação de linhagens de EHEC

Bovinos representam o principal reservatório de EHEC produtoras de Stx e muitas infecções são atribuídas à ingestão de alimento contaminado (carne, água, frutas, vegetais) e até mesmo contato pessoa-pessoa (TAKEDA, 1997; ISHIKAWA et al., 2003; POTTER et al., 2004). A transmissão pode ocorrer principalmente através do consumo de carne contaminada crua ou mal cozida, como o hambúrguer e ingestão de alimentos crus. A infecção também pode ocorrer durante contato com águas contaminadas (TAKEDA, 1997). Levantamento epidemiológico revelou que linhagens de EHEC são também prevalentes no trato gastrointestinal de outros animais domésticos incluindo ovelhas, porcos, cachorros e gatos. A grande maioria dos bovinos é exposta a infecção com linhagens de EHEC em algum momento da vida (PATON e PATON, 1998). A avaliação das fazendas de gado leiteiro no estado de São Paulo revelou que 97% das linhagens de EHEC isoladas carregavam genes Stx2 ou Stx1/Stx2, revelando a ocorrência desse reservatório epidemiológico em nosso estado (IRINO et al., 2005).

A dose de infecção de algumas EHEC está na ordem de 1 a 100 UFC, muito inferior quando comparado a linhagens de ETEC ou EPEC. Tal dose de infecção se deve à resistência a acidez do estômago. Sabe-se que a exposição de certas bactérias entéricas incluindo *E. coli* a pH baixo induz uma resposta de tolerância ao ácido (PATON e PATON, 1998).

1.4 Estratégias terapêuticas contra a SHU

Análogos de Gb3 sintéticos covalentemente ligados a partícula de sílica insolúvel (Synsorb PK) competitivamente adsorve a toxina do intestino, sendo freqüentemente submetido a triagem clínica (KITOV et al., 2000). Entretanto o Synsorb PK é mais eficiente na neutralização da Stx1 (KARMALI, 2004). Os receptores análogos podem ser administrados oralmente bloqueando Stx produzida no intestino ou parenteralmente bloqueando Stx circulante (KARMALI, 2004). KITOV et al. (2000)

desenvolveram um carboidrato ligante solúvel em água (denominado STARFISH) com atividade inibitória de 1 a 10^7 superior em relação ao Synsorb PK, protegendo camundongos quando injetado subcutaneamente em combinação com dose letal de Stx1, mas não quando injetado com Stx2 (KITOV et al., 2000). No entanto uma modificação do STARFISH denominada “Daisy” protege camundongos contra ambas Stx1 e Stx2 quando administrado parenteralmente (MULVEY et al., 2003). Polímeros dentrímeros referido como “SUPER TWIGS” no qual 6 moléculas do trissacarídeos Gb3 presentes em diferentes orientações apresentam função neutralizadora para Stx1 e Stx2 (KARMALI, 2004). “Gb3 polymer” desenvolvido por WATANABE et al. (2004), possui atividade muito maior que o “SUPER TWIGS 6” e Synsorb PK em ambas Stxs representando uma alternativa oral sintética de prevenção contra o desenvolvimento de SHU, sendo eficaz em animais submetidos a uma dieta pobre em proteínas 3 dias após a infecção ter estabelecido com dose letal de *E. coli* O157:H7.

Estratégias terapêuticas objetivando a neutralização da Stx têm sido empregadas como o uso de bactérias recombinantes, expressando o receptor glicolípídeo mimetizado adsorvendo e neutralizando Stx com alta eficiência, (PATON et al., 2000) sendo posteriormente confirmado usando a bactéria morta por formaldeído (PATON et al., 2001).

1.5 Vacinas contra SHU

Imunização em coelhos com toxóides Stx1 ou Stx2 revelou *in vivo* capacidade de proteção nos animais submetidos aos desafios com a toxina homóloga e heteróloga independente do resultado negativo *in vitro* (LUDWIG et al., 2002), porém esta proteção cruzada era verificada apenas pela produção de anticorpos contra a subunidade A (BIELASZEWSKA et al., 1997). O uso de Stx 1 com mutações nos aminoácidos 167 e 170 da subunidade A apresentando toxicidade reduzida gerou anticorpos protetores (ISHIKAWA et al., 2003), assim como o uso de quimeras StxA2/StB1 com alterações nos aminoácidos 77, 167 e 170 também foram capazes de conferir proteção quando os animais eram desafiados com ambas toxinas (Stx1 e Stx2) (SMITH et al., 2006).

Peptídeos sintéticos correspondendo a três seqüências sobrepostas da região N-terminal da subunidade B da toxina de Shiga conjugados com proteína, carregador sintético ou polimerizado com glutaraldeído mostraram atividades neutralizantes contra a mesma. (HARARI et al., 1988), resultado semelhante foi obtido utilizando peptídeos sintéticos correspondendo os aminoácidos 28 a 40 que neutralizaram a

atividade tóxica da Stx1 porém não teve nenhum efeito sobre a Stx2 (BOYD et al., 1991). Imunização transcutânea usando Stx1B juntamente com a toxina termolábil de ETEC foi capaz de gerar proteção em coelhos. (ZHU et al., 2007).

A subunidade B da toxina Stx1 administrada juntamente com mutante atóxico da toxina colérica produziu anticorpos capazes de impedir a ligação da toxina ao receptor Gb3 (BYUN et al., 2001), demonstrando habilidades de produzir anticorpos tanto sistêmicos (IgG) quanto secretados (S-IgA), fato que foi aumentado com a substituição do uso de Stx1B na sua forma oligomérica (IMAI et al., 2004), o mesmo ocorrendo com a administração da toxina Stx1B conjugada a uma proteína carregadora administrada com adjuvante Ribi, conferindo proteção nos animais imunizados (MARCATO et al., 2005). O uso da subunidade B da Stx2 também demonstrou-se capaz de gerar anticorpos protetores em animais desafiados com a toxina homóloga (MARCATO et al., 2001).

A utilização de linhagens bacterianas como veículo vacinal expressando a subunidade B tanto da toxina de Shiga quanto da Stx1 e STx2 de EHEC já é estudada em estratégias vacinais, como exemplo temos o uso de *V. cholerae* expressando StxB1 sob o controle de um promotor constitutivo gerando anticorpos neutralizantes (BUTTERTON et al., 1997) e o uso de linhagens vivas atenuadas de *S. typhimurium* carregando o híbrido LamB-StxB resultando na produção de níveis elevados de anticorpos secretados e sistêmicos específicos para a subunidade B da Stx (SU et al., 1992).

O uso de plasmídeos em vacinas de DNA codificando os 85 primeiros códons do gene para Stx2A mais o gene íntegro da subunidade B revelou propriedades imunogênicas e protetoras em camundongos, utilizando como adjuvante vetor expressando o fator de estimulação de colônia de monócitos e granulócitos (pGM-CSF), este efeito adjuvante foi notável nos animais imunizados. Esta foi a primeira vacina de DNA desenvolvida para combater a Síndrome Hemolítica Urêmica (CAPOZZO et al., 2003).

1.6 *B. subtilis* como veículo vacinal

O uso de vetores bacterianos vivos para a expressão de antígenos vacinais representa uma abordagem simples e segura capaz de distribuir moléculas ao sistema imunológico de mucosa, principal porta de entrada de patógenos entéricos, como a EHEC. Além disso, o uso de linhagens naturalmente não patogênicas, como bactérias lácticas ou *Bacillus subtilis*, traz uma tranquilidade maior aos usuários e pode conferir

efeitos terapêuticos probióticos a infecções entéricas (FISCHETTI et al., 1996; OGGIONI et al., 1999).

Proteínas heterólogas podem ser expressas na superfície do esporo bacteriano, gerando um novo e poderoso sistema de dispersão de moléculas bioativas. O uso de esporos de *B. subtilis* como veículo de expressão e transporte de antígenos vacinais é vantajoso, pois podem sobreviver a extremas temperaturas, pressão, dessecação, exposição a solventes, radiação, salinidade elevada e outros (NICHOLSON et al., 2000), estes atributos fazem dos esporos um veículo atrativo para a distribuição de antígenos heterólogos, permitindo a sobrevivência ao extremo ambiente como o trânsito pelo trato gastrointestinal, (DUC et al., 2003) além de possibilitar o estoque em estado dessecado por longos períodos à temperatura ambiente, sendo de fácil administração, oferecendo vantagens adicionais em relação a bactérias lácteas.

B. subtilis não é patogênico, normalmente encontrado no solo, é empregado como probiótico em países da Europa e Ásia, possui um enorme conhecimento acumulado sobre sua fisiologia e genética, o que facilita a manipulação gênica voltada para a expressão do antígeno heterólogo tanto na forma de esporo como na fase vegetativa (DUC et al., 2003; OGGIONI et al., 2003).

O grande conhecimento sobre a genética e fisiologia de *B. subtilis* e a existência de vetores capazes de promover a expressão de proteínas possibilitou sua utilização em diferentes abordagens vacinais, como a expressão de genes que codificam o antígeno protetor (PA) de *B. anthracis*, produzindo eficaz proteção ao desafio com esporos virulentos (IVIN e WELKOS, 1986; IVINS et al., 1990). O uso de *B. subtilis* carregando na capa do esporo fragmentos da toxina tetânica (ISTICATO et al., 2001) ou a subunidade B da toxina LT (MAURIELLO et al., 2004) induziram anticorpos em animais imunizados e também resposta celular contra a toxina tetânica (MAURIELLO et al., 2007). Esporos também possuem a capacidade de “primar” camundongos por via oral demonstrando uma estratégia oral/parenteral capaz de estimular respostas de anticorpos locais e sistêmicas (CIABATINNI et al., 2004) e podem sobreviver ao trânsito através do estômago, após o qual ele germinaria e depois na fase vegetativa expressa o antígeno heterólogo, isto foi demonstrado usando como modelo a β -galactosidase (DUC et al., 2003) e a toxina termo-lábel de ETEC (PACCEZ et al., 2006, 2007) em que os esporos ao germinarem induziram resposta local e sistêmica.

Esporos não apenas geram imunidade humoral, mas também produzem resposta imune celular, pois podem germinar em tecidos linfóides associados ao

intestino (placas de Peyer's), interagindo com macrófagos, células dendríticas ou células B. A ativação da resposta imune celular é particularmente interessante para o controle de infecção de patógenos com crescimento intracelular, fator adicional que fortalece o uso de *B. subtilis* como veículo para antígenos heterólogos (DUC et al., 2003).

As linhagens de EHEC como patógenos de mucosas não invasivos são alvos atrativos para estratégias vacinais que estimulam a resposta imune mucosal (BUTTERTON et al., 1997). A imunização por via oral e/ou nasal é recomendada contra tais patógenos, oferecendo melhores níveis de resposta imune local (IgA), além da sistêmica, dispensa o uso de agulhas, minimização dos efeitos adversos, no caso do uso de esporos, baixo custo em transporte e estocagem, condições importantes para programas de vacinação em países em desenvolvimento como o Brasil (FERREIRA et al., 2005).

O uso de *B. subtilis* como estratégia vacinal mostrou-se bem sucedido com linhagens capazes de codificar antígenos oriundos de ETEC sob o controle do promotor *PgsiB* (*glucose starvation inducible*), ativado em condições de estresse ambiental, como o ambiente ácido do estômago ou à ausência de glicose no intestino (PACCEZ et al., 2006, 2007). A ativação transcricional do gene *gsiB* é dependente de um fator sigma alternativo (σ^B) produzido na fase estacionária em condições de choque salino, térmico, limitação de oxigênio, glicose e fosfato, e tratamento com etanol (HALDENWANG e LOSICK, 1980; JÜRGEN et al., 1998; MAUL et al., 1995; VÖLKER et al., 1994). Um novo sistema de expressão episomal desenvolvido pelo grupo mostra-se superior a estratégias anteriores voltadas para a produção de proteínas heterólogas em *B. subtilis*, pois conferiu estabilidade estrutural e segregacional a altos níveis de expressão (NGUYEN et al., 2005).

No Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas da USP, o uso de *B. subtilis* como estratégia vacinal mostrou-se bem sucedido com linhagens capazes de codificar antígenos oriundos de ETEC sob o controle do promotor do gene *gsiB*, ativado em condições de estresse ambiental, como o ambiente ácido do estômago ou à ausência de glicose no intestino (PACCEZ et al., 2006, 2007). Portanto neste trabalho avaliamos o uso de linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis* como vetores para a expressão da formas atóxicas da Stx2 de EHEC como uma nova estratégia vacinal contra a SHU, mediante a construção de linhagens recombinantes de *B. subtilis* capazes de expressar fragmentos derivados da subunidade B da Stx2 sem o peptídeo sinal e uma forma recombinante que fusione a subunidade B a 31 aminoácidos finais da subunidade A, a partir de vetor de expressão baseado no promotor do gene *gsiB* de

B. subtilis. Determinação da capacidade de expressão *in vitro* dos antígenos vacinais pelas linhagens recombinantes de *B. subtilis*. Avaliação da expressão dos antígenos vacinais após imunização por via oral, nasal e parenteral com linhagens recombinantes de *B. subtilis*, tanto em células vegetativas como em esporos, por meio da determinação das respostas de anticorpos específicos anti-Stx sistêmicos (IgG sérico) ou secretados (IgA fecal).

2 OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivo a avaliação do uso de linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis* como vetores para a expressão da formas atóxicas da toxina Stx2 de EHEC como uma nova estratégia vacinal contra a SHU.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura

- **Meio completo LB** (Luria Bertoni) foi usado rotineiramente para o cultivo das linhagens *in vitro* (Sambrook et al., 1989). Quando necessário foi adicionado aos meios ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (10 µg/mL) e neomicina (25 µg/mL). O meio sólido foi obtido acrescentando-se 2% de ágar ao meio LB.

- **Meio (DMEM)** Dulbecco's Modified Eagle's Medium foi usado para lavar e manter as células durante os ensaios de neutralização *in vitro*, foi preparado segundo recomendações do fabricante (Sigma) e suplementado com penicilina (10 U.I./mL) e estreptomicina (10 µg/mL) (Cultilab), sendo acrescentado ao meio 10% de soro fetal bovino inativado conforme a necessidade.

- **Meio Indutor de Proteína**

Solução estoque:

ZY – Triptona 1%

Extrato de levedura 0,5%

NPS – 20 x (100mL)

6,6 g (NH₄)₂SO₄

13,6 g KH₂PO₄

14,2 g Na₂HPO₄

Ajustar pH para 6,75

5052 - 50 x

25 mL de glicerol

2,5 g de glicose

10 g de lactose

73 mL de água

1M de MgSO₄.7H₂O

Solução de uso (100mL)

ZY 93 mL

1M MgSO₄ 0,1 mL

5052 - 50 x 2 mL

NPS – 20 x 5 mL

3.2 Tampões, soluções e outros reagentes

Soluções para mini-preparação de DNA-plasmidiano

- Solução P1

2mL de EDTA pH 8 (0,5M)

2,5 mL de Tris-HCl pH 8 (2M)

Água mili-Q qsp 100 mL

Autoclavar 20 minutos a 120° C

Depois de esfriar agregar RNase para uma concentração final de 100 µg/mL. a partir da solução estoque de RNase a 10 mg/mL. Armazenar à 4° C.

- Solução P2

200 µg/mL NaOH 10 N

500 µL SDS 20 %

Água mili-Q qsp 100 mL

- Solução P3

29,4 g de KOAc

11,4 mL de ácido acético glacial

Água mili-Q qsp 100 mL

Homogeneizar e autoclavar 20 minutos a 120° C

Armazenar à 4° C.

Soluções para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

- Tampão de amostra – 2% SDS

4% 2-mercaptoetanol

10% Glicerol

0,06 M Tris-HCl pH 6,8

4 mM EDTA

Azul de bromofenol adicionado livremente.

- Solução de persulfato de amônio (PSA) – 10% em água.

- Gel de separação (17,5%): 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 1,25 mL

	Acrilamida/Bis C=1,6%	2,92 mL
	Água bidestilada	0,35 mL
	SDS 10%	50 µL
	PSA 10%	75 µL
	TEMED	2 µL
• Gel de empilhamento (5%): 0,5 M Tris-HCl pH 6,8		0,375 mL
	Acrilamida/Bis C=5%	0,5 mL
	Água bidestilada	2,05 mL
	SDS 10%	30 µL
	PSA 10%	30 µL
	TEMED	3 µL

Soluções para coloração do gel

- Solução para coloração: 0,25% de Azul de Coomassie Blue R- 250
50% metanol
10% ácido acético
- Solução para descoloração: 5% metanol
7,5 % ácido acético

Soluções para purificação da proteína StxB.

- Tampão A
Na₂HPO₄ 20mM
NaCl 500mM
Imidazol 20mM
- Tampão B
Na₂HPO₄ 20mM
NaCl 500mM
Imidazol 1M

Soluções para imunodeteção em filtro (imunoblot)

- Tampão de transferência: 39mM Glicina
20% Metanol

0,0375 % SDS

48 mM Tris-HCl

- Tampão para bloqueio e hibridização com anticorpo: 5% de leite desnatado em pó em PBS-Tween 20 a 0,05%.

- Solução de revelação de quimioluminescência para peroxidase foi utilizada o Kit SuperSigma West Pico (Pierce). A solução final continha 500µL do reagente A e 500 µL do reagente B, misturados no momento do uso em câmara escura.

Soluções para ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Para os ensaios com antígenos ligados à fase sólida foram empregadas placas NUNC Maxisorp.

- Tampão de cobertura: PBS: 7,45 mM Na_2HPO_4
2,5 mM NaH_2PO_4
145 mM NaCl
pH 7,2. Solução estoque concentrada 10x.

- Tampão de bloqueio e diluição dos anticorpos:
0,1% de BSA em PBS
0,05 % de Tween 20

- Tampão de Lavagem (PBST) = PBS acrescido a Tween 20 a 0,05%

- Tampão de revelação: ácido nítrico 0,1M 4,9 mL
 Na_2HPO_4 0,2M 5,1 mL
Água destilada 10 mL
pH 5,0

No momento do uso foi adicionado 10 mg de OPD (concentração final 1mg/mL) e 10 µL de H_2O_2 (concentração final 0,012%).

- Solução de bloqueio da reação: ácido sulfúrico 1M.

3.3 Anticorpos e outros reagentes biológicos

Os anticorpos usados neste trabalho foram: (i) O anticorpo anti-Stx Δ AB gerado em camundongo foi produzido em nosso laboratório e usado na maior parte dos experimentos na diluição 1:3.000. (ii) O anticorpo anti-Stx2 gerado em coelho foi produzido no laboratório da Profa. Dra. Roxane no Instituto Butantan e gentilmente cedidos para os ensaios de imunodeteção. (iii) Outros anticorpos empregados anti-IgG de coelho e de camundongo produzidos em cabra, conjugados à peroxidase (Gibco-BRL) e anti-IgA de camundongo, produzido em cabra, conjugado a peroxidase (Sigma). Estes conjugados foram empregados na diluição 1:3.000 nos ensaios de Imunodeteção e ELISAS.

3.4 Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados

Linhagens de EHEC O157:H7 (EDL 933) e *B subtilis* utilizadas durante a execução do projeto foram descritas previamente (Shimotsu e Henner, 1986; Kim et al., 1996; Mogk et al., 1996; Paccez et al., 2005). Para amplificação dos fragmentos necessários à expressão de Stx recombinantes foram empregados iniciadores específicos e DNA extraído de uma linhagem de EHEC O157:H7 EDL 933W, gentilmente cedida pelo Prof. Antonio Fernando Pestana de Castro. O plasmídeo utilizado foi o pHCMC03 (tabela 1) que permite a expressão do antígeno codificado a partir do promotor induzido por condições de estresse *gsiB* (Ngyen et al., 2005). Linhagens de *E. coli* recombinantes albergando os plasmídeos pLStxB e pLStx2 codificam o gene *stx Δ AB* clonado no vetor pET22b, produzindo uma proteína recombinante acrescida de cauda de histidina na porção C-terminal e operon *stx2* clonado no vetor pGEMT-EASY, produzindo a toxina Stx2 sob o comando de promotor próprio. (tabela 1) Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Marina Palermo da Academia Nacional de Medicina. Para todos os ensaios realizados as linhagens bacterianas foram cultivadas em meio LB (Luria Bertoni), por aproximadamente 18h a 37 °C sob agitação intensa (200 rpm).

Tabela1. Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados no presente trabalho.

Linhagens	Plasmídeos	Características
<i>E. coli</i> EDL 933	-	Alberga o bacteriófago 933w codificador da toxina Stx2
<i>E. coli</i> K-12	pLStxΔAB	Proteína StxΔAB recombinante
<i>E. coli</i> K-12	pLStx2	Proteína Stx2
<i>B. subtilis</i> 1012	pHCMC03	Promotor <i>gsiB</i> induzível por estresse
LDVP1	pLDVStxB	Fragmento da toxina Stx2 (subunidade B)
LDVP2	pLDVStxΔAB	Fragmento da toxina Stx2 (subunidade ΔA e subunidade B)

3.5 Obtenção da sequência gênica

A sequência do gene *stx2* foi obtida no site da KEGG (Kioto Encyclopedia of Genes and Genomes):

ece:Z1464 *stx2A*; shiga-like toxin II A subunit encoded by bacteriophage BP-933W

ece:Z1465 *stx2B*; shiga-like toxin II B subunit encoded by bacteriophage BP-933W

3.6 Iniciadores utilizados

Relação dos iniciadores do gene *stx* de *E. coli* empregados, com a descrição de sua orientação e sítio de restrição (sublinhado) encontram-se na tabela 2, imediatamente após o sítio de restrição Bgl II foi inserido o códon de iniciação. A sequência do gene *stx2* se encontra na figura 2. Para a amplificação do fragmento clonado no vetor Pet22b utilizou-se a técnica de mutagênese que permite a deleção e em seguida a união dos fragmentos utilizando iniciadores sobrepostos pela técnica do SOEing (Splicing by Overlap Extension) utilizando os sítios de restrição *Nde* e *Xho*.

