

ROBERT LEONARDO GALVEZ ROJAS

Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal com propriedades profiláticas contra a síndrome hemolítica urêmica (SHU) associada a linhagens de *Escherichia coli enterohemorrágica* (EHEC) produtoras da toxina “Shiga-like” (Stx2)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

ROBERT LEONARDO GALVEZ ROJAS

Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal com propriedades profiláticas contra a síndrome hemolítica urêmica (SHU) associada a linhagens de *Escherichia coli* *enterohemorrágica* (EHEC) produtoras da toxina “Shiga-like” (Stx2)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Àrea de concentração: Microbiologia
Orientador (a): Prof. Rita de Cássia Café Ferreira
Co-orientador: Prof. Luis Carlos de Souza Ferreira

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Galvez Rojas, Robert Leonardo.

Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal com propriedades profiláticas contra a síndrome hemolítica urêmica (SHU) associada a linhagens de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) produtoras da toxina "Shiga-like" (Stx) / Robert Leonardo Galvez Rojas. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Rita de Cássia Café Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Estratégias vacinais contra toxinas bacterianas no intestino

Versão do título para o inglês: Developing a new vaccine strategy with prophylactic properties against hemolytic uremic syndrome (HUS) associated with strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) produced by "Shiga-like "(Stx).

Descritores: 1. Vacinas 2. *Salmonella typhimurium* 3. Stx 4. SHU
I. Ferreira, Rita de Cassia Café II. Universidade de São Paulo.
Programa de Pós Graduação em Biologia da Celular e Tecidual III.
Título.

ICB/SBIB0136/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Robert Leonardo Galvez Rojas.

Título da Tese: Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal com propriedades profiláticas contra a síndrome hemolítica urêmica (SHU) associada a linhagens de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) produtoras da toxina “Shiga-like” (Stx).

Orientador(a): Rita de Cássia Café Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Este trabalho foi executado no laboratório de Desenvolvimento de Vacinas (LDV) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) e recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A **minha família**, por todo incentivo e apoio incondicional e em especial a minha **mãe (Patricia Rojas Cabrera)** e meu **avô (Hector Rojas Rojas)** que me ensinaram acreditar nos sonhos e perseverar na vida. Sem eles eu não estaria fazendo aquilo que eu mais gosto: fazer ciência.

A todas as pessoas maravilhosas que conheci e tenho em meu coração durante a minha estadia neste lindo e alegre país, em especial a **Rita** e **Luis Carlos** pela oportunidade, apoio e exemplo de vida.

E finalmente, a todos meus orientadores que fizeram de mim uma pessoa apaixonada por esse longo caminho que é a ciência. Ao professor **Jorge Gonzalez, Ariel Silber, Luis Carlos e Rita**, sinceramente muito obrigada por me ajudar entender a ciência.

AGRADECIMENTOS

Essa tese não foi realizada somente por mim, ela contou com muitas pessoas que me ajudaram de inúmeras formas, e que sem elas a realização deste trabalho não seria possível.

À minha orientadora **Rita** por toda paciência, dedicação, conversas descontraídas e principalmente por sua amizade, apoio, por acreditar em mim, por sempre me incentivar a crescer e por tantas outras coisas que me deixam além de agradecido, muito orgulhoso de ser seu aluno. O caminho da ciência traz muitas voltas, como a vida mesma, e garanto que a gente vai se encontrar nesse longo caminho para trabalhar juntos, valeu a pena conhecer uma pessoa maravilhosa como você, eternamente contente de te conhecer.

Ao meu co-orientador **Luis Carlos** por toda paciência e por sempre estar disposto a passar conhecimento e sabedoria. Nos momentos mais difíceis que tive no laboratório aprendi que você é mais que um professor, é um exemplo a ser seguido. Às vezes as pessoas em circunstâncias e momentos difíceis percebem que existe uma grande pessoa na sua frente, e agora eu sei quem é você professor Luis Carlos.

Como escreveu **Lili** na sua tese, não tenho palavras para agradecer tanto amor e dedicação pelo trabalho de laboratório, carinho de mãe, conselhos de amiga e um

verdadeiro exemplo profissional. Para você **Bete Sbrogio**, as palavras mais maravilhosas devem existir na sua vida... Obrigado por tudo.

À **Marina Palermo** por me aceitar no seu laboratório em Buenos Aires e me ajudar tanto na execução do trabalho realizado como pelas dicas profissionais e pessoais, e fazer que não me sentisse tão longe de casa. E logicamente, a todas as meninas do laboratório de Marina pelo carinho e amizade.

À minha querida amiga e companheira **Priscila** por conseguirmos formar um grupo de trabalho, por crescermos juntos nos momentos difíceis e nos trabalhos experimentais, pelas conversas, pelas loucuras e por ter sempre um bom humor e por estar disposta a ajudar sempre. Você merece muito mais daquilo que conseguirmos no laboratório. Saudades, vou ter sempre de você!

Aos meus amigos da República do Chile em São Paulo, **Patricio, Esteban (orejon), Christian (chapulin), Ricardo (ojon), Mauro, Charles e Sergio** pela histórica e grande amizade trazida da nossa terra e nossa universidade... A todos vocês VIVA CHILE!

A meu grande amigo de ciência **Patricio Manque**, por sua amizade sincera e honesta, por sempre me incentivar a crescer neste maravilhoso caminho e por ser a pessoa que me apoiou nos momentos e decisões mais importantes da minha vida e na ciência

junto aos meus orientadores. Para você Pato, o melhor e a gente logo vai se encontrar no Chile, grande abraço, manqueman!

Sem dúvida que encontrar uma palavra para **Rafael** é difícil, pode se concluir que ele é um labirinto cheio de amizade honesta e sincera, uma pessoa que esta sempre com você e uma verdadeira poesia ao vivo para definir um grande amigo. Não preciso ter saudades dele porque eu estou dentro de seu labirinto. Para você Raficho, viva Ceará! E viva nossa república!

Às três chatinzinhas (**Mariana, Camila Santos e Juliana**) que estão no meu coração por todo que elas me entregaram, por sua amizade, carinho, lealdade e sempre estar dando um sorriso para mim. **Jusinha**, obrigado pela força e ajuda na tese.

Ao meu irmãozinho menor, **Robertinho**, pelo apoio, amizade, lealdade e momentos que compartilhamos no grupo Xantho-Glut. Você merece muito mais daquilo que você tem nesse longo caminho da ciência... Paciência.

A todos **meus amigos** do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas: **Wilson, Juliano, Juliana, Catarina, Camila Santos (chatinzinha!), Rafael, Renatinha, Aline, Otto, Cariri, Vinícius, Jaime, Roberto (meu irmãozinho menor), Dani, Milene, Elisinha, Sabrina, Natália, Karine, Mariana** (uma grande parceira e amiga doidinha), **Bruna e Liliana**. A todos vocês um especial carinho levo em meu coração.

Aos meus amigos do laboratório de Armando Ventura, **Yordanka** (viva Cuba e a revolução!) e o uruguaio **Luis** (cabeça de “nabo”) pela amizade e momentos de descontração.

À **Loren** por manter o laboratório sempre organizado, facilitando e proporcionando assim o bom andamento dos trabalhos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia, em especial às secretárias (**Alice**, **Naíde** e **Ana**) por ajudarem com toda a papelada e sempre tirarem as dúvidas sobre o programa.

Ao **Carlos Augusto da Silva**, pela competência, profissionalismo e carinho ao lidar com os camundongos.

Aos colegas do Laboratório de Reparo de DNA pela ótima convivência, em especial a **Dani**, **André** e **Tatiana**.

A **FAPESP** e **CAPES** pelo apoio financeiro, tornando viável o desenvolvimento desta tese.

“O homem que deseja ser cientista e à ciência se dedicar todo seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e de que se divertirá muito (como pouca gente)”... (Newton Freire Maia)

RESUMO

ROJAS, R. L. G. **Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal com propriedades profiláticas contra a síndrome hemolítica urêmica (SHU) associada a linhagens de *Escherichia coli enterohemorrágica* (EHEC) produtoras da toxina “Shiga-like” (Stx2).** 2010. 84 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma estratégia vacinal utilizando linhagens de *Salmonella* atenuadas capazes de expressar uma forma atóxica da principal toxina associada a linhagens de EHEC que causa a síndrome hemolítica urêmica. Estas linhagens de *Salmonella* atenuadas diferem na expressão da flagelina, a principal unidade estrutural do flagelo. As linhagens recombinantes foram capazes de expressar uma forma atóxica da proteína “Shiga-like” (Stx2) no interior da bactéria e de secretá-la no meio externo, apresentando alta estabilidade plasmidial *in vitro* e *in vivo*. Além disso, as linhagens recombinantes demonstraram um maior grau de colonização do intestino em comparação às linhagens não produtoras de Stx2. Avaliamos também o potencial imunogênico dessas linhagens e encontramos que a imunização com três doses de salmonelas pela via oral foram capazes de gerar anticorpos sistêmicos (IgG) e locais (IgA) com propriedades neutralizantes *in vitro* e proteção parcial *in vivo* frente a ensaios de desafios com a toxina nativa. Diferenças significativas nas propriedades imunogênicas não foram encontradas entre as linhagens que diferem na expressão de flagelina. Nossos resultados indicam que formas atóxicas da proteína Stx2 expressas em vetores biológicos pode ser uma alternativa em estratégias vacinais para o controle da SHU.

Palavras-chave: Vacina. *Salmonella* Typhimurium. Stx2. SHU. Resposta imunológica.

ABSTRACT

ROJAS, R.L.G. **Developing a new vaccine strategy with prophylactic properties against hemolytic uremic syndrome (HUS) associated with strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) produced by Shiga-like "(Stx2).** 2010. 84 p. PhD Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The aim of this study was to develop a vaccine strategy by using attenuated *Salmonella* strains capable of expressing a non-toxic form of the main toxin associated to EHEC strains that cause hemolytic uremic syndrome. These attenuated strains of *Salmonella* differ in flagellin expression, the main structural unit of the flagellum. The recombinant strains were capable of expressing a nontoxic form of the protein "Shiga-like (Stx2) within the bacteria and in the external environment, with high plasmid stability *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the recombinant strains showed a high degree of intestinal colonization compared to Stx2-not producing strains. We also evaluated the immunogenic potential of these strains and found that the immunization with three doses of orally administered *Salmonella* were able to generate (IgA) local and (IgG) systemic antibodies with neutralizing properties *in vitro* and *in vivo* and partial protection against challenges with testing the native toxin. Significant differences in the immunogenic properties were not found among strains that differ in flagellin expression. Our results indicate that Stx2-nontoxic forms expressed in biological vectors may be an alternative of vaccination strategies to control the HUS.

Key words: Vaccine. *Salmonella* Typhimurium. Stx2. HUS. Immune response.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – soro albumina bovina
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
GLDH – glutamato deidrogenase
HCl - ácido clorídrico
s-IgA – imunoglobulina de classe A tipo secretor
IgG – imunoglobulina de classe G
IPTG – isopropil-tio- β -galactosídeo
kDa – kilodaltons
KOAc – acetato de potássio
LB – Luria Bertani
mL – mililitros
mA – miliampere
MgSO₄ – sulfato de magnésio
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
(NH₄)₂SO₄ – sulfato de sódio
Na₂HPO₄ – fosfato de sódio
ng – nanograma
OPD – ortho-phenylenediamine
pb – pares de bases
PBS-T – tampão salina fosfato acrescido com 0,5 % de Tween20
PCR – reação em cadeia da polimerase
PSA – persulfato de amônio
qsp – quantidade suficiente para
rpm – rotações por minuto

SDS – dodecil sulfato de sódio

SFB – soro fetal bovino

SOC - caldo de carne Optimal Super

Stx2 – 2-shiga like toxin

SHU – Síndrome hemolítica uremica

µL – microlitros

UFC – unidade formadora de colônia

V - volume

NH₃ – amoníaco

CO₂ – dióxido de carbono

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da holoproteína mostrando as subunidades A e o pentâmero da subunidade B	3
Figura 2 - Representação esquemática da via de transmissão da Stx2 por linhagens de EHEC e patogênese no intestino e rim	5
Figura 3 - Representação imunológica do epitélio intestinal	12
Figura 4 - Construção da proteína Stx2ΔAB	23
Figura 5 - Representação esquemática dos vetores pCVT1 (A) e pCVT2 (B)	23
Figura 6 - Amplificação do fragmento de PCR indicando a presença do gene <i>Stx2ΔAB</i>	38
Figura 7 - Curvas de crescimento em ausência de DHBA nas linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> utilizadas neste estudo	39
Figura 8 - Curvas de crescimento em presença de DHBA nas linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> utilizadas neste estudo	40

Figura 9 - Caracterização das linhagens vacinais de <i>S. Typhimurium</i>	42
Figura 10 - Expressão da proteína <i>Stx2ΔAB</i> pelas linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> em ensaios de Dot Blot	43
Figura 11 - Análise da estabilidade <i>in vitro</i> das linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> que não apresentam a expressão do flagelo	45
Figura 12 - Análise da estabilidade <i>in vitro</i> das linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> que apresentam a expressão do flagelo	45
Figura 13 - Análise da estabilidade <i>in vivo</i> das linhagens vacinais aflageladas de <i>S. Typhimurium</i>	47
Figura 14 - Análise da estabilidade <i>in vivo</i> das linhagens flageladas de <i>S. Typhimurium</i>	47
Figura 15 - Ensaio de colonização em camundongos BALB/c pelas linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> por via oral	49
Figura 16 - Cinética da resposta de anticorpos IgG detectada em soro dos camundongos imunizados com as diferentes linhagens de <i>S. Typhimurium</i> ..	52

Figura 17 - Títulos de anticorpos IgG sistêmicos nos soros individuais obtidos a partir de camundongos imunizados	53
Figura 18 - Resposta local de anticorpos anti-IgA detectados em amostras fecais obtidos a partir dos camundongos imunizados com três doses das vacinas	54
Figura 19 - Análise e reconhecimento das subunidades A e B em soros obtidos da imunização com as linhagens recombinantes de S. Typhimurium.	56
Figura 20 - Níveis de nitrogênio uréico (uréia) em soro de camundongos imunizados com as linhagens recombinantes de S. Typhimurium e desafiados com a toxina nativa de Stx2	58
Figura 21 - Níveis de creatinina em sangue de camundongos imunizados com as linhagens recombinantes de S. Typhimurium e desafiados com a toxina nativa de Stx2	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de bactérias e vetores utilizados no presente estudo	17
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene <i>Stx2ΔAB</i> .	25
Tabela 3 - Atividade neutralizante Anti-Stx2 dos soros obtidos na imunização com linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i>	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU); Características clínicas, epidemiológicas e patogênese das infecções causadas por linhagens de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	1
1.2	Estratégias profiláticas e terapêuticas contra a SHU	6
1.3	Implicações da imunologia intestinal e de mucosas no desenho de vacinas orais	10
1.4	O uso de <i>Salmonella</i> atenuadas como estratégia de vacinação	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Linhagens bacterianas	18
3.2	Condições de cultivo	18
3.3	Outros meios empregados neste trabalho	18
3.4	Soluções para imunodeteção em filtro (Western Blot)	19
3.5	Soluções para os ensaios imunoenzimáticos (ELISA)	20
3.6	Soluções para mini-preparação de DNA plasmidiano	20
3.7	Anticorpos e outros reagentes biológicos	21
3.8	Soluções para a medição de uréia	21

3.9	Geração de linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> que codificam uma forma atóxica da Stx2	21
3.10	Mini preparações de DNA de plasmídeo	24
3.11	Obtenção da seqüência gênica	24
3.12	Amplificação dos fragmentos Stx2B por PCR	26
3.13	Seqüenciamento automático de DNA	26
3.14	Transformação de células de <i>S. Typhimurium</i> utilizadas nos processos de imunização	26
3.15	Indução da expressão do gene Stx2 Δ AB em células de <i>E. coli</i>	27
3.16	Purificação da proteína Stx2 Δ AB recombinante	28
3.17	Dosagem da proteína Stx2 Δ AB recombinante	28
3.18	Produção de anticorpo anti- Stx2 Δ AB	28
3.19	Ensaio de mobilidade	29
3.20	Imunodeteccção em filtro de nitrocelulose (Ensaio de Western Blot) .	29
3.21	Ensaio de Dot Blot	30
3.22	Ensaio para avaliação da capacidade de colonização e invasão das linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> expressando a proteína Stx2 Δ AB após administração oral em camundongos	31
3.23	Animais utilizados	31
3.24	Preparação das linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> para o processo de imunização em camundongos	31
3.25	Coleta de amostras (sangue e extrato fecal)	32
3.26	Ensaio de ELISA para a titulação de anticorpos produzidos contra a proteína Sxt2 Δ AB	33
3.27	Capacidade de neutralização dos soros: Ensaio de neutralização da toxina Stx2 em células <i>VEROS</i> (teste in vitro)	34
3.28	Ensaio de Neutralização	34

3.29	Determinação dos níveis de uréia e creatinina em soro de camundongos desafiados <i>in vivo</i>	35
4	RESULTADOS	37
4.1	Construção clonagem e caracterização da forma atóxica da Stx2	37
4.2	Caracterização e análise da expressão da proteína Stx2 Δ AB nas linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i>	38
4.3	Análise da estabilidade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> do plasmídeo pCVT2 nas linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i>	44
4.4	Avaliação da capacidade de colonização e invasão das linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i> após administração oral	48
4.5	Respostas imunológicas e efeitos neutralizantes dos anticorpos gerados em camundongos imunizados com linhagens recombinantes de <i>S. Typhimurium</i>	49
4.6	Determinação da concentração sérica de uréia e creatinina em animais submetidos ao ensaio de neutralização <i>in vivo</i>	56
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÕES	67
7	PERSPECTIVAS	68
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO – artigo publicado	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 A Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU): características clínicas, epidemiológicas e patogênese das infecções causadas por linhagens de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Nas últimas duas décadas *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) emergiu como uma ameaça para a saúde pública mundial, causando diarreia severa (colite hemorrágica) que em alguns casos progride para a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU). A SHU é uma doença potencialmente letal, particularmente em crianças menores de 5 anos de idade e em idosos (PATON et al., 2000; CLEARY et al., 2004; BYUN et al., 2001; PERNA et al., 2001), e representa um problema crítico de saúde pública em países latinoamericanos como Argentina (PALERMO et al., 2009). A SHU é caracterizada por falência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica microangiopática (KARMALI et al., 1983, 1985; NATARO e KAPER, 1998).

Dentre os vários sorotipos de EHEC as linhagens do sorotipo O157:H7 receberam maior destaque pois são responsáveis por surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Argentina, Chile e em alguns países europeus (PALERMO et al., 2009; KARMALI et al., 1985; SCOTLAND et al., 1985; TAKEDA, 1997; FRIEDRICH et al., 2002; FRASER et al., 2004). A habilidade de EHEC em produzir lesões chamadas de “attaching and effacing (A/E)” de maneira semelhante à *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é importante para que a bactéria possa causar diarreia e é codificada por uma ilha de patogenicidade de 35 kilobase (Kb) chamada de “locus of enterocyte effacement (LEE)”, presente na maioria das EHECs (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), sendo esse seu principal fator de virulência. Esta citotoxina foi descrita pela primeira vez no ano de 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 sorologicamente distintos: Stx1 e Stx2. A Stx1 está relacionada à toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I, uma vez que anticorpos gerados contra a toxina de Shiga são capazes de neutralizá-la. Stx2 por sua vez não é neutralizada por anticorpos anti-toxina de Shiga, possuindo propriedades imunológicas distintas e subdividindo-se em vários subtipos como Stx2c, Stx2d, Stx2e e Stx2f baseado nos efeitos patogênicos e imunológicos da subunidade A da Stx2 (KARMALI et al., 1986; SCOTLAND et al., 1985). As toxinas da família Stx2 de EHEC são compostas por uma subunidade A enzimaticamente ativa de peso molecular de 32 kDa, possuindo 319 aminoácidos, e de 5 monômeros da subunidade B compondo um anel pentamérico, sendo que cada monômero apresenta peso molecular de 7,7 kDa e 89 aminoácidos (figura 1). O pentâmero B é responsável pela ligação da toxina ao receptor glicolipídico encontrado na superfície da célula alvo, mediando a entrada de Stx2 dentro da célula (FRASER et al., 2004; PATON e PATON, 1998). A toxina Stx1 de EHEC difere da Stx2 de *S. dysenteriae* apenas pela troca de um aminoácido serina para treonina na posição 45 (FRASER et al., 2004). O receptor para a ligação da subunidade B de Stx1, Stx2 e seus variantes é o glicoesfingolípido Gb3 (globotriaosil ceramida Gal α [1-4]Gal β [1-4]),

com exceção da Stx2e que se liga preferencialmente a Gb₄ (FRASER et al., 2004; PATON et al., 2000). Em humanos, o 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).