Tabela 2 - Lista de iniciadores com suas sequências e sítio de restrição

Iniciadores	Sequência 5' - 3'	Sítio de restrição
StxB2Fw	TCTGTTAATAGATCTATGGCGGATTGTG	<i>Bgl II</i>
StxB2Rv	CGAATCAGACGTCGCCTCAGTCATTATT	<i>Aat II</i>
StxΔAB2 Fw	CAGATAGCTAGATCTATGCCTGTTATAAAA	<i>Bgl II</i>
StxΔA Fw	AGGAACACCTGCATATGAAGTGT	<i>Nde I</i>
StxΔA Rv	CCGCTCGAGTTTACCCGTTGT	-
StxB2Fw	GGGTAATAAAGGAGTTCCATATGAAGAAG	-
StxB2Rv	CCGCTCGAGGTCATTATTAAACAG	<i>Xho I</i>
ON3	GGCCATGGATCCCTATCGAGACACGTTTGGCTG	-

ATGAAGTGTATATTATTTAAATGGGTACTGTGCCTGTTACTGGGTTTTCTTCGGTATCCTATTCCCG
 GGAGTTTACGATAGACTTTTCGACCCAACAAAGTTATGTCTCTTCGTTAAATAGTATACGGACAGAG
 ATATCGACCCCTCTTGAACATATATCTCAGGGGACCACATCGGTGTCTGTTATTAACCACACCCAC
 CGGGCAGTTATTTTGTCTGTGGATATACGAGGGCTTGATGTCTATCAGGCGCGTTTTGACCATCTTCG
 TCTGATTATTGAGCAAATAATTTATATGTGGCCGGTTTCGTTAATACGGCAACAAATACTTTCTACC
 GTTTTTCAGATTTTACACATATATCAGTGCCCGGTGTGACAACGGTTTCCATGACAACGGACAGCAG
 TTATACCACTCTGCAACGTGTCGACGCGCTGGAACGTTCCGGAATGCAAATCAGTCGTCACCTCACT
 GGTTTCATCATATCTGGCGTTAATGGAGTTCAGTGGTAATACAATGACCAGAGATGCATCCAGAGC
 AGTTCTGCGTTTTGTCACTGTCAACAGCAGAAGCCTTACGCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTCGT
 CAGGCACTGTCTGAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGACCTCACTCTGAAC
 TGGGGCGCAATCAGCAATGTGCTTCCGGAGTATCGGGGAGAGGATGGTGTGAGAGTGGGGAGAAT
 ATCCTTTAATAATATATCAGCGATACTGGGACTGTGGCCGTTATACTGAATTGCCATCATCAGGGG
 GCGCGTTCTGTTGCGCCGTGAATGAAGAGAGTCAACCAGAATGTCAGATAACTGGCGACAGGCC
 TGTATAAAAAATAACAATACATTATGGGAAAGTAATACAGCTGCAGCGTTTCTGAACAGAAAGTCA
 CAGTTTTTATATACAACGGGTAAATAAAGGAGTTAAGCATGAAGAAGATGTTTATGGCGGTTTTATTT
 GCATTAGCTTCTGTAAATGCAATGGCGGCGGATTGTGCTAAAGGTAAATTGAGTTTTCCAAGTATA
 ATGAGGATGACACATTTACAGTGAAGGTTGACGGGAAAGAATACTGGACCAGTCGCTGGAATCTGC
 AACCGTTACTGCAAAGTGCTCAGTTGACAGGAATGACTGTGACAATCAAATCCAGTACCTGTGAAT
 CAGGCTCCGGATTGCTGAAGTGCAGTTTAATAATGACTGAGGCATAACCTGATTCCG

Figura 2. Sequência do gene *stx2* de EHEC O157:H7 (EDL 933). Bases em vermelho codificam a subunidade A, em verde a subunidade B e em preto o trecho não codificador. As regiões sombreadas representam as bases que pareiam com os iniciadores utilizados nas clonagem dos genes *stxB* e *stxΔAB* as regiões sublinhadas representam o local onde foram inseridos os sítios de restrição Bgl II e Aat II.

3.7 Extração do DNA total de *E. coli*

A extração do DNA total das amostras foi realizada segundo protocolo elaborado por Llop e colaboradores (1999) para o isolamento do material genético de bactérias endofíticas. Neste ensaio utilizamos culturas bacterianas crescidas em 2 mL de meio LB por 18h a 37 °C sob agitação de 200 rpm. . As células de foram coletadas por centrifugação a 10000g por 10 minutos, e ressuspensas em 0,5 mL de tampão de extração. A suspensão foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 1h. Após a remoção das células (centrifugação a 5000g, 5 minutos a 4 °C) o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL e foi adicionado um volume de isopropanol. O material foi homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por mais 1h, para precipitação do DNA total. O material foi submetido a centrifugação por 10 minutos a 13000g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi seco no vácuo por aproximadamente 10 minutos. Após a secagem, o material foi ressuscitado em 50 µL de água MQ. A análise do material foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) com coloração de brometo de etídio.

3.8 Amplificação dos fragmentos *stx* por PCR

Para a amplificação por PCR da sequência gênica estudada, foram utilizados iniciadores específicos detalhados acima, baseando-se na sequência do gene que codifica para a Stx depositada no KEGG. As reações em 50 µL continham 2 µL de extrato total de DNA, 10 pmol de iniciadores (*StxB2* e *StxΔAB2*), 2,5 mM de MgCl₂, 1 mM de dideoxinucleotídeos trifosfatados, 1 U de *Taq* polimerase e seu respectivo tampão na concentração final de 1x (Fermentas). O programa de PCR estabelecido para a amplificação, denominado Stx, envolveu um passo de desnaturação a 95 °C por 5 seg, seguidos de 30 ciclos de 45 seg a 95 °C, 30 seg a 52 °C e 90 seg a 72 °C, com um passo final de extensão de 10 min a 72 °C. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1,2% (m/v) e corados com brometo de etídio.

3.9 Purificação e digestão do produto de PCR

Os produtos de PCR obtidos, cujo tamanho em pares de bases é de 229pb e 393pb para *stxB2* e *stxΔAB2* respectivamente foram purificados utilizando-se o PROMEGA Gel extraction kit conforme instruções do fabricante. Alíquotas de DNA contendo 100 ng dos produtos de amplificação purificados foram tratadas com endonucleases de restrição Bgl II e Aat II (Fermentas) de acordo com as recomendações do fabricante. Nova purificação foi realizada para retirar o sal dos tampões das enzimas para realizar a ligação do produto final no vetor.

3.10 Clonagem no vetor de expressão pHCMC03

O vetor de expressão pHCMC03 foi preparado para albergar os insertos *stxB* e *stxΔAB*, por meio da dupla digestão com as enzimas BamHI e AatII. Os produtos das digestões foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% (m/v) e corados com brometo de etídio. Com os produtos de PCR *stxB* e *stxΔAB* já digeridos e purificados realizou-se a ligação utilizando-se a razão molar inserto:vetor de 4:1 e as condições da reação seguiram as instruções do fabricante para o uso da T4 ligase (Fermentas). Toda a mistura da ligação foi usada na transformação de células de *E. coli* DH10B quimiocompetente (CaCl₂) e após incubação de 18h a 37 °C, foram obtidas em média 100 colônias na placa de LB contendo ampicilina (100µg/mL). Os

recombinantes foram confirmados por meio de análise de restrição dos plasmídeos obtidos por mini-preparação em gel de agarose 0,8% (m/v) e seqüenciamento. Os plasmídeos recombinantes contendo os insertos foram denominados de pHCMCstx2B e pHCMCstx2AB. Os plasmídeos recombinantes foram introduzidos por transformação nas linhagens 1012 de *B. subtilis* e selecionados pela resistência ao cloranfenicol codificada pelo vetor. Os clones selecionados foram analisados quanto à expressão in vitro dos antígenos codificados com anticorpos anti-Stx2 gentilmente cedidos pela Dra. Palermo.

3.11 Análise de expressão in vitro

3.11.1 Condições de expressão das proteínas StxB e StxΔAB nas linhagens de *B. subtilis* recombinantes

As linhagens de *B. subtilis* recombinantes albergando o plasmídeos (pLDVStxB e pLDVStxΔAB) foram crescidas por uma noite em meio LB. Inóculos com diluição inicial de 1:100, feitos em meio LB . acrescido de cloranfenicol (10µg/mL) e neomicina (25mg/mL), incubadas a 37 °C sob agitação (200 rpm) até início do crescimento exponencial (DO_{600nm} 0,6). Posteriormente, as culturas foram submetidas à indução por choque térmico à 48 °C por 3 horas. Em todos os casos foram retiradas amostras antes da indução e após a indução. Amostras destas culturas foram lisadas em tampão de lise (Tris-HCl 250mM, pH 7,5 20% de sacarose e lisozima (800µg/mL) por 15 minutos a 37 °C, posteriormente foram acrescidos 10 µL de SDS a 10% e feita uma nova incubação a 37 °C por 15 minutos. Todo o material utilizado para análise em quantidades semelhantes a 10⁸ UFC, foram dissolvidos em tampão de amostra e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 17,5%, em seguida transferidas para filtro de nitrocelulose e posteriormente reveladas com anticorpo policlonal específico para a StxB

3.11.2 Imunodeteção em filtro de nitocelulose (Immuno Blot)

Os extratos obtidos da indução em *B. subtilis* foram submetidos a corrida em eletroforese de proteínas em géis desnaturantes de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Foi utilizada a concentração final de 17,5% de poliacrilamida nos géis de corrida. A coloração foi feita com solução de 0,25% de azul de Coomassie BBR em etanol. Para o ensaio de Immuno Blot foi utilizada a técnica descrita por Towbin et al (1979). Após a separação

das proteínas por eletroforese, estas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amershan) em solução de transferência por 1 hora com corrente aplicada de 60 mA utilizando o aparelho Multiphor II (Pharmacia). Após a transferência os sítios não específicos de ligação do anticorpo à membrana foram bloqueados em solução de 2% de leite desnatado dissolvido em PBS e 0,05% de Tween 20 (Sigma) por 12 horas a 4 °C. Posteriormente, foram feitas 3 ciclos de lavagens com PBS-T com duração de 5 minutos para cada lavagem. A seguir, a membrana foi incubada por 1 hora, em agitação à temperatura ambiente com anticorpo policlonal anti-StxB na diluição 1:3000 em solução bloqueadora. A membrana foi lavada novamente 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e incubada com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase durante uma hora em agitação a temperatura ambiente. Para revelação por quimioluminescência a membrana foi lavada 3 vezes (5 minutos cada) com PBS-T. A detecção foi feita com o uso de um reagente de revelação (Kit SuperSigma West Pico da Pierce), seguindo as recomendações do fabricante, dentro de um cassete fotográfico e recoberto por uma folha de acetato de celulose. A revelação foi feita em câmara escura e pela exposição a filmes por 15 minutos e submetidos à revelação com revelador fotográfico (GBX, Kodak).

3.12 Indução da expressão do gene *stx4AB* em células de *E. coli*

A partir da clonagem do *stx4AB* no vetor de expressão pET22b, foram feitos testes de indução em 8 linhagens diferentes de *E. coli*: BL21(DE3)RIL, BL21(DE3), BL21(DE3)STAR, CyC(DE3)pLysS, BL21(DE3)GROEL, BL21SI, BL21(DE3)RP, BL21(DE3)pLysS utilizando dois protocolos de indução baseados na adição de IPTG ou lactose (meio indutor).

A indução por IPTG foi feita através do inoculo 1/100 erlenmeyers de 125 mL contendo 10 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100µg/mL), incubadas a 37 °C, 200 rpm em agitador orbital até a densidade óptica (D_{600nm}) de 0,6, seguiu-se a adição do agente indutor IPTG, a uma concentração final de 1mM e procedeu-se a uma nova incubação por 4h. Alíquotas foram retiradas antes (T_0) e depois da indução (T_2) e após centrifugação a 9.500 x g por 5 minutos os precipitados foram ressuspensos em tampão de amostra e analisados por migração eletroforética em poliacrilamida. A indução pelo meio indutor foi feita nas mesmas condições de cultivo descritas acima, porém sem adição de IPTG e sem monitorar a densidade óptica, pois o crescimento deve ser realizado por 12 horas.

3.13 Extração de proteína Stx Δ AB recombinante produzidas em linhagens de *E. coli*

As linhagens mais promissoras na produção da proteína StxB BL21SI, BL21(DE3)pLysS foram submetidas a uma nova indução em volume de 1L, nas mesmas condições descritas acima utilizando ambos protocolos de indução. Os precipitados foram ressuspensos em 10% do volume inicial em tampão A e as células foram tratadas durante 30 minutos com lisozima (100 μ g/mL) no gelo e lisadas com 6 pulsos de 15 seg com 5 seg de intervalo entre os pulsos e 40% de amplitude em sonicador (Branson Digital Sonifer 450D). Os extratos bacterianos foram clarificados por centrifugação a 15.000 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado e o sobrenadante foram analisados por migração eletroforética em poliacrilamida para determinar a solubilidade da proteína StxB e confirmados em ensaios de Immuno Blot..

3.14 Purificação da proteína Stx Δ AB recombinante produzidas em linhagens de *E. coli*

As frações solúveis foram filtradas em membranas com poros de 0,22 μ m de diâmetro (Sartorius) eluídas em tampões com concentrações diferentes de imidazol, tampão A e tampão B e purificadas por afinidade com resina de sefarose impregnada por níquel utilizando o FPLC (Fine Performance Liquid Chromatography) AKTA (Amersham Pharmacia). As frações coletadas foram analisadas em SDS-PAGE. Para a retirada do imidazol as frações purificadas foram transferidas para um filtro de 5000MW (Amicon, Millipore) e lavadas 20 x o volume inicial com PBS através da centrifugação a 5000 g.

3.15 Dosagem da proteína Stx Δ AB recombinante produzidas em linhagens de *E. coli*

Para a quantificação da proteína utilizamos o kit BCA (Pierce, Rockford, IL, USA) e como padrão a albumina bovina na concentração de 2mg/mL, com diluições sucessivas. A leitura da densidade óptica foi realizada a 600 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystem).

3.16 Produção de anticorpo anti-Stx Δ AB

Após a obtenção e quantificação da proteína StxB purificada foi realizada a imunização de camundongos para a produção de anticorpos anti-Stx. Realizamos quatro diferentes procedimentos de imunização administrando por via subcutânea 2 μ g e 10 μ g da proteína StxB na sua conformação nativa e na sua conformação linear utilizando 16 camundongos BALB/c separados em quatro grupos. A proteína StxB foi preparada na proporção 1:1 com os adjuvantes (completos ou incompletos) administrando um volume de 100 μ L por animal para a administração da proteína na sua conformação linear (desnaturada) realizou-se aquecimento a 100° C por 10 minutos. A primeira imunização foi feita com adjuvante completo de Freund (CFA) e as demais com incompleto (IFA). As doses foram administradas nos dias 0, 10, 17 e 30. Os soros foram obtidos após punção do plexo oftálmico nos dias 25 e 40 após a 3ª e 4ª dose respectivamente.

3.17 Preparação de Stx2 para ensaios celulares e ensaios in vivo

3.17.1 Preparo do pellet

Linhagens recombinantes de *E. coli* albergando o plasmídeo pLStx2 permitiu a produção da proteína Stx2 na sua forma ativa, para isso foi realizada após crescimento da cultura em 250 mL em meio LB por 12 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. As células foram submetidas a centrifugação 14.000 X g por 20 minutos e ressuspensas em 10 mL de PBS acrescido de PMSF a uma concentração final de 1mM. Para lisar as células, sem prejudicar a atividade tóxica da Stx2, o extrato celular é submetido a 4 ciclos de congelamento e descongelamento a -80 °C. Em seguida realiza a precipitação da proteína com 1V da solução de (NH₄)₂SO₄ saturado 70% sendo adicionadas ao longo de 1 hora sobre agitação e mantidas a 0 °C. Deixar a amostra agitando no gelo por mais 1 hora. Centrifuga a amostra a 14.000 X g por 20 minutos. Ressuspende o precipitado em PBS acrescido de PMSF na concentração já descrita. Para a retirada do (NH₄)₂SO₄ foi realizada a diálise da amostra utilizando 2 litros de volume total de tampão PBS, sendo feitas duas trocas de tampão. Dialisando com 1L de PBS primeiramente por 1 ou 2h e depois deixa 12h dialisando com 1L restante.

3.18 Análise das amostras de soro por ensaios de neutralização em células VERO

Amostras de soro foram serialmente diluídas em DMEM numa microplaca iniciando com a diluição de 1:5 num volume de 75µL por poço, o extrato contendo a toxina Stx2 na diluição final de 1:2500 em DMEM foi misturado 75µL às amostras de soro, deixamos incubar por 1 hora a 37° C e 1 hora a 4° C controles contendo apenas meio e apenas toxina também foram realizadas. Após a incubação 150µL de cada poço nas placas de diluição foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo uma monocamada de 10^4 células Vero, e incubadas com 5% de CO₂ a 37° C por 48 horas. Após a incubação descartou-se cuidadosamente o meio e a monocamada foi lavada com 100 µL de PBS, acrescentou-se 100 µL de cristal violeta e incubou por 15 minutos a 37° C, para lavagem as placas foram submergidas em água duas vezes, acrescentou 100 µL de ácido acético e incubou a 20 minutos à temperatura ambiente. A leitura da densidade óptica foi realizada a 550 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystem).

3.19 Ensaios de neutralização *in vivo*

Para determinar a capacidade neutralizante do anticorpo *in vivo*, amostras de soro foram incubadas com a proteína Stx2 por 1 hora a 37° C e 1 hora a 4° C, após a incubação inoculou-se pela via intravenosa (plexo retro-orbital) a mistura soro mais proteína Stx2 em camundongos BALB/c naive. Utilizou-se os soros na proporção 1/10 (Stx2/soro) dos animais imunizados oralmente com as linhagens 1012 e LDVP1, assim como o soro dos animais imunizados com a proteína StxB linear na proporção 1/10 e 1/100 (animais que obtiveram os maiores títulos) e o soro anti-Stx2 cedido pela Prof^a Dr^a Roxane na proporção 1/100, 1/1000, 1/10000 e como controle negativo 1 grupo de animais recebeu apenas a proteína Stx2. Avaliou-se a sobrevida destes animais diariamente durante 7 dias.

3.20 Coleta e processamento das amostras

- Sangue

A coleta de sangue dos camundongos foi realizada por punção retro-orbital, obtendo-se cerca de 500 µL de sangue total. O sangue foi mantido em estufa a 37° C

por 30 minutos e 4° C até a retração do coágulo, e centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm a 4° C. O soro foi estocado a -20° C.

- Fezes

Para a coleta das fezes dos camundongos para a análise de anticorpos, os camundongos ficaram aproximadamente 3 horas em caixa plástica higienizada seca, sem maravalha e sem água, as fezes foram coletadas em tubos de 15 mL previamente pesados. Os extratos fecais foram pesados e ressuspensos em PBST + leite 5% na proporção 1:2 (p/v). Os tubos foram agitados em agitador orbital e centrifugados a 5000 rpm durante 20 minutos a 4° C. O sobrenadante (extrato fecal) foi estocado a -20° C.

- Lavado Pulmonar

Para a coleta de IgA secretado, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, com o auxílio de uma seringa injetou 200µL de solução salina 0,9% para lavar o pulmão, através da traquéia, após a lavagem a solução foi recolhida e estocada a -20° C.

3.21 Ensaios de ELISA para a titulação de anticorpos produzidos contra a proteína Stx Δ AB

Poços de uma microplaca de poliestireno Maxisorp (Nunc) foram sensibilizados por 12h a 4° C com 100ng/poço da proteína StxB purificada e lavada em tampão PBS. As placas foram lavadas três vezes com PBST. Após a lavagem foi feito o bloqueio adicionando-se 200 µL de PBST com 0,1% de BSA durante 30 minutos a 37° C, após novo ciclo de lavagem (3x), foi adicionado o pool de soros dos animais imunizados na diluição de 1/200 em solução de PBST com 0,1% de BSA e incubadas a temperatura ambiente, por 1 hora a 37° C. Depois de um novo ciclo de lavagem (3x), foram adicionados 100 µL por poço do segundo anticorpo conjugado a peroxidase em solução bloqueadora na diluição já descrita para o anticorpo secundário e incubado por 1h a 37° C em atmosfera úmida. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com PBST. A revelação foi feita com 50 µL por poço da solução reveladora por 20 minutos, à temperatura ambiente e no escuro e interrompida com 50 µL por poço de 1M de ácido sulfúrico. A leitura da densidade óptica foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystem).

3.22 Imunização

Os procedimentos para a detecção das propriedades imunomoduladoras da StxB foram determinados da seguinte forma: Grupos de 4 camundongos BALB/c fêmeas com 9-10 semanas foram inoculados oral, subcutânea e nasal com células vegetativas ou esporos de linhagens de *Bacillus subtilis* transformadas com pLDVStxB, obtidos junto ao biotério da Faculdade de Medicina Veterinária – USP. Os regimes de imunização para ambas as células ou esporos eram baseados em artigos previamente descritos para o uso de *B. subtilis* como veículo vacinal (Duc et al., 2004; Mauriello et al., 2004). A imunizações orais eram feitas em alíquotas de 0,5 mL de suspensão bacteriana contendo aproximadamente 1×10^{10} UFC de células vegetativas e 1×10^9 UFC de esporos usando uma gavagem intragástrica, os camundongos receberam 0,5mL de solução de bicarbonato de sódio 0,1M 30 min antes da administração das células vegetativas. Animais receberam quatro doses consistindo de quatro etapas de três consecutivas doses nos dias 1-3, 14-16, 28-30 e 42-44. Para o regime de imunização nasal e subcutânea, os animais eram inoculados nos dias 1, 14, 28 e 42 com 20 μ L (10^8 UFC) e 200 μ L (10^9 UFC) respectivamente. As coletas fecais e de sangue (punção na região retro-orbital) foram feitas antes de qualquer tratamento (pré-imune) e nos dias 13, 27, 41, 55.

4 RESULTADOS

4.1 Clonagem de derivados da Stx2 em *B. subtilis* e análise da expressão *in vitro*

4.1.1 Amplificação dos genes *stxB* e *stxΔAB*

Para a avaliação do papel imunológico da toxina Stx2 de EHEC O157:H7 (EDL 933) expressas por linhagens de *B. subtilis* foi feita a etapa de amplificação dos genes *stxB* e *stxΔAB* por PCR. Foram gerados dois fragmentos: um fragmento de 229 pb (*stxB*) correspondendo a subunidade B sem o peptídeo sinal e um fragmento de 393 pb (*stxΔAB*) correspondendo a subunidade B inteira mais os 31 aminoácidos finais do fragmento A2. O desenho dos iniciadores utilizou 28 a 30 pares de bases homólogas às seqüências gênicas encontradas no KEGG, com exceção dos sites de restrição e a inserção do códon iniciador (ATG). Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas *Bgl II* e *Aat II*, possibilitando a ligação no vetor de expressão pHCMC03. (Figura. 3)

Figura 3. Amplificação dos fragmentos contendo os genes *stxB* e *stxΔAB*. Amostras: 1 - Marcador de massa molecular de 100 pb (Promega); 2 - fragmento contendo o gene *stxΔAB*; 3 - fragmento contendo o gene *stxB*.

4.1.2 Clonagem do *stx* em vetor de expressão

Após a obtenção dos fragmentos já digeridos e purificados, partimos para a clonagem no vetor de expressão epissomal pHCMC03 de *B. subtilis*, no final a expressão do gene heterólogo é feita sob o controle do promotor do gene *gsiB*. Os fragmentos foram inseridos no sítio múltiplo de clonagem entre as seqüências reconhecidas pelas enzimas *BamHI* e *Aat II* do vetor. Os clones recombinantes foram

identificados pelo perfil de restrição com a enzima *Ava II* que contém dois sítios de clivagem no vetor e um sítio de clivagem adicional nos fragmentos *stxB* e *stxΔAB*.

A confirmação da clonagem após a digestão com a enzima *Ava II* gerou bandas de 222pb, 2423pb e 4684pb e 222pb, 2259pb e 4684pb correspondendo aos plasmídeos recombinantes com os clones *stxΔAB* e *stxB*, respectivamente (Figura 4) e as linhagens de *B. subtilis* transformadas com os plasmídeos foram denominados LDVP1 e LDVP2 (figura 5). Nos clones confirmados pelo perfil de restrição realizou-se o seqüenciamento utilizando iniciador (ON3) que se anela em posição anterior ao promotor *gsiB* e o iniciador reverso (StxB2Rv), utilizado na amplificação do gene como indicado na tabela 1.

Figura 4. Análise de restrição dos vetores plasmidiais construídos. Amostras: 1 – Marcador de massa molecular de 1Kb (Invitrogen); 2 – vetor pHCMC03 clivado com *Ava II*; 3 – vetor pLDVStx Δ AB clivado com *Ava II*, 4 – vetor pLDVStxB clivado com *Ava II*.