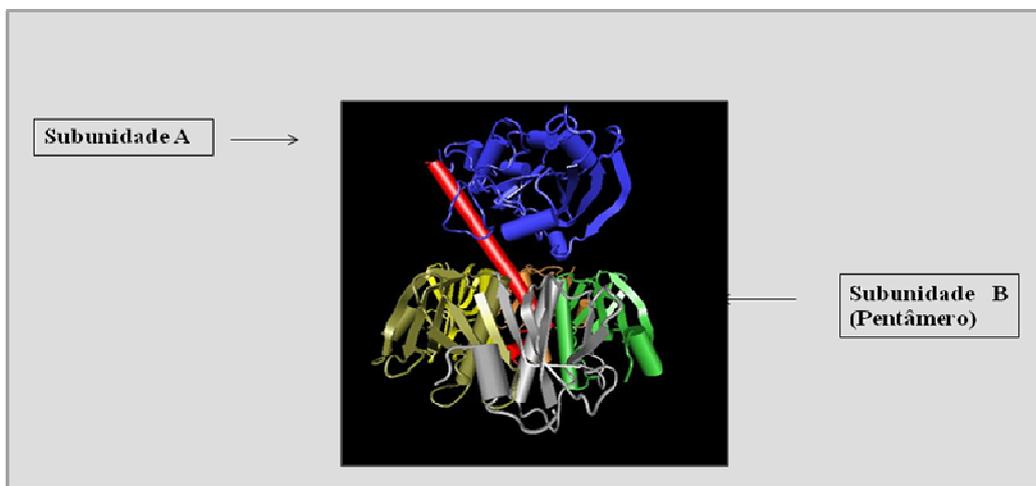


Figura 1. Estrutura da holoproteína mostrando as subunidades A e o pentâmero da subunidade B. A toxina da família Stx2 de EHEC são compostas por uma subunidade A enzimaticamente ativa de peso molecular de 32 kDa, possuindo 319 aminoácidos, e de 5 monômeros da subunidade B compondo um anel pentamérico, sendo que cada monômero apresenta peso molecular de 7,7 kDa e 89 aminoácidos.

Fonte. Fraser et al (2004).

A patogenia da SHU causada por linhagens de EHEC está diretamente relacionada com a produção de Stx2 (BUTTERTON et al., 1997; PATON et al., 2001). Inicialmente ocorre a colonização do intestino por EHEC, sem a invasão de tecidos mais profundos. A Stx2 é produzida e secretada localmente e atinge a corrente sanguínea, se ligando a tecidos alvos específicos de acordo com a quantidade de Gb₃

presente (PATON et al., 2000). Após a ligação do pentâmero B ao receptor da célula do hospedeiro ocorre a internalização da toxina, ocorrendo à 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 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). A figura 2 mostra uma representação esquemática da via de transmissão da Stx2 por linhagens de EHEC e patogênese no intestino e rim.

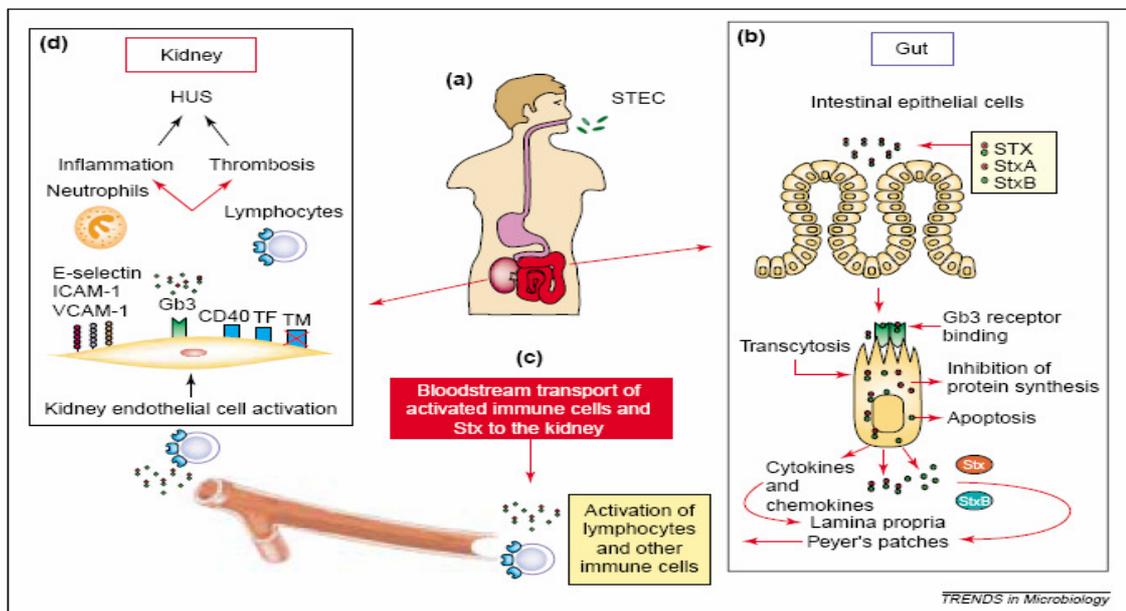


Figura 2. Representação esquemática da via de transmissão da Stx2 por linhagens de EHEC e patógenese no intestino e rim. (a) Bactérias de EHEC são introduzidas pela via oral e rapidamente atravessam o trato gastrointestinal até as células da mucosa do intestino. (b) Moléculas de Stx2 secretadas se ligam no receptor Gb3 do enterócito e facilita que a subunidade A seja introduzida no citoplasma inibindo a síntese de proteínas. (c) Toxina Stx2 é absorvida no intestino e circular na corrente sanguínea até alcançar células do rim. (d) Células imunes que expressam epítomos da Stx2 se ligam no receptor Gb3 de células do rim e produzem a patologia característica da SHU.

Fonte: Heyderman et al. (2001).

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 com SHU e linhagens que produzem as variantes Stx2d e Stx2e estão associadas à diarreias em humanos, mas não a SHU, enquanto linhagens produtoras de Stx2f parecem não ser patogênicas aos humanos (FRIEDRICH et al., 2002). A transmissão pode ocorrer principalmente através do

consumo de carne crua contaminada ou mal cozida, como o hambúrguer e pela ingestão de alimentos crus, ou pode ocorrer durante contato com águas contaminadas (TAKEDA, 1997). Os bovinos representam o principal reservatório de EHECs produtoras de Stx2 e muitas infecções são atribuídas à ingestão de alimentos contaminados (carne, água, frutas e vegetais) e contato pessoa-pessoa (TAKEDA, 1997; ISHIKAWA et al., 2003; POTTER et al., 2004). 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* e as linhagens de EHEC foram prevalentes no trato gastrointestinal de outros animais domésticos incluindo ovelhas, porcos, cachorros, gatos, revelando a ocorrência desse reservatório epidemiológico nesse Estado (IRINO et al., 2005).

1.2 Estratégias profiláticas e terapêuticas contra a SHU

Diferentes tentativas para desenvolver vacinas profiláticas contra a SHU têm sido realizadas nas últimas duas décadas, tendo como foco a geração de anticorpos neutralizantes para Stx2 ou o bloqueio da colonização no intestino. Diferentes estratégias de vacinação com base na utilização da toxina Stx2 testada em condições experimentais incluem as vacinas de DNA (BENTANCOR et al., 2009; CAPPOZO et al., 2003), vacinas de subunidades compostas por polissacarídeos conjugados a proteínas (KONADU et al., 1999), subunidades B purificadas (ISHIKAWA et al., 2003; WEN et al., 2006; TSUJI et al., 2008; ZHU et al., 2008) ou ainda por peptídeos sintéticos derivados da subunidade B (HARARI and ARNON, 1990). As abordagens

vacinais que visaram o bloqueio da colonização do intestino para EHEC têm empregado as proteínas de adesão chamada intimina e as proteínas do sistema de secreção tipo III, tais como EspA e EspB (BABIUX et al., 2008; POTTER et al., 2004; VILTE et al., 2008). Além das estratégias profiláticas anteriores, têm sido descrito o uso de vacinas bivalentes usando vetores bacterianos vivos para respostas anti-Stx2, como *Vibrio cholerae* ou linhagens de *S. Typhimurium* capazes de induzir respostas de anticorpos anti-Stx2B após a administração oral em modelos murinos e de coelhos (SU et al., 1992 BUTTERTON et al., 1997; ACHESON et al., 1996). Uma vacina de DNA consistindo dos 85 primeiros códons do gene que codifica para Stx2A mais o gene íntegro da subunidade B (CAPPOZO et al., 2003) revelaram propriedades imunogênicas e protetoras em camundongos, utilizando como adjuvante o fator estimulador de crescimento de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF). Esta foi a primeira estratégia empregando vacinas de DNA para controle da SHU. Uma segunda estratégia vacinal com o uso de vacinas de DNA utilizou uma construção composta por um fragmento da subunidade A atóxica e a subunidade B completa, que foi capaz de induzir respostas neutralizadoras após desafio em camundongos (BENTANCOR et al., 2009). A utilização de linhagens bacterianas como veículo vacinal, expressando a subunidade B tanto da toxina de Shiga quanto de Stx1 e Stx2 de EHEC foi realizada com o uso de *V. cholerae* expressando Stx1B 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 a proteína híbrida híbrido LamB-StxB resultando na produção de níveis elevados de anticorpos secretados e sistêmicos específicos para a subunidade B da Stx2 (SU et al., 1992).