Figura 6. Imunodeteção da StxB expressa por *B. subtilis* ou *E. coli*. Amostras 1 – Extrato celular da linhagem LDVP1; 2 – Extrato celular da linhagem LDVP2; 3 - StxB purificada (31,25 ng); 4 - StxB purificada (62,5 ng); 5 - StxB purificada (125 ng); 6 - StxB purificada (250 ng); 7 - StxB purificada (500 ng); 8 – Extrato celular de EHEC O157:H7 (EDL 933); extrato celular da linhagem *E. coli* K-12 PLStx2.

4.2 Avaliação do potencial vacinal das linhagens recombinantes de *B. subtilis* LDVP1 e LDVP2

4.2.1 Avaliação da produção de anticorpos séricos (IgG) e secretados na mucosa (IgA) de camundongos imunizados com a linhagem LDVP1

Apesar do baixo nível de expressão das proteínas StxB e Stx Δ AB, realizamos ensaios de imunização pelas vias oral, nasal e subcutânea com camundongos empregando as linhagens recombinantes de *B. subtilis*. As respostas de IgG sérico anti-StxB em animais imunizados com a linhagem LDVP1 estão apresentados na figura 7. Animais imunizados pela via oral com células vegetativas submetidas ao choque térmico apresentaram um pequeno aumento nos níveis de anticorpos anti-StxB (título de 73,5), os animais imunizados pela via subcutânea apresentaram (título de 98) melhores resultados com os esporos, não havendo nenhuma resposta na imunização com células vegetativas. Em animais submetidos à imunização nasal obtivemos um aumento nos níveis de anticorpos anti-StxB após a quarta dose com células vegetativas. Os animais que receberam esporos apresentaram uma pequena resposta após a segunda dose que não foi detectado nas doses subseqüentes.

A resposta de IgA secretado anti-StxB mostrou um melhor resultado nos camundongos que receberam células vegetativas pela via oral, especificamente após a terceira dose (título de 184). Por outro lado, os animais que receberam esporos não responderam à vacina, os camundongos imunizados pela via nasal também não produziram resposta de IgA secretado contra a StxB, como demonstrado na figura 8.

Figura 7. Avaliação da resposta de anticorpos anti-StxB (IgG sérico) em camundongos imunizados com linhagens vacinais de *B. subtilis* por diferentes vias de administração. Camundongos BALB/c foram imunizados com a linhagem vacinal de *B. subtilis* LDVP1 com célula vegetativa (■) ou esporos (■) pelas vias oral, subcutânea ou nasal como indicado na figura. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra StxB determinados com misturas das amostras colhidas dos animais de cada grupo. Todos os animais imunizados pela via oral receberam doze doses enquanto que os animais imunizados pela via parenteral e nasal receberam quatro doses da vacina, conforme indicado no texto. Os valores de títulos encontrados nas amostras pré-ímmunes e nas amostras dos animais imunizados com linhagem *B. subtilis* 1012 foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os valores representam as médias e os respectivos erros padrão.

Figura 8. Avaliação da resposta de anticorpos anti-StxB (IgA secretado) em camundongos imunizados com linhagens vacinais de *B. subtilis* por diferentes vias de administração. Camundongos BALB/c foram imunizados com a linhagem vacinal de *B. subtilis* LDVP1 com célula vegetativa (■) ou esporos (■) pela via oral e nasal como indicado na figura. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgA específicos contra StxB determinados com misturas das amostras colhidas dos animais de cada grupo. Todos os animais imunizados pela via oral receberam nove doses da vacina, conforme indicado no texto. Os valores de títulos encontrados nas amostras pré-ímmunes e nas amostras dos animais imunizados com linhagem *B. subtilis* 1012 foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os valores representam as médias e os respectivos erros padrão.

4.2.2 Avaliação da produção de anticorpos séricos (IgG) em camundongos imunizados com a linhagem LDVP2

Apesar da pouca resposta obtida nos camundongos imunizados com a linhagem vacinal LDVP1, optamos em repetir a imunização apenas pela via subcutânea utilizando a linhagem LDVP2 para verificarmos se a presença do fragmento A2 alteraria a resposta imunológica nos camundongos imunizados subcutaneamente. Como demonstrado na figura 9, animais imunizados com esporos da linhagem LDV2 geraram respostas de IgG séricos contra a Stx após 2 doses com 10^{10} esporos recombinantes. Curiosamente os valores de IgG anti-Stx diminuíram para níveis não significativos após a 3ª e 4ª dose da vacina.

Figura 9. Avaliação da resposta de anticorpos anti-StxB e anti-StxΔAB (IgG sérico) em camundongos imunizados com linhagens vacinais de *B. subtilis* pela via subcutânea. Camundongos BALB/c foram imunizados com a linhagem vacinal de *B. subtilis* LDVP2 com célula vegetativa (■) ou esporos (■) pela via subcutânea como indicado na figura. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra StxΔAB determinados com misturas das amostras colhidas dos animais de cada grupo. Todos os animais imunizados pela via subcutânea receberam quatro doses da vacina, conforme indicado no texto. Os valores de títulos encontrados nas amostras pré-ímmunes e nas amostras dos animais imunizados com linhagem *B. subtilis* 1012 foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os valores representam as médias e os respectivos erros padrão.

4.2.3 Ensaio de soroneutralização da toxina Stx2 *in vitro* com anticorpos anti-StxB gerados em animais imunizados com linhagens vacinais de *B. subtilis*

Apesar dos níveis baixos de anticorpos específicos para a StxB obtidas em animais imunizados com as linhagens LDVP1, examinamos o efeito inibidor destes soros sobre a toxina Stx2 nativa. Para este propósito, a atividade neutralizante foi avaliada *in vitro* em ensaios com células VERO. Misturas das amostras de soro colhidas dos animais imunizados pela via oral com a linhagem vacinal de *B. subtilis* (LDVP1) e pela via subcutânea (LDVP2) foram diluídas serialmente incubadas como descrito em materiais e métodos com alíquotas do extrato cru da toxina capazes de causar alterações morfológicas em células VERO. Soros controle anti-Stx2 gerados em coelho com a toxina purificada e dos animais imunizados com a linhagem *B. subtilis* 1012 albergando o vetor vazio, foram usados no ensaio. Como demonstrado na tabela 3, não houve atividade neutralizante com os soros nos animais imunizados com a linhagem vacinal de *B. subtilis*. Apenas o soro anti-Stx2 demonstrou atividade neutralizante para a ação citotóxica da Stx sobre as células VERO.

Tabela 3. Avaliação in vitro da atividade neutralizante frente a toxina Stx dos soros dos animais imunizados com a linhagem vacinal de *B. subtilis* LDVP1 e LDVP2.

Soros	Título de IgG	Maior diluição empregada	Atividade neutralizante *
1012 4 ^a dose vegetativa	0	1:5	-
LDVP1 3 ^a dose vegetativa	32,5	1:5	-
LDVP1 4 ^a dose vegetativa	73,5	1:5	-
LDVP2 2 ^a dose esporos	918	1:5	-
LDVP2 3 ^a dose esporos	156	1:5	-
Anti-Stx2	40.136	1:300	+
Anti-StxB	45764	1:5	-

* Atividade neutralizante avaliada após 48 horas de incubação da monocamada de célula VERO com a toxina Stx2 previamente incubada por duas horas com os soros testes, como descrito em material e método.

4.2.4 Ensaios *in vivo* de neutralização da toxina Stx2 com anticorpos anti-StxB gerados em animais imunizados com linhagens vacinais de *B. subtilis*

Misturas das amostras de soro colhidas dos animais imunizados com células vegetativas das linhagens *B. subtilis* 1012 e LDVP1 foram incubadas com a toxina Stx2 como descrito em material e métodos. Camundongos BALB/c adultos foram inoculados pelo plexo orbital nas diluições indicadas na tabela 4. Acompanhou-se a sobrevivência dos animais durante uma semana. Como demonstrado na tabela 4 não houve proteção nos animais imunizados com a linhagem vacinal LDVP1, apesar de 1 animal ter sobrevivido por 1 dia a mais em relação ao grupo controle, não houve uma proteção evidente pois o mesmo aconteceu com o grupo tratado com o soro da linhagem *B. subtilis* 1012.

Tabela 4. Avaliação *in vivo* da atividade neutralizante frente a toxina Stx nativa dos soros dos animais imunizados com a linhagem vacinal de *B. subtilis* LDVP1.

Soros	diluição	Sobrevivência *						
		1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
Toxina Stx2		+++	+++	---				
<i>B. subtilis</i> 1012	1/10	+++	+++	+--	---			
<i>B. subtilis</i> LDVP1	1/10	+++	+++	+--	---			
Soro anti-Stx2	1/10000	+++	+++	+++	+--	---		
Soro anti-Stx2	1/1000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Soro anti-Stx2	1/100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

*Sobrevivência dos animais acompanhados por um período de sete dias. Cada animal sobrevivente (+) ou morto (-) foi monitorado diariamente como indicado na tabela.

4.2.5 Ensaios de desafio com a toxina Stx2 purificada em animais imunizados subcutaneamente com as linhagens vacinais de *B. subtilis* LDVP1 e LDVP2.

Os animais que receberam pela via subcutânea as linhagens vacinais LDVP1 e LDVP2 e também a linhagem controle 1012 foram desafiados com a toxina Stx2. No período de 96 horas todos os animais morreram, como demonstrado na tabela 5. O resultado demonstra que a imunização pela via parenteral com a linhagem vacinal de *B. subtilis* não foi capaz de gerar imunidade protetora frente à toxina Stx2 nativa.

Tabela 5. Avaliação do efeito protetor frente à toxina Stx2 em camundongos imunizados com diferentes formulações vacinais.

Linhagens *	Sobrevivência **			
	24h	48h	72h	96h
1012 (vegetativa)	+++++	+++++	+++--	-----
LDVP1 (vegetativa)	+++++	+++++	+++++	-----
LDVP2 (vegetativa)	++++	++++	+++--	-----
1012 (esporos)	++++	++++	+++--	-----
LDVP1 (esporos)	++++	++++	+++--	-----
LDVP2 (esporos)	++	++	++	--

* Linhagens vacinais de *B. subtilis* empregadas nas imunizações dos camundongos desafiados com a toxina Stx2. Os animais foram imunizados com 4 doses pela via subcutânea com células vegetativas ou esporos com linhagens de *B. subtilis* LDVP1 e LDVP2.

** Sobrevivência dos animais desafiados com Stx2 acompanhados por um período de até 96 horas. Cada animal sobrevivente (+) ou morto (-) foi monitorado diariamente como indicado na tabela.

4.3 Expressão de derivados de Stx em *E. coli*

4.3.1 Amplificação do gene *stx* Δ AB e clonagem no vetor de expressão pET22b

Para a produção da proteína StxB em linhagens de *E. coli* utilizamos o vetor pET22b transfetado com fragmento de DNA, responsável pela codificação da toxina Stx Δ AB, clonados entre os sítios de restrição *Nde* I e *Xho* I conforme indicado na figura 9. A proteína codificada é formada pela subunidade B mais os 31 aminoácidos subunidade A2. O plasmídeo recombinante pLStx Δ AB (Figura 10) foi utilizado para transformarmos diferentes linhagens de *E. coli*.

Figura 10. Representação esquemática do vetor de expressão para *E. coli* pET22b e fragmento Stx Δ AB inserido. O fragmento com o gene *stx* Δ AB foi clonado nos sítios de restrição *Nde* I e *Xho* I do vetor pET22b dando origem ao vetor pLStx Δ AB.

4.3.2 Caracterização da produção da proteína Stx Δ AB pelas linhagens de *E. coli*

A expressão da proteína recombinante foi feita após transformação de 8 linhagens de *E. coli* e duas formas de indução da proteína StxB: a adição de lactose ao meio de cultura durante todo o crescimento bacteriano ou a adição de IPTG ao meio de cultura quando a bactéria atinge a sua fase logarítmica de crescimento. A indução pela adição de IPTG durante o crescimento bacteriano mostrou-se satisfatória apenas com as linhagens BL21SI, BL21(DE3)pLysS, não ocorrendo nenhuma

expressão nas demais linhagens utilizadas como demonstrado na figura 11. Entretanto a adição da lactose no meio de cultivo durante todo o crescimento bacteriano demonstrou resultados satisfatórios com todas as linhagens testadas, com exceção das linhagens BL21(DE3) e BL21(DE3)RP (figura 12). Os dois sistemas de indução (adição de IPTG ou lactose) mostraram-se adequados à produção da Stx Δ AB da proteína Stx obtendo-se um excelente rendimento nas linhagens BL21SI, BL21(DE3)pLysS em ambas condições testadas.