Em relação as estratégias terapêuticas, uma das primeiras que gerou bastante expectativa entre os nefrologistas foi a ideia de se ligar a toxina Stx2 presente no intestino com o uso de análogos do receptor de Gb3 sintéticos covalentemente ligados a partículas de sílica insolúvel (Synsorb[®] Pk). O Synsorb[®] Pk adsorve a toxina presente no intestino, e está sendo freqüentemente utilizado em estudos de avaliação clínica (KITOV et al., 2000). O uso de Synsorb[®] Pk tem sido bem sucedido para evitar as complicações extra-renais ou para diminuir a duração da diálise em crianças que progridem clinicamente para a SHU (TRACHTMAN et al., 2003). Além disso, os polímeros de Gb3 mostraram-se promissores em adsorver Stx2 no intestino e prever a toxicidade de EHEC em modelo murino. Com este princípio, Paton et al. (2001) construíram uma bactéria que expressa o receptor Gb3 na sua superfície apresentando propriedades neutralizantes com elevada eficiência e foram capazes de proteger em camundongos desafiados com EHEC quando administradas três doses diárias. Esta estratégia ainda está em fase de investigação. O principal problema dessa abordagem terapêutica é que pequenas quantidades de Stx2 que conseguem entrar na circulação são suficientes para induzir SHU.

Levando em consideração as estratégias que usam o receptor Gb3 contra a SHU, diferentes análogos de Gb3 estão sendo desenvolvidos e administrados por via sistêmica. Entre eles, Starfish[®] é um novo componente que se liga a Stx2 uma eficácia 1000 vezes maior do Synsorb[®] Pk e apresenta o potencial de ser administrado intravenosamente. Starfish[®] tem um efeito protetor contra a Stx1 em camundongos desafiados, enquanto que uma versão modificada de Starfish[®], denominada de Daisy[®], pode proteger contra doses letais de Stx1 e Stx2. Alternativamente, Nishikawa et al.

(2005) construiu uma estrutura com potente atividade neutralizante chamado SUPERTWIGS que é formada por 18 trissacarídeos de Gb3 com capacidade de formar complexos com Stx2 na circulação que melhora a eficiência da degradação de Stx2 em macrófagos (NISHIKAWA et al., 2005). Os mesmos autores têm descrito um inibidor de Stx2 baseado em peptídeos que possui um considerável potencial terapêutico e parece funcionar alterando o transporte de Stx2 e sua degradação (NISHIKAWA et al., 2006). Outras estratégias alternativas incluem o uso de inibidores farmacológicos de Gb3 (SILBERSTEIN et al., 2009) e o uso de vários anticorpos anti-Stx2 contra diferentes subunidades de Stx2 e suas variantes. Os anticorpos são utilizados com o objetivo de neutralizar as toxinas Stx1 e Stx2 circulantes, e assim prevenir complicações da SHU como diarreia sanguinolenta, destruição de eritrócitos e plaquetas.

A produção, caracterização e avaliação de um painel de anticorpos monoclonais em camundongos transgênicos foram protetores em camundongos e leitões contra o desafio com Stx2 (MUKHERJEE et al., 2003). Isto é muito importante nas estratégias que utilizam anticorpos monoclonais devido à ausência de reatividade cruzada entre subunidades B de Stx1 e Stx2, e encoraja o desenvolvimento de anticorpos monoclonais anti-Stx2 posto que Stx2 é mais freqüentemente associada à SHU. Além disso, anticorpos monoclonais dirigidos contra a subunidade A da Stx2 mostram-se igualmente ou mais protetores do que a subunidade B (SHEORAN et al., 2003; SMITH et al., 2006). Embora os mecanismos envolvidos sejam matéria de intenso debate, tem sido reportado que anticorpos anti-subunidade A interferem com o transporte retrógrado da Stx2, prevenindo a morte celular dependente da toxina, e pode interagir com Stx2 quando a toxina ainda está ligada ao receptor Gb3 (KRAUTZ-PETERSON et

al., 2008). Além disso, anticorpos dirigidos contra a subunidade A, ao contrário dos anticorpos dirigidos contra a subunidade B, podem ter maior atividade relacionada a efeitos contra outras variantes da Stx2 como a Stx2c (SHEORAN et al., 2003). Alguns destes anticorpos recentemente foram aprovados pela “Food and Drug Administration, (FDA)” e pela “European Medicines Agency, (EMA)” para pacientes pediátricos infectados com EHEC.

Embora as estratégias terapêuticas geralmente enfatizem a neutralização dos fatores de virulência de EHEC, novas estratégias abordam o bloqueio de fatores que contribuem aos processos patogênicos. Em particular, tem sido recentemente postulado que durante a SHU típica, o processo de ativação da via de complemento pela toxina Stx2 pode participar dos mecanismos patogênicos envolvidos na SHU, e por isso, a inibição da via de complemento pode ser um promissor alvo terapêutico (ORTH et al., 2009). Considerando-se que as reações inflamatórias também são importantes na evolução da SHU, o fator de necrose tumoral (FNT- α) e citocinas inflamatórias poderiam ser importantes alvos terapêuticos (SCHERING et al., 2008).

1.3 Implicações da imunologia intestinal e de mucosa no desenho de vacinas orais

A superfície da mucosa intestinal de mamíferos está continuamente exposta a uma comunidade complexa e dinâmica de microorganismos. Esta microbiota intestinal estabelece relações simbióticas com seus hospedeiros, fazendo contribuições importantes para o metabolismo digestivo e eficiência da absorção intestinal (BACKHED et al., 2005) e modulando as respostas imunológicas frente a patógenos

(HOOPER e MACPHERSON, 2010). A superfície do epitélio intestinal é a principal interface entre a microbiota e o vasto sistema de tecidos do intestino do hospedeiro. O intestino dos seres humanos representa um dos mais densamente povoados ecossistemas microbianos da terra, com até 10^{12} organismos por mililitro ou grama de conteúdo luminal (GORDON, 2005). Dada a enorme quantidade de bactérias entéricas e da ameaça persistente de invasão oportunista, é fundamental que o hospedeiro mamífero possua um eficiente mecanismo imunológico para regular as interações microbianas no trato intestinal com as superfícies das mucosas do intestino (DUERKOP et al., 2009). O epitélio constitui um elemento essencial da barreira da mucosa intestinal e apresenta cinco tipos de células (figura 3) que contribuem para função atribuída à mucosa sendo algumas delas células com elevada atividade imunológica (GARRETT et al., 2010). O epitélio da mucosa intestinal compreende uma extensa barreira vulnerável, que é reforçada por mecanismos de defesa inata que cooperam intimamente com a imunidade adaptativa (GARRETT et al., 2010). Um dos principais mecanismos de imunidade inata é a produção de IgA secretora (IgAs), que constitui um mecanismo de exclusão do antígeno em superfícies mucosais como na neutralização de endotoxinas bacterianas sem causar danos aos tecidos (BRANDTZAEG, 2007). A figura 3 mostra uma representação imunológica do epitélio intestinal.

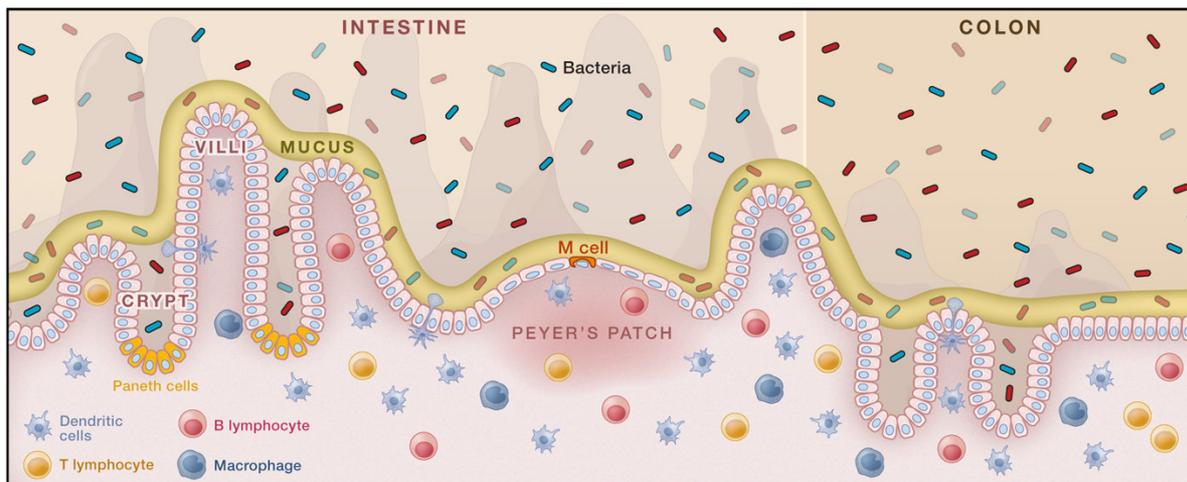


Figura 3. Representação imunológica do epitélio intestinal. A camada de muco (mucina), acima do epitélio intestinal, é uma componente chave da barreira da mucosa intestinal e também é uma fonte de nutrientes e um microhabitat para membros da microbiota bacteriana. O eixo do epitélio das criptas das vilosidades intestinais difere entre o intestino delgado e grosso. Populações bacterianas no enterócito podem variar. As células M e células Paneth são restritas ao intestino delgado. As células Paneth são fundamentais na defesa do hospedeiro produzindo lisozimas e numerosas moléculas antimicrobianas que são importantes em neutralizar patógenos com capacidade de colonizar e invadir as mucosas. As células M são importantes sensores do conteúdo no lúmen intestinal e estão em todo o intestino delgado e placas de Payer. Todas as células imunológicas intestinais que modulam as respostas de indução de tolerância e participam da defesa do hospedeiro localizam-se em sítios efetores e estes locais incluem placas de Payer (intestino delgado), folículos linfóides e placas no cólon (intestino grosso), também em sítios efetores tais como o epitélio e a camada subjacente da lâmina própria. Fonte Garrett et al. (2010).

Como estratégia de imunização nas mucosas do epitélio intestinal, a imunização oral é mais facilmente aceita do que a contraparte parenteral, devido à facilidade e a segurança da administração pela via oral e a capacidade de induzir nas mucosas uma resposta imunológica longa e efetiva contra patógenos. Apesar da necessidade óbvia e do evidente mérito das estratégias vacinais, o sucesso no campo da vacinação oral é limitada devido a fatores como o ambiente gástrico, a barreira enzimática e a barreira do epitélio intestinal (MALIK et al., 2010). O número de estratégias atuais tem sido

focadas no estímulo adequado do sistema imunológico de mucosas, permitindo a máxima absorção e estabilização dos vetores vacinais em busca de respostas imunes locais e sistêmicas. Apesar dos sucessos consideráveis alcançados com estas estratégias nenhum deles alcançou o status comercial (MALIK et al., 2010). Portanto, as estratégias de vacinação oral concebidas racionalmente devem ser hábeis em ativar as células imunológicas da mucosa intestinal, produzir anticorpos secretores nas mucosas (IgAs) e induzir imunidade humoral e celular.