Figura 11. Detecção da expressão da proteína Stx Δ AB expressa por linhagens recombinantes de *E. coli*. A expressão da proteína recombinante foi feita pela adição de IPTG na DO600 0,5 e incubação por 2h ou 4h após a indução e verificada por imunodetecção em filtro utilizando o soro policlonal anti-Stx produzido em camundongo. Amostras: 1-BL21(DE3)RIL, 2-BL21(DE3)GROEL, 3-BL21(DE3)STAR, 4-BL21(DE3)pLysS, 5-StxB purificada, 6-CyC(DE3)pLysS, 7-BL21(DE3), 8-BL21(DE3)RP, 9-BL21SI, 10-StxB purificada.

Figura 12. Detecção da expressão da proteína Stx Δ AB expressa por linhagens recombinantes de *E. coli*. A expressão da proteína recombinante foi feita pela adição de lactose ao meio e verificada por imunodetecção em filtro utilizando o soro policlonal anti-Stx produzido em camundongo. Amostras: 1-StxB purificada, 2-BL21(DE3)STAR, 3-BL21(DE3), 4-BL21(DE3)RP, 5-BL21(DE3)RIL, 6-BL21(DE3)pLysS, 7-BL21SI, 8-CyC(DE3)pLysS, 9 BL21(DE3)GROEL. Foram aplicadas amostras das linhagens submetidas (+) ou não (-) à condição de indução.

4.3.3 Solubilidade da proteína Stx Δ AB recombinante expressa em *E. coli*

As linhagens de *E. coli* BL21SI e BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor pLStxB foram avaliadas quanto à solubilidade da proteína Stx recombinante. Para isso utilizamos o protocolo de indução pela adição de IPTG ao meio de cultura. A partir do ensaio de imunodetecção observamos que a maior parte da proteína expressa

acumula-se nas células como proteína insolúvel. No entanto, observamos que a linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS expressou maiores quantidades de Stx Δ AB na forma solúvel (aproximadamente 40% de proteína total) (figura 13).

Figura 13. Determinação da solubilidade da Stx Δ AB expressas pelas linhagens de *E. coli* BL21SI e BL21(DE3)pLysS transformadas com o vetor pLStxB. Amostras: 1- extrato total da linhagem BL21SI após indução; 2 - extrato solúvel da linhagem BL21SI; 3 - extrato total da linhagem BL21(DE3)pLysS; 4 - extrato solúvel da linhagem BL21(DE3)pLysS. A posição da StxB e respectiva massa molecular está indicada pela seta na figura.

4.3.4 Purificação da Stx Δ AB

A proteína recombinante Stx Δ AB produzida por linhagem de *E. coli* foi purificada por cromatografia de afinidade por meio de resina de sefarose conjugada com níquel. A partir das frações solúveis da proteína expressa, a proteína recombinante foi eluída com tampão B contendo imidazol na concentração de 40%. Com as linhagens produtora BL21(DE3)pLysS e BL21SI, foi possível obter aproximadamente 17mg por litro de cultura não havendo diferenças significativas entre estas linhagens utilizando ambos protocolos de indução.

Figura 14. Purificação por cromatografia de afinidade ao níquel da toxina Stx Δ AB expressa por linhagens recombinantes de *E. coli*. Amostras: 1 - Padrão de massa molecular (Promega); 2 – Filtrado (flow through); 3 - Frações purificadas da StxB eluídas com imidazol.

4.3.5 Produção de anticorpos policlonais anti-Stx Δ AB em camundongos

A partir da proteína Stx Δ AB purificada imunizamos camundongos BALB/c com 5 doses da proteína em duas quantidades diferentes (2 ou 10 μ g proteína/dose) em presença de adjuvante de Freund (ver Material e Métodos). A proteína recombinante foi empregada nos ensaios de imunização em sua forma nativa (obtida após purificação) ou desnaturada (após fervura por 10 minutos). Os animais foram sangrados e os soros foram recolhidos a partir da 3ª dose e titulados por ELISA utilizando como antígeno de fase sólida a proteína Stx Δ B recombinante na concentração de 1 μ g/mL. Após quatro doses, os títulos de anticorpos anti-Stx Δ AB gerados em animais imunizados com proteína nativa ou desnaturada atingiram valores de 1:79 (2 μ g nativa), 1:3 (2 μ g desnaturada), 1:75 (10 μ g nativa), 1:1507 (10 μ g desnaturada). Uma dose reforço de 100 μ g da proteína Stx Δ AB na sua forma desnaturada foi dada após 30 dias da 4ª dose para todos os grupos testados como forma de aumentar os títulos de anticorpos específicos para Stx. Como apresentado na figura 15 observamos um aumento expressivo (título 1:45.764) dos anticorpos anti-Stx Δ AB nos animais imunizados com a proteína desnaturada (10 μ g).

Figura 15. Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx Δ AB (IgG sérico) em camundongos BALB/c imunizados com a proteína purificada a partir da linhagem recombinante de *E. coli*. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra StxB determinados com misturas das amostras colhidas dos animais de cada grupo. Soro dos animais imunizados com 2µg da proteína na sua forma nativa (O), soro dos animais imunizados com 2µg da proteína na sua forma desnaturada (●), soro dos animais imunizados com 10µg da proteína na sua forma nativa (□), soro dos animais imunizados com 10µg da proteína StxB na sua forma desnaturada (■). Os pontos representam medições feitas 10 dias após cada dose.

4.3.6 Ensaios *in vivo* de neutralização da toxina Stx2 com anticorpos policlonais anti-Stx Δ AB gerados em camundongos BALB/c

Com o intuito de avaliar o potencial protetor dos anticorpos policlonais gerados em camundongos BALB/c imunizados com a proteína Stx Δ AB produzidos nos animais imunizados com a proteína desnaturada, realizamos ensaios de neutralização da toxina nativa com soros dos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB reconstituente (5ª dose com 10µg/dose de proteína). Como demonstrado na tabela 6 apesar das altas concentrações de anticorpos anti-Stx Δ AB nos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB recombinante (título de 1: 45764), não encontramos qualquer proteção em animais desafiados com a toxina Stx previamente incubada com o soro dos animais vaciados. Por outro lado, o soro controle (título 1: 40136), gerado em coelhos com a toxina Stx nativa foi capaz de neutralizar a toxina usada no desafio em diluições de 1:100 e 1:1000.

Tabela 6. Avaliação in vivo da atividade neutralizante dos soros dos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB produzida em linhagem de *E. coli*

Soros	diluição	Sobrevivência *						
		1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia	6º dia	7º dia
Toxina Stx2		+++	+++	---				
Soro anti-Stx Δ AB	1/10	+++	+++	---				
Soro anti-Stx Δ AB	1/100	+++	+++	---				
Soro anti-Stx2	1/10000	+++	+++	+++	+--	---		
Soro anti-Stx2	1/1000	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Soro anti-Stx2	1/100	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

*Sobrevivência dos animais acompanhados por um período de sete dias. Cada animal sobrevivente (+) ou morto (-) foi monitorado diariamente como indicado na tabela.

* Alíquotas de extrato contendo a toxina Stx2 foram incubados com diferentes diluições de soro gerados em camundongos imunizados com a proteína Stx Δ AB (5ª dose 10 μ g/dose) desnaturada ou soro gerados em coelhos (soro anti-Stx2) imunizados com toxóides Stx2.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra a primeira análise do uso de *B. subtilis* como veículo vacinal para a expressão de formas atóxicas da Stx, toxina originalmente produzida por linhagens de EHEC responsáveis pela Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em humanos. Nossos resultados sugerem que a utilização tanto de células vegetativas e principalmente esporos geram perspectivas promissoras para uma potencial estratégia vacinal contra a SHU. Escolhemos *B. subtilis* como veículo vacinal por tratar-se de uma bactéria segura (GRAS – Generally Regarded As Safe) possuindo a distinta característica de produzir esporos. (DUC et al., 2003, HOA, et al., 2000, OGGIONI et al., 2003) a forma de vida mais resistente do planeta (NICHOLSON et al., 2000).

Durante todo este trabalho avaliamos a capacidade da linhagem recombinante de *B. subtilis* expressar fragmentos da toxina Stx, a partir de um promotor indúziuvel por estresse, analisamos também as respostas imunológicas obtidas após inoculação, por diferentes vias, de células vegetativas e esporos. Verificamos também a influência do fragmento A2 da subunidade A na imunogenicidade dos anticorpos gerados e por último avaliamos a capacidade dos anticorpos gerados conferir proteção por meio da neutralização da toxina nativa, avaliada tanto pela observação do efeito citológico em células VERO quanto pela avaliação da sobrevivência de camundongos inoculados com toxina previamente incubada com os anticorpos ou desafiados com a toxina nativa após regime vacinal.

A utilização de três doses consecutivas em animais imunizados pela via oral é uma adaptação de protocolos vacinais baseados em linhagens recombinantes de *B. subtilis* (DUC et al., 2003, UYEN et al., 2007). Este regime é usado em modelo animal por conveniência e reflete a incapacidade da bactéria colonizar o epitélio intestinal e permanecer no organismo do hospedeiro por mais de 72 horas (UYEN et al., 2007). Por outro lado, a viscosidade da suspensão de células ou esporos administrada por gavagem a camundongos estabelece um limite para a quantidade do material aplicado. Em seres humanos, a administração de esporos ou células poderia ser na fórmula de cápsulas com material liofilizado ou apenas concentrado, como no caso dos esporos. Tal possibilidade se mostra particularmente interessante para países em desenvolvimento como o Brasil, pois exclui a necessidade de aplicação da vacina por profissionais treinados, elimina o uso de agulhas, risco de transmissão de doenças e oferece facilidade no armazenamento, já que os esporos podem ser estocados à temperatura ambiente.

Ao contrário do que esperávamos, os esporos não foram capazes de gerar

anticorpos significativos pela via oral, gerando títulos inferiores em relação a células vegetativas. Os títulos de anticorpos anti-Stx foram detectáveis apenas após as duas primeiras doses. Diferentemente da via oral, conseguimos detectar IgG séricos quando administramos esporos pela via subcutânea. A observação de respostas de anticorpos anti-Stx em animais imunizados com esporos aumenta a relevância do sistema desenvolvido uma vez que no sistema empregado o antígeno alvo é produzido somente pelas células vegetativas. Portanto, esse resultado demonstra que os esporos desenvolveram um ciclo completo de germinação dentro do organismo e o promotor *P_{gsB}* foi ativado durante esse período, gerando assim, mesmo que modesta, respostas imunológicas contra formas atóxicas da Stx2. Tais resultados confirmam observações anteriores relativas ao desempenho in vivo do promotor *P_{gsB}* em que animais desenvolvem respostas imunológicas significativas após a ingestão de esporos modificados geneticamente para expressão antígenos vacinais apenas após a germinação (PACCEZ et al., 2006, 2007)

A linhagem de *B. subtilis* recombinante utilizada neste projeto LDVP1 também demonstrou ser capaz de gerar títulos de IgG séricos e IgA secretados contra a toxina Stx, principalmente quando administrada pela via oral na sua forma vegetativa. Isto demonstra que apesar do *B. subtilis* não ser colonizador, juntamente com o fato da subunidade B da toxina Stx ser pouco imunogênica, o sistema utilizado neste trabalho é promissor. Como o antígeno vacinal analisado neste trabalho é uma toxina produzida por bactérias enteropatogênicas, a estratégia de imunização oral mostra-se extremamente importante pois permite a indução de respostas locais. Além disto, o sistema de expressão baseado em uma bactéria formadora de esporos torna-se atrativo já que permite a sobrevivência após a passagem pela barreira do estômago e expressão da proteína heteróloga após germinação em sítios aferentes do sistema imune de mucosa.