1.4 O uso de linhagens de *Salmonella* atenuadas como estratégia de vacinação

O uso de vetores bacterianos vivos para a expressão de antígenos vacinais representa uma abordagem simples, segura e capaz de ativar o sistema imunológico da mucosa do intestino, que é a principal porta de entrada de patógenos entéricos como a EHEC. Vacinas recombinantes baseadas em linhagens de *Salmonella* atenuadas (VRSA) têm sido usadas para induzir imunidade sistêmica e de mucosa contra antígenos próprios e/ou heterólogos (MCSORLEY et al., 2002; MITTRUCKER et al., 2000). Estudos anteriores demonstraram que o modo de atenuação (DUNSTAN et al., 1998), a quantidade de antígeno (GALEN et al., 2001) e o sistema de expressão (DUNSTAN et al., 1999; KANG et al., 2003; KAUFMANN et al., 1999) utilizados podem ter um profundo impacto sobre a resposta imunológica ao antígeno de interesse. Diversos tipos de atenuação reduzem a sobrevivência destes vetores vivos, devido a estresse induzido pelo hospedeiro e/ou diminuição da colonização de tecidos linfóides, levando a uma diminuição da imunogenicidade (HOHMANN et al., 1996; TACKET et al., 1997). Uma vacina ideal empregando linhagens de *Salmonella* atenuadas como

vetor biológico deve exibir habilidade de colonização semelhante aquela apresentada por linhagens selvagens, sendo capaz de evadir dos mecanismos de estresse (enzimático, pH , iônico e osmótico) e das defesas do hospedeiro (sais biliares, peptídeos antibacterianos, etc.) encontradas nas vias de imunização oral e intranasal, além de colonizar e invadir tecidos linfóides permanecendo avirulenta. A máxima produção de resposta imunológica frente a um antígeno alvo está relacionada à máxima eficiência na expressão deste antígeno, e, portanto, é muito importante caracterizar e avaliar os níveis de antígeno produzidos pelos vetores bacterianos atenuados que estejam sendo utilizados. Além disso, é importante que as VRSA sejam avaliadas quanto á produção do antígeno pela célula, uma vez que pode ter efeitos prejudiciais para o metabolismo das bactérias carregadoras, reduzindo sua taxa de crescimento e comprometendo a habilidade de colonizar tecidos linfóides.

Linhagens de *Salmonella* atenuadas como candidato vacinal têm sido extensivamente estudadas como carregador de antígenos heterólogos em formulações vacinais vivas por vias de mucosas e parenterais (BREY et al. 1991; GARMORY et al., 2002) e capazes de induzir respostas sistêmicas e secretoras contra antígenos heterólogos quando administradas pela via oral (GARMORY et al., 2002). Adicionalmente, peptídeos que induzem respostas de células B, podem ser expressos em proteínas híbridas quando fusionados às proteínas bacterianas. Estas características biológicas podem melhorar a estabilidade e imunogenicidade de antígenos alvo carregados oralmente em vacinas bivalentes (DOUGAN et al., 1987; CHATFIELD et al., 1992).

Estudos previamente realizados em nosso laboratório demonstraram que um regime vacinal combinado empregando uma vacina de DNA como sensibilizador e um reforço utilizando vetores de *S. Typhimurium* como veículo vacinal (LASARO et al., 2004) representaria uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas que requeira respostas de anticorpos sistêmicos e secretados para proteção imunológica. Em paralelo, foi demonstrado que fatores bacterianos e do hospedeiro afetam a indução de respostas imunológicas contra flagelinas expressas em linhagens vacinais de salmonelas atenuadas (SBROGIO-ALMEIDA et al., 2004). Recentemente, foram avaliadas as respostas imunológicas desencadeadas pelo uso de flagelinas recombinantes como carregadores moleculares de antígenos heterólogos em linhagens de *S. Typhimurium* para modelos murinos (MASSIS et al., 2008)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver uma nova estratégia vacinal com propriedades profiláticas contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) associada a linhagens de *Escherichia coli* *enterohemorrágica* (EHEC) produtoras da toxina “Shiga-like” (Stx2), usando linhagens recombinantes de *Salmonella* atenuadas como veículo carregador de antígeno.

2.2 Objetivos específicos

- A) Caracterizar linhagens vacinais de *S. Typhimurium* atenuadas expressando a forma atóxica da toxina Stx2;

- B) Avaliar as propriedades imunogênicas da forma atóxica da toxina Stx2 após o esquema de imunização com as linhagens recombinantes em modelo murino;

- C) Avaliar o poder neutralizante dos soros obtidos após o esquema de imunização com as linhagens vacinais expressando a forma atóxica da Stx2, frente à toxina Stx2 nativa.

3 MATERIAL E MÉTODOS. Linhagens bacterianas

Tabela 1 - Linhagens de bactérias e vetores utilizados no presente estudo.

Linhagens ou Plasmídeo	Genótipo	Referências
<u>S. Typhimurium</u>		
SL3261	<i>aroA his</i>	Hoiseth e Stocker (1981)
LDV321	<i>aroA his Δ fliC(i) Δ fljB</i>	Massis et al. (2008)
LDV326	LDV321 pGEMT	Presente estudo
LDV327	LDV321 pCVT-2	Presente estudo
LDV328	SL3261 pGEMT	Presente estudo
LDV329	SL3261 pCVT-2	Presente estudo
<u>E. coli</u>		
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96</i> <i>relA1 thi⁻ (lac-proAB) F</i> <i>[traD36 proAB⁺ lac^f lacZM15]</i>	Stratagene
LDV15	JM109 pCVT-1	Presente estudo
DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 glnV44, supE44</i> <i>relA1 deo R Δ(lacZargF)U169 hsdR1</i> <i>7 thi-1λ- j80dlac Δ (lacZ) m15 F -</i>	Invitrogen
<u>Plasmídeo</u>		
pGEMT	Amp ^r	Promega
pCVT-1	pGEMT com sequencia completa da <i>Stx2</i>	Presente estudo
pCVT-2	pGEMT con gene <i>Stx2ΔAB</i> clonado	Presente estudo

3.1 Condições de cultivo

Foi usado rotineiramente o meio completo LB (Tryptona, 10g; extrato de levedura, 5g; cloreto de sódio, 5g e água destilada q.s.p. para 1000 mL; pH 7,2) para o cultivo das linhagens em forma *in vitro* seguindo os protocolos de Sambroock et al., 1989. Água deionizada pelo sistema Milli-Q (Millipore Inc., Bedford, M.A., USA) foi utilizada para o preparo de soluções e meio de cultura. Quando necessário, foi adicionado aos meios ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (10 µg/mL) ou novobiocina (1 µg/mL). O meio sólido foi obtido acrescentando-se 2.0% de Agar ao meio LB.

3.2 Outros meios empregados neste trabalho

Meio semi-sólido: preparado conforme descrito por Ikeda (2001), 1% de triptona, 0,5% de NaCl e 0.35% de Agar, pH 7,4. Quando necessário foi adicionado antibiótico ao meio.

Meio DMEM: usado para lavar e manter as células *Vero* durante os ensaios de neutralização *in vitro*. Este meio foi preparado comercialmente (Sigma) e suplementado com penicilina (10 U.I./mL) e estreptomicina (10 µg/mL). O meio DMEM foi enriquecido com 5% ou 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab, Brasil).

Meio SOC:

3.3 Soluções para estudo de proteínas

As soluções para lavagem das células bacterianas e células *Vero* utilizadas nos procedimentos e ensaios foram: Tampão PBS (7,45 mM Na₂HPO₄; 2,5 mM NaH₂PO₄; 145 mM NaCl; pH 7,2; solução estoque concentrada 10X. As soluções para

eletroforese de proteínas (SDS-PAGE) foram preparadas da seguinte forma: 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). A solução de corrida do gel de separação foi de 12% e esta composto de: (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, (1 mL); Acrilamida/Bis C=1,6%, (1,56 mL); água bidestilada, (1,14 ml); 10% SDS, (37 µl); TEMED, (1,5 µL). O gel de empilhamento (5%) foi realizado com as seguintes soluções: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, (0,22 mL); acrilamida/Bis C=5%, (0,29 mL); água bidestilada, (1,19 mL); 10% SDS, (17 uL); 10% PSA, (17 µL); TEMED, (1,7 µL). As soluções para coloração do gel foram da seguinte forma: 0,25% Azul de Coomassie Blue R-250; 50% Metanol; 10% Ácido acético. Para descorar o gel de proteínas as soluções foram da seguinte forma (5% Metanol; 7,5% Ácido acético), a solução para fixação (25% Metanol e 7% Ácido acético).

3.4 Soluções para imunodeteção em filtro (Western Blot)

O Tampão de transferência utilizado em nossas condições apresenta a seguinte composição: 39 mM Glicina; 20% Metanol; 0,0375% SDS; 48 mM Tris-HCl. O Tampão para bloqueio e hibridação com o anticorpo foi realizado com 5% de leite em pó desnatado em PBS-Tween 20 a 0,05%. A Solução de revelação por quimiluminescência para peroxidase foi utilizado o kit SuperSignal West Pico (Pierce) e a solução final continha 500 µL do reagente A e 500 µL do reagente B, misturados no momento do uso em câmara escura.

3.5 Soluções para os ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

Para os ensaios com antígenos ligados à fase sólida foram empregadas placas NUNC Maxisorb (Stx2): tampão de cobertura: PBS, pH 7,4; tampão de bloqueio e diluição dos anticorpos; 5% de leite desnatado em pó em PBS; 0,05% de Tween 20; tampão de lavagem (PBS-T) = PBS acrescido de Tween 20 a 0,05%. O Tampão para revelação foi o seguinte: ácido cítrico 0,1 M, (4,9 mL); Na₂HPO₄, (5,1 mL); água destilada, (10 mL) e pH 5,0. No momento do uso foi adicionado 20 mg de OPD (concentração final de 1mg/mL e 8 µL de H₂O₂ (concentração final de 0,0012%). A solução de bloqueio da reação foi realizada com ácido sulfúrico 1M (10mL).