Várias estratégias vacinais foram desenvolvidas contra a SHU (BIELASZEWSKA et al., 1997, BOYD et al., 1991, BUTTERTON et al., 1997, BYUN et al., 2001, CAPOZZO et al., 2003, HARARI et al., 1988., IMAI et al., 2004, ISHIKAWA et al., 2003, LUDWIG et al., 2002, MARCATO et al., 2001, MARCATO et al., 2005, SMITH et al., 2006, SU et al., 1992, ZHU et al., 2007), nós focamos nosso estudo em formas atóxicas da Stx2, a subunidade B ligante e paralelamente a inserção do fragmento A2 juntamente com a subunidade B, nunca antes feito. Diferentemente ao uso de toxóides em que a toxina inteira é inativada com agentes químicos (LUDWIG et al., 2002, BIELASZEWSKA et al., 1997) ou com mutações em aminoácidos na subunidade A (ISHIKAWA et al., 2003, SMITH et al., 2006), optamos trabalhar com

formas atóxicas da Stx2, pois o uso da subunidade A inteira, ainda que inativada ou mutada, oferece restrições em relação à segurança da vacina para uso em humanos (GORDON et al, 1992, METZ et al., 2003).

Optamos pela utilização do fragmento A2, juntamente com a subunidade B, devido a evidências de uma maior imunogenicidade da subunidade A (BIELASZEWSKA et al., 1997, ISHIKAWA et al., 2003), e também pelo fato de reações protetoras cruzadas contra a Stx1 serem principalmente obtidas por anticorpos dirigidos contra a subunidade A (BIELASZEWSKA et al., 1997). Isto seria interessante para a elaboração de uma estratégia vacinal capaz de neutralizar as várias formas da toxina Stx, como Stx1 e Stx2, assim como a toxina de Shiga produzida por linhagens de *Shigella*. Portanto optamos por verificar se a porção A2 já seria suficiente para aumentar a imunogenicidade da subunidade B expressa nas linhagens recombinantes de *B. subtilis*.

O vetor de expressão utilizado neste ensaio, mostrou-se interessante em abordagens vacinais com a utilização de bactérias recombinantes como veículo, pois está baseado em um promotor (*PgsiB*) com capacidade de indução da proteína recombinante *in vivo* e, como demonstrado anteriormente, demonstrou melhor desempenho e aplicações vacinais baseadas em linhagens de *B. subtilis* modificadas para expressar a subunidade B da toxina LT de ETEC (PACCEZ et al., 2006, 2007). Neste trabalho induzimos a expressão da proteína heteróloga Stx *in vitro* utilizando como agente indutor de estresse a temperatura 48 °C, estimulado validado em nosso laboratório (PACCEZ, et al., 2006,2007). Entretanto esta forma de indução não possibilitou a detecção da proteína Stx *in vitro*, limitada a uma sensibilidade de 125 ng por 10⁶ células. A dificuldade encontrada na detecção da proteína recombinante durante o crescimento *in vitro* da linhagem vacinal foi atribuída aos anticorpos utilizados no ensaio de imunodeteção já trabalhos anteriores baseados na toxina LT indicam que a produção do antígeno vacinal não ultrapassou os 50 ng por 10⁸ células (PACCEZ et al., 2007) . No entanto *in vivo* fatores adicionais de estresse presentes no trato gastro-intestinal podem induzir a expressão da proteína recombinante, como pH ácido, sais biliares, ausência de oxigênio e baixos índices de glicose. A presença de tais estímulos fez com que detectássemos *in vivo* a produção de anticorpos contra a proteína heteróloga, mediante títulos de IgG séricos e IgA secretados, uma demonstração indireta da expressão do antígeno, particularmente em animais imunizados com esporos.

O fato de *B. subtilis* não ser uma bactéria colonizadora, células vegetativas persistem por no máximo 12 horas dentro do organismo hospedeiro (DUC et al., 2003;

HOA et al., 2001;), juntamente com a baixa imunogenicidade da subunidade B (BIELASZEWSKA et al., 1997, BYUN et al., 2001, CAPOZZO et al., 2006, IMAI et al., 2004, MARCATO et al., 2001, MARCATO et al., 2005) e a baixa expressão da toxina recombinante, justificariam a baixa produção de anticorpos produzidos nos animais imunizados. Até o presente momento não dispomos de alternativas experimentais para aumentar a produção *in vitro* do antígeno vacinal pelas linhagens recombinantes de *B. subtilis* mas a adaptação do código genético de leitura do gene clonado poderia ser um dos caminhos a serem avaliados.

Foram estudadas três vias diferentes de imunização com as linhagens de *B. subtilis* recombinantes. Nós encontramos que usando *B. subtilis* na forma de células vegetativas, a via oral revelou ser a mais interessante, pois fomos capazes de detectar, tanto IgG secretado como IgA de mucosa. Tal propriedade é crucial para estratégias vacinais contra patógenos de mucosa, principalmente contra a toxina Stx, pois anticorpos capazes de neutralizar a toxina já no intestino impediriam o acesso à corrente sanguínea,. Uma pequena resposta foi encontrada utilizando a via nasal, após a quarta dose, porém esta resposta resultou apenas em títulos de IgG, não sendo detectado IgA de mucosa.

Com relação ao uso de esporos, obtivemos resultados positivos apenas quando utilizamos a via subcutânea, o fato de os esporos por si só gerar uma resposta (DUC et al., 2004) explica o melhor desempenho obtido na via subcutânea. Títulos de IgG anti-Stx foram detectados apenas após a segunda e a terceira dose, mas mostraram-se transientes caindo a níveis indetectáveis após a quarta dose. Surpreendentemente a presença do fragmento A2 promoveu aumento na produção de anticorpos após a segunda dose mas, de forma semelhante ao observado na imunização com linhagens que expressavam a subunidade B, esses títulos caíram após a terceira dose. Vale notar que mesmo com a baixa imunogenicidade da StxB (ACHESON et al., 1995, BIELASZEWSKA et al., 1997., BYUN et al., 2001, MARCATO et al., 2001, MARCATO et al., 2005) e a pouca expressão da toxina recombinante pelas linhagens de *B. subtilis*, foi possível detectar a produção de anticorpos nos animais imunizados.

Para validarmos o sistema de expressão intracelular de proteínas recombinantes em *B. subtilis* foi necessário verificar se os anticorpos produzidos em animais imunizados teriam atividade neutralizante frente à toxina Stx2 nativa. Como demonstrado em nosso laboratório, a expressão intracelular da toxina LT foi capaz de gerar anticorpos neutralizantes frente à toxina nativa (PACCEZ, et al., 2006, 2007). No entanto, ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os anticorpos anti-StxB gerados

em animais imunizados com linhagens recombinantes de *B. subtilis* não foram protetores, como demonstrado em células em cultura ou após inoculação em animais. De forma semelhante, os anticorpos gerados em animais imunizados com a proteína na sua forma desnaturada, também não mostraram atividade protetora, apesar dos elevados títulos encontrados após cinco doses com a proteína purificada. Demonstramos, portanto, que a presença de anticorpos específicos não é uma garantia de efeito vacinal protetor, pois os anticorpos gerados possivelmente reconhecem epítomos não conformacionais da subunidade B. Provavelmente a produção intracelular de uma proteína naturalmente secretada na bactéria gram-negativa em um hospedeiro gram-positivo gera problemas na montagem da toxina completa. Como resultado, epítomos conformacionais importantes para a proteção seriam perdidos na proteína recombinante, interferindo na imunogenicidade do antígeno vacinal de forma semelhante ao observado com a proteína PA de *B. anthracis*, em que os anticorpos gerados não foram protetores (DUC et al., 2007).

A geração de anticorpos contra a subunidade B da toxina Stx requer o uso de adjuvantes (BIELASZEWSKA et al., 1997, BYUN et al., 2001, CAPOZZO et al., 2006, IMAI et al., 2004, MARCATO et al., 2001, MARCATO et al., 2005), assim como a montagem da subunidade em sua forma pentamérica, gerando anticorpos que reconhecem os epítomos conformacionais. Tais anticorpos impediriam a ligação da toxina ao receptor Gb3 e conseqüentemente internalização da subunidade A ativa nas células alvo (BOYD et al., 1991, BYUN et al., 2001, IMAI et al., 2001, ZHU et al., 2007). Ao contrário do observado com linhagens de *B. subtilis* modificadas geneticamente para produzir intracelularmente a subunidade B da toxina LT (PACCEZ, et al., 2006, 2007), a montagem de StxB parece exigir a secreção para o ambiente extracelular, local onde assumiria a conformação. Como os sistemas de expressão utilizados, baseados tanto em *E. coli* como em *B. subtilis*, levam ao acúmulo da proteína recombinante no citoplasma, a ausência de efeito protetor frente à toxina nativa pode ser facilmente explicada pela não geração de anticorpos neutralizantes direcionados a epítomos conformacionais localizadas na superfície da toxina nativa.

Novas formas de expressão da toxina Stx devem, portanto, ser consideradas, principalmente para a subunidade B. O esforço feito para gerar a proteína em linhagens recombinantes de *E. coli* revelou que duas linhagens testadas expressaram StxB em duas condições distintas de indução. A linhagem BL21(DE3)plysS destacou-se por produzir uma maior quantidade da proteína na forma solúvel. Tal fato, poderia ser atribuído à produção de uma lisozima pela linhagem gerando uma expressão controlada da proteína e, com isto, aumento de sua solubilidade (SAMBROOCK et al.,

2001). Após otimização das condições de expressão de StxB em *E.coli*, obtivemos um bom rendimento da proteína, muito superior ao relatado por outros pesquisadores (ACHENSON et al., 1995, CALDERWOOD et al., 1990). Um próximo passo deverá ser a obtenção de linhagens capazes de promover a expressão da proteína em uma forma secretada.

CONCLUSÕES GERAIS

Como conclusão geral do nosso trabalho, demonstramos que o sistema de expressão em *B. subtilis* foi capaz de gerar respostas de anticorpos específicos contra a toxina Stx produzida por linhagens de EHEC, apesar do baixo nível de expressão da proteína heteróloga. No entanto, a falta de efeito neutralizante sobre a toxina nativa dos anticorpos gerados, observada também em animais imunizados com a proteína purificada a partir de linhagens recombinantes de *E. coli*, indica que o sistema de expressão precisa ser aprimorado, tanto em relação à quantidade mas e sobretudo, em relação à conformação da proteína gerada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHESON, D. W. K. et al. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 301-308, 1995.
- ALMEIDA, M. E. S.; NEWTON, S. M.; FERREIRA, L. C. S. Antibody response against flagellin in mice orally immunized with attenuated *Salmonella* vaccine strain. **Arch. Microbiol.**, v. 172, p. 102-108, 1999
- ALVES, A. M. B. et al. Epitope specificities of antibodies raised against enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I fimbriae in mice immunized with naked DNA. **Vaccine**, v. 16, p. 9-15, 1998a
- ALVES, A. M. B. et al. Immunoglobulin G subclasses response in mice immunized with plasmid DNA encoding the CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Immunol. Lett.**, v. 62, p. 145-149, 1998b
- BAST, D. J. et al. The identification of three biologically relevant globotriaosyl ceramide receptor binding sites on the Verotoxin 1 B subunit. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 953-960, 1999.
- BIELASZEWSKA, M. et al. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2509-2516, 1997.
- BOYD, B.; RICHARDSON, S.; GARIÉPY, J. Serological response to the B subunit of Shiga-like toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter the action of the toxin. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 750-757, 1991.
- BUTTERTON, J.R. et al. Coexpression of the B Subunit of Shiga toxin 1 and EaeA from enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Vibrio cholerae* vaccine strain. **Infect Immun.**, v. 65, p. 2127-2135, 1997.
- BYUN, Y. et al. Nasal immunization with *E. coli* verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 19, p. 2061-2070, 2001.
- CALDERWOOD, et al. A system for production and rapid purification of large amounts of the Shiga toxin/Shiga-like toxin 1 B subunit. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 2977-2982, 1990.
- CAPOZZO, A. et al. Development of DNA vaccines against Hemolytic Uremic Syndrome in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3971-3978, 2003
- CASULA, G.; CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2344-2352, 2002.
- CIABATINI, A. et al. Oral priming of mice by recombinant spores of *Bacillus subtilis*. **Vaccine**, v. 22, p. 4139-4143, 2004

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CLEARY, T. G. The role of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Hemorrhagic Colits and Hemolytic Uremic Syndrome. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, p. 260-265, 2004.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

DONOHUE-ROLFE, A. et al. Purification of Shiga toxin and Shiga like toxin I and II by receptor analog affinity chromatography with immobilized P1 glycoprotein and production of cross-reactive monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3888-3893, 1989.