3.6 Soluções para mini-preparação de DNA plasmidial

As três soluções de trabalho para a mini preparação de DNA plasmidial foram compostas da seguinte forma. A solução P1 (2 mL de EDTA pH 8,0 (0,5 M); 2,5 mL de Tris HCl pH 8,0 (2 M); água mili-Q qsp 100 mL autoclavada por 20 minutos à 120 °C. Depois de esfriar, adicionar RNase para uma concentração final de 100 µg/mL a partir da solução estoque de RNase a 10 mg/mL. Armazenar à 4 °C. A Solução P2 possui (200 µL NaOH 10N; 500 µL SDS 20%, água milli-Q qsp 10 mL. A solução P3 apresenta a seguinte composição (29,4 g KOAc; 11,4 mL ácido acético glacial; água milli-Q. Depois se procede a homogeneizar e autoclavar 20 minutos à 120 °C. Armazenar à 4 °C.

3.7 Anticorpos e outros reagentes biológicos

O anticorpo anti-Stx2 foi gerado em coelhos no Instituto Butantã e cedido pela professora doutora Roxanne Maria Fontes Piazza, do Instituto Butantan. O anticorpo anti-Stx2 Δ AB gerado em camundongo foi produzido em nosso laboratório e foi usado na maior parte dos experimentos, principalmente ensaios de Elisa, na diluição 1:2500.

Outros anticorpos empregados foram os seguintes: anti-IgG de camundongo e anti-IgA de camundongo (Sigma, Aldrich), produzidos em cabra conjugados à peroxidase. Estes conjugados foram empregados na diluição 1:3000 nos ensaios de Western blots e Elisás.

3.8 Soluções para a medição de uréia.

Padrão de urease (268UI/L) contida em tampão fosfato (10mM).

A solução tampão contém tampão fosfato (100mM), pH 6,9; salicilato de sódio (321 mM) e nitroprusiato de sódio (16,8 mM). O oxidante contém hidróxido de sódio (2,8 mM) e hipoclorito de sódio (121 MM). O padrão de uréia (70 mg/dL) foi dissolvida em azida sódica (7,7 mM)

3.9 Geração de linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* que codificam uma forma atóxica da Stx2

A seqüência nucleotídica completa que codifica o gene Stx2, incluindo o sitio da região promotora, foi amplificada por PCR obtido de DNA plasmidial da linhagem de *E. coli* JM109 que foi transformada com a toxina Stx2 completa no vetor de clonagem. Os iniciadores mostrados na tabela 2 foram clonados no sitio de restrição *EcoRI* na região de múltiplo sítios de restrição do vetor de clonagem pGEM-T. O vetor recombinante

selecionado foi chamado pCVT-1 que possui o operon completo do gene *Stx2*, incluindo a seqüência do promotor nativo. Após a transformação em células de *E. coli* DH5- α e a seleção do clone recombinante, o plasmídeo foi digerido com o *Ava*I e *Stu*I, tratados com fragmentos “Klenow” de DNA polimerase, e ligada com a enzima T4 DNA ligase resultando no vetor pCVT-2. Este vetor codifica a subunidade B (com o peptídeo sinal e a seqüência da proteína madura), acrescido de um fragmento contendo os 33 aminoácidos iniciais do extremo C-terminal da subunidade A1. As etapas experimentais relacionadas com a clonagem e construção do gene que codifica a forma *Stx2* e *Stx2* Δ AB, bem como as seqüências de nucleotídeos destas construções, foram relatadas previamente por BENTANCOR et al., 2009. Após a triagem e seleção de um clone com os genes desejados, o vetor pCVT-2 foi eletroporado em linhagens de *S. Typhimurium* SL3261 (linhagem flagelar) e a linhagem não flagelada de *S. Thypimurium* (LDV321), resultando nas novas linhagens recombinantes chamadas LDV329 e LDV327, respectivamente. Linhagens recombinantes controle, carregando o plasmídeo pGEM-T vazio, foram denominadas LDV326 (linhagem aflagelada) e LDV328 (linhagem flagelar). Uma representação esquemática das construções e os plasmídios usados estão representados nas figuras 4 e 5.

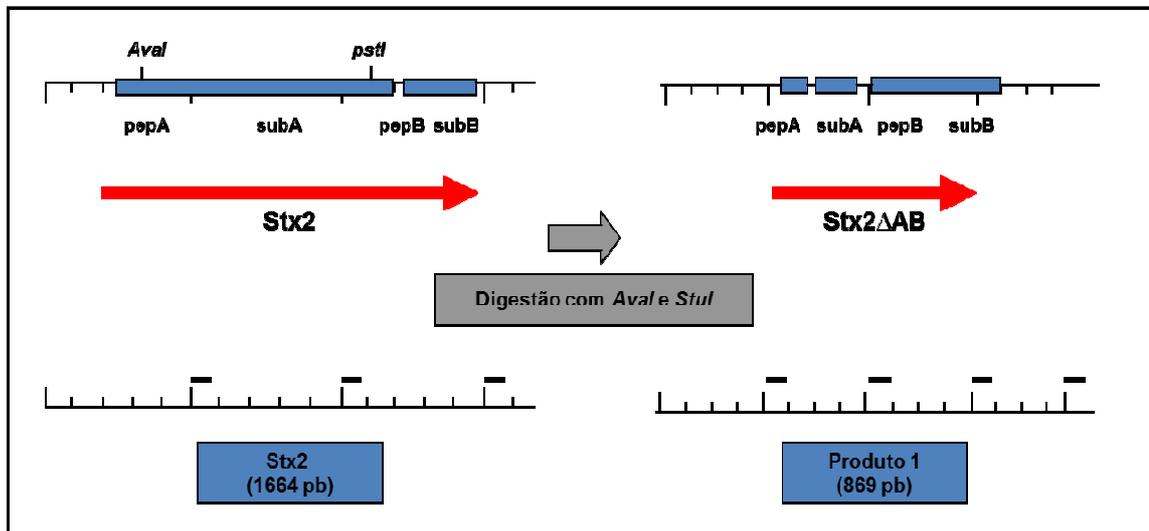


Figura 4. Construção da proteína Stx2ΔAB. A construção foi realizada usando as enzimas de digestão *AvaI* e *StuI* que conduz a deleção da subunidade A e a formação de um produto de 869 pb após ligação com enzima ligase. Esta construção foi realizada e descrita por Bentancor et al (2009).

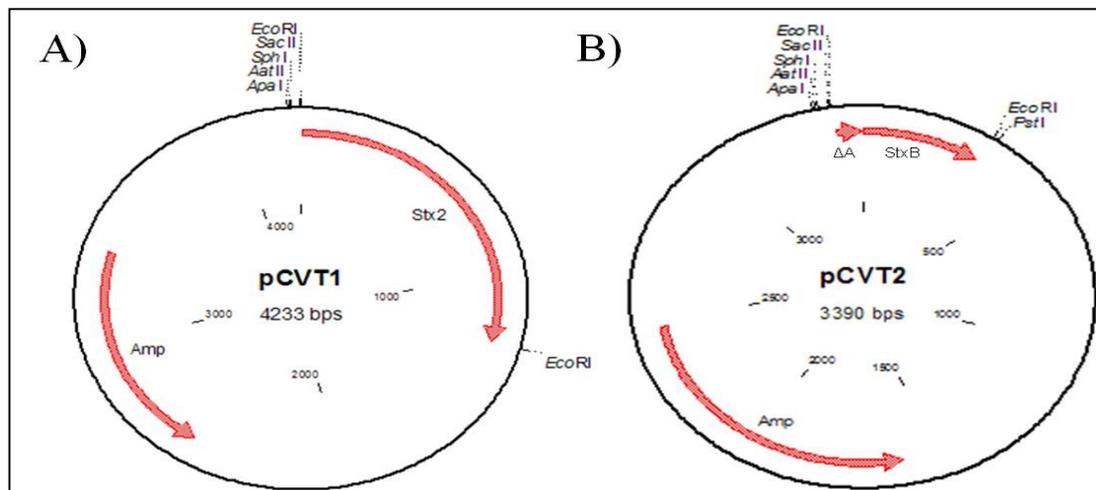


Figura 5. Representação esquemática dos vetores pCVT1 (A) e pCVT2 (B). O gene *Stx2* foi clonado no plasmídeo pCVT1 e digerido seguindo o protocolo de Bentancor et al (2009) e o fragmento de 869 pb obtido foi clonado no vetor pGEMT-easy chamando-se pCVT2.

3.10 Mini preparações de DNA de plasmídeo

Foi utilizado procedimento de lise alcalina com adição de RNase antes do rompimento das células. Neste processo, usou-se de 0,5 a 1 mL de uma cultura bacteriana, cultivada por aproximadamente 12 horas, feita a partir de uma colônia isolada. Após centrifugar por 10 minutos, a 10.000 x g, o meio foi retirado e o precipitado bacteriano deixado o mais seco possível. As células foram ressuspensas completamente em 150 µL de solução P1 e, a seguir, adicionados 150 µL da solução P2, sendo o conteúdo misturado por inversão. Depois de centrifugação por 15 minutos, a 10.000 g a 4 °C, o sobrenadante foi recuperado e passado para um novo tubo. O sobrenadante recuperado foi precipitado com 300 µL de isopropanol. Depois de centrifugados a 10.000 x g, por 15 minutos, a 18 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado bem seco foi ressuspense em 20 µL de água Milli-Q. Foi acrescentado 12 µL de PEG-NaCl e os tubos deixados no gelo por 60 minutos e depois centrifugados por 15 minutos a 10.000 x g, a 4 °C para retirada do PEG-NaCl. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco e ressuspense em 20 µL de água Milli-Q estéril. As amostras foram conservadas a -70 °C.

3.11 Obtenção da seqüência gênica

A seqüência do gene *Stx2* foi obtida no site da KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) como foi analisado por Gomes et al. (2009).

3.12 Amplificação da subunidade B da Stx2 por PCR

Para a amplificação por PCR da seqüência gênica estudada neste trabalho, foram utilizados iniciadores específicos para a identificação da subunidade B, baseando-se na seqüência do gene que codifica para a Stx2 depositada no KEGG. As reações em 50 µL continham 2 µL de extrato de DNA total, 10 pmol de iniciadores para a subunidade 2B, 2,5 mM de MgCl₂, 1 mM de dideoxynucleotídeos trifosfatados, 1 U de Taq polimerase e seu respectivo tampão na concentração final de 1X (Fermentas). O programa de PCR estabelecido para amplificação envolveu um passo de desnaturação a 95 °C por 5 segundos, seguidos de 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 30 segundos a 52 °C e 90 segundos a 72 °C, com um passo final de extensão de 10 minutos a 72 °C. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1,2% (m/v) e corados com brometo de etídio. O fragmento referente ao gene *Stx2B* foi amplificado a partir do DNA genômico da linhagem de *E. coli* JM109 que possui o gene completa da toxina Stx2. Os oligonucleotídeos utilizados estão indicados na tabela 2.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene *StxB*.

<u>Iniciadores</u>	<u>Seqüência 5' - 3'</u>
Stx2B-Fw	5'-GAATTCATTATGCGTTGTTAG-3'
Stx2B-Rv	5'-GAAT TCTCAGTC ATTATTAAACTG-3'

3.13 Seqüenciamento automático de DNA

As seqüências foram determinadas e confirmadas pela técnica de interrupção de síntese com dideoxynucleotideos marcadas com fluorocromos. Foi utilizado o seqüenciador automático (ABI 377, Perkin-Elmer Applied Biosystems) disponível no Departamento de Microbiologia e com o kit “BigDye terminator DNA sequencing” (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Warrington, England).

3.14 Transformação de células de *S. Typhimurium* utilizadas nos processos de imunização

Foram preparadas células de *S. Typhimurium* competentes para ser transformadas por eletroporação. O procedimento em cultivo foi feito em 500 mL de meio LB até atingir uma D.O._{600nm} igual a 0,5. As células foram mantidas em gelo e centrifugadas durante 15 minutos a 6000 x g. O precipitado foi ressuspenso em 50 mL de água Milli-Q gelado e centrifugado como anteriormente. As células foram lavadas novamente em água gelada (250 mL), centrifugadas e ressuspenso em 50 mL de água gelada com 10% de glicerol. Após nova centrifugação, as células foram ressuspenso em 1 mL de água gelada e glicerol a 10% e o volume final distribuído em tubos com 40 µL e congelados rapidamente. As alíquotas foram estocadas a -70 °C. A cada alíquota de células foi misturado com 2 µL de DNA (quantidade mínima de 100 ng) e a mistura transferida para uma cuba de eletroporação. O pulso elétrico utilizou resistência de 200 Ohms, capacitância de 25 µF e 2500 V (condições recomendadas pelo fabricante). Imediatamente após o pulso foi adicionado 1 mL de meio SOC na cuba. Em seguida, o material foi transferido para um tubo de ensaio e incubado a 37 °C

durante 60 minutos, sob agitação. As células foram plaqueadas em meio LB-agar, acrescido de antibiótico, e incubadas a 37 °C durante aproximadamente 12 a 16 horas.

3.15 Indução da expressão do gene *Stx2ΔAB* em células de *E. coli*

Linhagens de *E. coli* BL21pLysS foram submetidas para avaliar a expressão da proteína *Stx2ΔAB* em condições de cultivo. A partir de uma colônia destas linhagens, a indução por IPTG foi realizada através de inoculo de 1/100 em Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 µg/mL), incubadas a 37°C, 200 rpm em agitador orbital até a D.O. (600 nm) de 0,6, seguiu-se a adição do agente indutor IPTG a uma concentração final de 0,5 mM e procedeu-se a uma nova incubação por 4h. Alíquotas foram retiradas antes (T₀) e depois da indução (T₂) e após centrifugação a 9.500 x g por 5 minutos os precipitados foram ressuspensos em tampão de amostra e as células foram tratadas num sonicador (Branson Digital Sonifer 450D) de células durante 30 minutos com lisozima (100 µg/mL) no gelo e lisadas com 6 pulsos de 15 segundos com 5 segundos de intervalo entre os pulsos e 40% de amplitude. Os extratos bacterianos clarificados por centrifugação a 1.500 x g por 20 minutos 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 imunoblot.

3.16 Purificação da proteína Stx2 Δ AB recombinante

As frações solúveis obtidas do procedimento de indução de proteína, e posterior lise, foram filtradas em membranas com poros de 0,22 μ m de diâmetro (Sartorius) eluídas em tampões com concentrações diferentes de imidazol, fosfato de sódio (20 mM), NaCl (500 mM) e purificadas com resina de sefarose impregnada por níquel utilizando o FPLC (Fine Performance Liquid Chromatography) AKTA (Amersham Pharmacia). As frações coletadas foram analisadas em SD-PAGE. Para a retirada do imidazol as frações purificadas foram transferidas para um filtro de 5000MW (Amicon, Millipore) e lavadas 20X o volume inicial com PBS através da centrifugação a 5000 g.

3.17 Dosagem da proteína Stx2 Δ AB recombinante

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

3.18 Produção de anticorpo anti- Stx2 Δ AB

Após a purificação e quantificação da proteína Stx2 Δ AB foi realizada a imunização de camundongos BALB/c para a obtenção de anticorpos anti-Stx2. O esquema de imunização foi composto por 4 doses, 2 grupos que receberam a proteína na forma nativa (25 μ g/dose/animal) ou na forma linear desnaturada (10 μ g/dose/animal) por aquecimento a 100 °C por 10 minutos.

A primeira dose foi administrada com adjuvante completo de Freund (Sigma) e as demais doses com adjuvante incompleto de Freund. O intervalo entre as doses obedeceu ao esquema de 1, 10, 17, 30 dias. Os animais foram sangrados pelo plexo retroorbital e os soros foram colhidos e guardados a -20°C até o momento do uso.

3.19 Ensaio de mobilidade

As mobilidades das diferentes linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* foram determinadas em placas contendo meio semi-sólido. Cada linhagem foi semeada na forma de ponto no centro da placa com o auxílio do palito. A leitura foi realizada a cada 3 horas durante 24 horas em um cultivo á 37°C medindo-se o diâmetro do halo de crescimento em centímetros.

3.20 Imunodeteccção em filtro de nitrocelulose (Ensaio de Western Blot)

Após a separação das proteínas por eletroforese, estas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose (Hybond-C Extra Amersham) em solução de transferência durante 1 hora com corrente aplicada de 30 mA. Os sítios não específicos de ligação do anticorpo á nitrocelulose foram bloqueados com 2% de leite desnatado em PBS e 0,05% de Tween 20 (Sigma). Após 1 hora de incubação com agitação, o filtro foi lavado 3 vezes com PBS-T durante 10 minutos para cada lavagem. A seguir, o filtro foi incubado por 1 hora, em agitação, com o soro diluído em solução bloqueadora. O filtro foi lavado novamente 3 vezes (5 minutos cada lavagem) e incubado com o anticorpo secundário anti-IgG ou anti-IgA de camundongo, conjugado com peroxidase durante 1 hora com agitação. Para revelação por quimiluminescência o filtro foi lavado 2 vezes (5

minutos cada) com PBS. O reagente de revelação (Kit SuperSignal West Pico da Pierce) foi colocado sobre a membrana, de acordo com o fabricante, dentro de uma cassete fotográfico e recoberto por uma folha de acetato de celulose. A revelação foi feita em câmara escura e o filme exposto durante cerca de 30 segundos e submetido a revelação com revelador fotográfico (GBX, Kodax).

3.21 Ensaio de Dot Blot

A quantidade de Stx2 Δ AB expressa em cada linhagem recombinante de *S. Typhimurium* foi determinada comparando sua expressão com uma proteína padrão purificada da subunidade B da Stx2. Alíquotas contendo aproximadamente 10⁸ UFC (10 μ g de proteína total) foram diluídas em série em PBS, sendo posteriormente colocados 10 μ l em membranas de nitrocelulose usando um dispositivo de aspiração ao vácuo (Millipore). Alíquotas do sobrenadante da cultura bacteriana foram coletadas sendo precipitadas com 10% de ácido tricloroacético (TCA), posterior lavagens com acetona fria e ressuspensos em PBS (pH 7,4). Uma alíquota (2 μ l) de cada amostra foi carregada na membrana de nitrocelulose e posteriormente foram incubadas com soro anti-Stx2B por 1 hora, seguido por incubação com anticorpos secundários (anticorpos IgG de coelho conjugado com peroxidase contra camundongo [Sigma] por 1 hora). A revelação dos “spots” foi feita utilizando a mesma metodologia empregada em ensaios de Western Blots.

3.22 Ensaio para avaliação da capacidade de colonização e invasão das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* expressando a proteína Stx2ΔAB após administração oral em camundongos

Para verificar a capacidade colonizar e invadir das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* que expressam a proteína Stx2ΔAB empregou-se uma dose única de 10^{10} bactérias a partir de um cultivo recente e administrado oralmente em 0,5 mL de bicarbonato de sódio 0,1 M com auxílio de uma cânula metálica curvada com esfera na ponta. Após a inoculação, em diferentes intervalos de tempo 3 animais de cada grupo foram sacrificados e de maneira asséptica, foram retirados 5 placas de Payer e o baço de cada animal, que foram homogeneizados separadamente em 1 mL de solução salina e plaqueados em meio de cultura apropriado. Após 24 horas foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas no meio.

3.23 Animais utilizados

Os camundongos utilizados neste estudo foram da linhagem BALB/c, fêmeas com 10 a 12 semanas de idade, obtidos junto ao Biotério de isogênicos do ICB da USP. Todos os procedimentos utilizando animais estiveram de acordo e aprovados pelo comitê de Ética do nosso Instituto e da Universidade de São Paulo.

3.24 Preparação das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* para o processo de imunização em camundongos

As linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* utilizadas no presente estudo foram semeadas em meio líquido LB, com o sem antibiótico de pressão seletiva a partir dos estoques a -70°C e incubadas durante uma noite a 37°C com agitação. A partir

desse inoculo foi realizado um cultivo com diluição de 1:50 a 37 °C com agitação de 200 rpm até alcançar uma D.O. entre 0,5 e 0,8 (600 nm). As células foram lavadas 2 vezes com solução salina e ressuspensas na concentração necessária de acordo com a via oral de imunização a ser utilizada como indicado a seguir:

Via oral (i.o.): 2×10^{10} UFC/mL de bactérias recombinantes usadas em bicarbonato de sódio 0,1 M. volume utilizado: 0,5 mL/ animal administrado de cânula metálica curva com esfera na ponta (gavage).

O protocolo de Imunização utilizado para via oral foi composto de 3 doses com intervalos de 21 dias entre a primeira dose e a segunda dose, e de 14 dias entre a segunda dose e a terceira (dias 1, 22 e 36) idem na página 48.