DUC, L. H. et al. Intracellular fate and immunogenicity of *B.subtilis* spores. **Vaccine**, v. 22, p. 1873-1885, 2004.

DUC, L. H. et al. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2810-2818, 2003a.

DUC, L. H.; HONG, H. A.; CUTTING, S. M. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. **Vaccine**, v. 21, p. 4215-4224, 2003b.

DUC, L. H. et al. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. **Vaccine**, v. 25, p. 346-355, 2007

EISENHAUER, P. B. et al. Tumor necrosis factor alpha increase human cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to Shiga toxin. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1889-1894, 2001.

FERREIRA, L. C. S.; R. C., FERREIRA.; SCHUMANN, W. *Bacillus subtilis* as a tool for vaccine development: from antigen factories to delivery vectors. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, p. 113-124, 2005.

FISCHETTI, V. A.; MEDAGLINI, D.; POZZI, G. Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 7, p. 659-666, 1996.

FRASER, M. E. et al. Struture of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. **J. Biol.Chem.**, v. 279, p. 27511-27517, 2004.

FRIECRICH, A. W. et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequenci and association with clinical symptoms. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 74-84, 2002.

GORDON. V. M. et al. An enzymatic mutant of Shiga like toxin II variant is a vaccine candidate for edema disease of swine. **Infect. Immunol.**, v. 60, p. 485-490, 1992.

HARARI, I. et al. Synthetic peptides of Shiga toxin B subunit induce antibodies which neutralize its biological activity. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1618-1624, 1988.

HALDENWANG, W.G.; LOSICK, R. (1980). Novel RNA polymerase sigma factor from *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.12, p. 7000-7004, 1980.

HOA, T. T. et al. Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67 p. 3819-3823, 2001.

HOA, N. T. et al. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66 p. 5241-7, 2000.

IMAI, Y. et al. Production of secretory immunoglobulin A against Shiga toxin-binding subunits in mice by mucosal immunization. **Infect. Immun.** v. 72, p. 889-895, 2004.

IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 29-36, 2005.

IVINS, B.E.; WELKOS, S.L. Cloning and expression of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene in *Bacillus subtilis*. **Infect. Immun.**, v. 54, p. 537-542, 1986.

IVINS, B.E. et al. Immunization against anthrax with aromatic compound-dependent (Aro-) mutants of *Bacillus anthracis* and with recombinant strains of *Bacillus subtilis* that produce anthrax protective antigen. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 303-8, 1990.

ISHIKAWA, S. et al. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3235-3239, 2003.

ISTICATO, R. et al. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 6294-6301, 2001.

JACKSON, M. P.; DERESIEWICZ, R. L.; CALDERWOOD, S. B. Mutational analysis of the Shiga toxin and Shiga-like toxin II enzymatic subunits. **J. Bacteriol.**, v. 172, p. 3346-3350, 1990.

JÜRGEN, B.; SCHWEDER, T.;HECKER, M. The stability of mRNA from the *gsiB* gene of *Bacillus subtilis* is dependent on the presence of a strong ribosome binding site. **Mol. Gen. Genet.**, v. 258, p. 538-545, 1998.

KARMALI, M. A. et al. The Association between Idiopathic Hemolytic Uremic Syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 775-782, 1985.

KARMALI, M. A. et al. Sporadic cases of Hemolytic Uremic Syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, 619-620, 1983.

KARMALI, M. A. et al. Antigenic heterogeneity of *Escherichia coli* verotoxins. **Lancet**, 164-165, 1986.

KARMALI, M. A. Prospects for Preventing Serious Systemic Toxic Complications of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections Using Shiga Toxin Receptor Analogues. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 355-9, 2004.

KIM, L.; MOGK, A.; SCHUMANN, W. A xilose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector its application. **Gene**, v. 181, p. 71-6, 1996.

KITOV, P. I. et al. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate

ligands. **Nature**, v. 403, p. 669-672, 2000.

KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J. I., STRAVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 18, p. 775-9, 1977.

LAEMMLI, K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-5, 1970.

LLOP, P. et al. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. **J. Microbiol. Method**, v. 37, p. 23-31, 1999.

LOUISE, C. B.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated Hemolytic Uremic Syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, Interleukin-1 β , and Tumor Necrosis Factor Alpha on human vascular endothelial cells in vitro. **Infect Immun.**, v. 59, p. 4173-79, 1991.

LOUISE, C. B.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated Hemolytic Uremic Syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin and Lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells in vitro. **Infect Immun.**, v. 60, p. 1536-43, 1992.

LUNA, M. G. et al. Cloning and expression of colonization factor antigen I (CFA/I) epitopes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in *Salmonella* flagelin. **Res. Microbiol.**, v. 148, p. 217-228, 1997.

LUDWIG, K. et al. Cross-protection against challenge by intravenous *Escherichia coli* verocytotoxin 1 (VT1) in rabbits immunized with VT2 toxoid. **Can. J. Microbiol.**, v. 48, p. 99-103, 2002.

MARCATO, P. et al. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 435-443, 2001.

MARCATO, P. et al. Recombinant Shiga toxin B subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from shigatoxemia. **Infect Immun.**, v. 73, p. 6523-6529, 2005.

MAURIELLO, E. M. F. et al. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**, v. 22, p. 1177-1187, 2004.

MAURIELLO, E. M. F. et al. Germination-independent induction of cellular immune response by *Bacillus subtilis* spores displaying the C fragment of the tetanus toxin. **Vaccine**, v. 25, p. 788-793, 2007.

MAUL, B. et al. σ^B dependent regulation of *gsiB* in response to multiple stimuli in *Bacillus subtilis*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 248, p. 114-120, 1995.

METZ, B. et al. Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. **Vaccine**, v. 22, p. 156-167, 2003.

MOGK, A.; HAYWARD, R.; SCHUMANN, W. Integrative vectors for construction single-copy transcriptional fusions between *Bacillus subtilis* promoters and various reporter genes encoding heat-stable enzymes. **Gene**, v. 182, p. 33-36, 1996.

MÜHLDORFER, I. et al. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 495-502, 1996.

MULVEY, G. L. et al. Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands **J. Infect. Dis.** v. 187, p. 640-649, 2003.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11 p. 142-201, 1998.

NGUYEN, H. D. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. **Plasmid**, v. 54, p. 241-248, 2005.

NISHIKAWA, K. et al. A therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **PNAS**, v. 99, p. 7669-7674, 2002.

NICHOLSON, W. L. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p. 548-572, 2000.

OGGIONI, M. R. et al. *Bacillus* spores for vaccine delivery. **Vaccine**, v. 31, p. 96-101, 2003.

OGGIONI, M.R. et al. Engineering the Gram-Positive cell surface for Construction of bacterial vaccine vectors. **Methods**, v. 19, p. 163-173, 1999.

OSTROFF, S. M. et al. Toxin genotypes and plasmids profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. **J. Infect. Dis.**, v. 160, p. 994-998, 1989.

PACCEZ, J. D. et al. Stable episomal expression under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. **Vaccine**, v. 24, p. 2935-43, 2006

PACCEZ, J. D. et al. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine**, v. 25, p. 4671-4680, 2007.

PATON, J. C.; PATON, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11 p. 450-479, 1998.

PATON, J. C. et al. Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1389-1393, 2001.

PATON, A. W.; MORONA, R.; PATON, J. C. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. **Nat. Med.**, v. 6, p. 265-270, 2000.

PERERA, L. P. et al. Identification of three amino acid residues in the B. subunit of Shiga toxin and Shiga like toxin type II that are essential for holotoxin activity. **J. Bacteriol.**, v. 163, p. 1151-1160, 1991.

PERNA, N. T. et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

POTTER, A. A. et al. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle

- following vaccination with type III secreted proteins. **Vaccine**, v. 22, p. 362-369, 2004.
- RICCA, E.; CUTTING, S. M. Emerging Applications of Bacterial Spores in Nanobiotechnology. **J. Nanobiotechnol**, v. 1, p. 6-15, 2003.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANDVIG, K.; DEURS, B. V. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. **FEBS Letters**, v. 529, p. 49-53, 2002.
- SCOTLAND, S. M., SMITH, H. R., ROWE B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, 885-886, 1985.
- SHIMOTSU, H.; HENNER, D. J. Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the trp operon of *Bacillus subtilis*. **Gene**, v. 43, p. 85-94, 1986.
- SIMON, M. et al. Shiga toxin 1 elicits diverse biologic response in mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 54, p. 1117-27, 1998.
- SMITH, M. J. et al. Development of a hibrid shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxin types 1 and 2. **Vaccine**, v. 24, p. 4122-4129, 2006.
- STROCKBINE, et al. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similas biologic activities. **Infect. Immun.**, v. 53, p135-140, 1986
- SU, G. F. et al. Construction of stable LamB-Shiga toxin B subunit Hybrids: Analysis of expression in *Salmonella typhimurium aroA* strain and stimulation of B subunit-specific mucosal and serum antibody responses. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 3345-3359, 1992.
- TAKEDA, Y. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **World Health Stat. Q.**, v. 50, p. 74-80, 1997.
- TESH, V. L. et al. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3392-3402, 1993.
- TZIPORI, S. et al. Antibody therapy in the management of Shiga toxin-induced hemolytic uremic syndrome. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 17, p. 926-941, 2004.
- TORGERSEN, M. L.; LAUVRAK, S. U.; SANDVIG, K. The A-subunit of surface-bound Shiga toxin stimulates clathrin-dependent uptake of the toxin. **FEBS J.**, v. 272, p. 4103-4113, 2005.
- TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Eletroforetic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p. 4350-4, 1979..
- UYEN, N. Q.; HONG, H. A.; CUTTING, S. M. Enhanced immunization and expression strategies using bacterial spores as heat-stable vaccine delivery vehicles. **Vaccine**, v. 25, p. 356-365, 2007.

VAN DE KAR, N. C. et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: Implications for the pathogenesis of the Hemolytic Uremic Syndrome. **Blood**, v. 80, p. 2755-64, 1992.

VAN DE KAR, N. C. et al. Tumor Necrosis Factor α induces endothelial galactosyl transferase activity and verocytotoxin receptors. Role of specific Tumor Necrosis Factor receptors and Protein Kinase C. **Blood**, v. 85, p. 734-743, 1995.

VÖLKER, U. et al. Analysis of the induction of general stress proteins of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, v. 140, p. 741-752, 1994.

ZHU, C. et al. Protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin B subunit. **Clin. Vaccine Immunol.**, 2007. In press

WADOLKOWSKI, E. A. et al. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strain that produce Shiga-like toxin type II. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3959-3965, 1990.

WATANABE, M. et al. Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* Infections. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 360-368, 2004.

WATARI, S. et al. Inhibitory effect of intestinal anti-Gb3-IgA antibody on verotoxin-induced cytotoxicity. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 31, p. 449-453, 2000.

WONG, S. -L. Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expresion and secretion of heterologous proteins. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.6, p. 517-522, 1995.