3.25 Coleta de amostras (sangue e extrato fecal)

A coleta de sangue dos camundongos na maioria dos protocolos de imunização foi realizada sete dias após a inoculação da ultima dose por punção no plexo retro-orbital, obtendo-se cerca de 150 a 300 µL de sangue total. Os animais foram levemente atordoados com éter etílico, e após a sangria, o sangue foi coagulado a 37 °C por 30 minutos e a retração do coágulo foi obtida a 4 °C por 60 minutos. Após centrifugação durante 15 minutos a 4.000 x g a 4 °C, o soro foi retirado e estocado a -20 °C.

O extrato fecal foi preparado após a coleta das fezes de cada grupo experimental seguindo o procedimento descrito por De Vos e Dick (1991). Os animais permaneceram durante, aproximadamente uma hora, em caixa plástica higienizada com álcool 70° GL, seca e sem maravalha. As fezes de cada grupo foram

acondicionadas em tubos esterilizados e pré-tratados, ressuspensas em PBS na proporção de 1:10 (p/v), ou seja, 1 grama de fezes para 10 mL de PBS. Após repouso de 15 minutos em temperatura ambiente foram agitadas vigorosamente em agitador tipo Vortex. Após 15 minutos em repouso as amostras foram novamente agitadas e centrifugadas a 10.000 x g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram removidos, distribuídos em alíquotas e estocados a -70 °C.

3.26 Ensaio de ELISA para a titulação de anticorpos produzidos contra a proteína Sxt2ΔAB

Microplacas de poliestireno Maxisorp (Nunc) foram sensibilizados por 12h a 4^o C com 100 ng/poço da proteína StxB purificada e lavada em tampão PBS. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T. Após a lavagem foi realizado o bloqueio adicionando-se 200 µL de PBS-T com 0,1% de BSA durante 30 minutos a 37^o C, após novo ciclo de lavagem (3X), foi adicionado o pool de soros dos animais imunizados na diluição de 1/200 em solução de PBS-T com 0,1% de BSA e incubadas a temperatura ambiente por 1 hora a 37^o 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 1 hora a 37^o C. Em seguida as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T. A revelação foi realizada 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 óptica foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystem).

3.27 Capacidade de neutralização dos soros: Ensaio de neutralização da toxina Stx2 em células VERO (teste *in vitro*)

Amostras de soro foram diluídas serialmente em DMEM numa microplaca iniciando com a diluição de 1:5 num volume de 75 µL por poço, o extrato contendo a toxina Stx2 (75 µL) na diluição final de 1:2500, em DMEM, foi misturado às amostras de soro, incubado por 1 h a 37 °C e 1 h a 4 °C. Controles contendo apenas meio de cultura e a toxina também foram realizadas. Após a incubação, 150 µL de cada poço a placa de diluição foram transferidos para uma placa de 96 poços contendo uma monocamada de 10⁴ células *Vero* e incubadas a 37 °C por 48h em atmosferas de 5% de CO₂. Após a incubação descartou-se cuidadosamente o meio e a monocamada foi lavada com 100 µL de PBS, acrescentando-se 100 µL de cristal violeta e incubou-se por 15 minutos a 37°C para, posteriormente, lavar as placas submergidas em água duas vezes e finalmente, acrescentar na placa 100 µL de ácido acético por 20 minutos a temperatura ambiente. A leitura da densidade óptica foi realizada a 555 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystem).

3.28 Ensaio de Neutralização *Ex vivo* e Desafio

Para determinar a capacidade neutralizante do anticorpo *Ex vivo*, amostras de soro obtidas das imunizações com as linhagens recombinantes foram incubadas com a proteína Stx2 nativa 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 de soro mais a toxina Stx2 em camundongos BALB/c. Utilizaram-se os soros na proporção 1/10 (Stx2/soro) dos animais imunizados oralmente com as linhagens recombinantes utilizadas neste estudo, assim como o soro dos animais imunizados com a proteína Stx2B na proporção

1/10 e 1/100 e o soro anti-Stx2 cedido pela prof. Dra. Roxanne Piazza na proporção 1/100 e 1/1000. Como controle negativo um grupo de animais recebeu apenas a proteína Stx2 e a sobrevivência dos animais foi avaliada durante quatro dias como foi descrito por Bentancor et al. (2009). Os estudos da letalidade *in vivo* foram levados inoculando a proteína nativa Stx2 nos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes. A dose de Stx2 utilizada nos ensaios *Ex vivo* e desafio foi de duas vezes a dose letal 50% (2LD50), que corresponde a 53 ng/Stx2/camundongo.

3.29 Determinação dos níveis de uréia e creatinina em soro de camundongos desafiados *in vivo*

As concentrações de uréia e de creatinina em amostras de soro de camundongos desafiados com Stx2 nativa foram determinadas pelo método enzimático-colorimétrico por um Kit comercial (Labtest-Brazil. www.bioclin.com.br). Os resultados foram analisados num espectrofotômetro Ultrospec 2100 (Amersham Biosciences). A metodologia usada para análise de creatinina em soro foi cinético de tempo fixo. Brevemente, a uréia é hidrolisada em NH_3 e CO_2 pela uréase e a Glutamato desidrogenase (GLDH) na presença de NH_3 e α -Cetoglutarato oxida o NADH para NAD^+ . A oxidação de NADH a NAD^+ , medida pela diminuição de absorvância é proporcional à concentração de uréia na amostra.

A metodologia utilizada para o análise de creatinina foi colorimétrico (Jaffé modificado). Brevemente, a creatinina reage com ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo corado creatinina-picrato, e , também com outros elementos plasmáticos. Com a adição

do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor devida á creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios. Por diferença entre as leituras obtidas no pH ácido, obtém-se o valor real da creatinina.

4 RESULTADOS

4.1 Construção, clonagem e caracterização da forma atóxica da Stx2

A avaliação do papel imunológico da forma atóxica de Stx2 expressa por linhagens atenuadas de *S. Typhimurium* foi necessário a construção de um vetor de expressão para o gene *Stx2*, deletado na região codificadora para a subunidade A. Esta estratégia foi utilizada a partir da metodologia empregada por Bentancor et al. (2009) em nosso laboratório em colaboração com o grupo da professora Marina Palermo da Academia Nacional de Medicina da Argentina, como parte de um programa Capes e a Secretaria de Ciência e Tecnologia (SECyT) em Buenos Aires, Argentina. Inicialmente Bentancor et al (2009) inseriu o gene *Stx2* no vetor comercial pGEM-T easy (Promega INC, USA), que resultou a construção do vetor pCVT1 como foi mostrado na figura 5. Desta forma determinou-se que a dupla digestão do vetor pCVT1 com as enzimas *StuI* e *AvaI* poderia manter o primeiro aminoácido da subunidade A e os últimos 31 aminoácidos da mesma subunidade que estariam envolvidos na pentamerização da subunidade B, e a subunidade B intacta (BENTANCOR et al., 2009). Após a dupla digestão, a DNA polimerase *klenow* foi utilizada para gerar extremidades na sequência do fragmento da *StxΔAB*, as quais foram posteriormente ligadas, gerando assim o plasmídeo pCVT2. Essa construção apresenta a sequência de nucleotídeos no gene *Stx2* que codifica para a forma atóxica da proteína (*Stx2ΔAB*). Uma vez caracterizado e confirmado pelo sequenciamento, o plasmídeo pCVT2 foi posteriormente utilizado para transformar linhagens de *S. Typhimurium* empregadas

nos procedimentos de imunização. A figura 6 mostra os produtos de PCR amplificados que identificam a subunidade B.

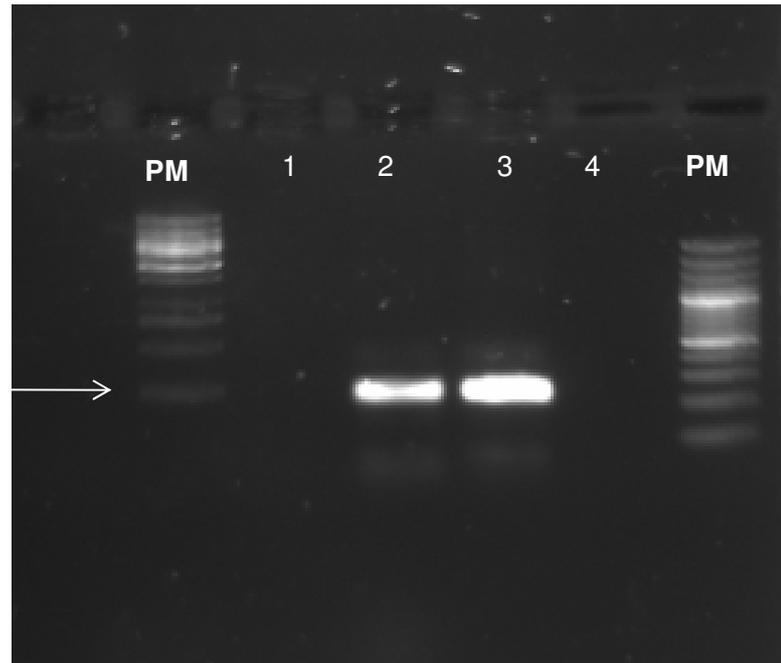


Figura 6. Amplificação do fragmento de PCR indicando a presença do gene *Stx2ΔAB*. Amostras: 1, DNA plasmidial da linhagem LDV326; 2, DNA plasmidial da linhagem LDV327; 3, DNA plasmidial da linhagem LDV329; 4, DNA plasmidial da linhagem LDV328.

4.2 Caracterização e análise da expressão da proteína *Stx2ΔAB* nas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*

Com o intuito de analisar algumas características metabólicas que pudessem melhorar as condições de crescimento das linhagens de *S. Typhimurium* acrescentamos nos cultivos o substrato DHBA. Como as linhagens de *S. Typhimurium*

utilizadas neste estudo são células deficientes na via metabólica de aminoácidos aromáticos, a adição de DHBA poderia restabelecer as condições metabólicas da via de aminoácidos nessas linhagens. Desta forma, pelas análises das curvas de crescimento em ausência ou presença deste substrato metabólico em meio LB, demonstrou-se que as linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* não apresentaram diferenças significativas no crescimento durante a fase exponencial e estacionária, sugerindo que o meio complexo LB já possui os nutrientes necessários (Figura 7 e 8)

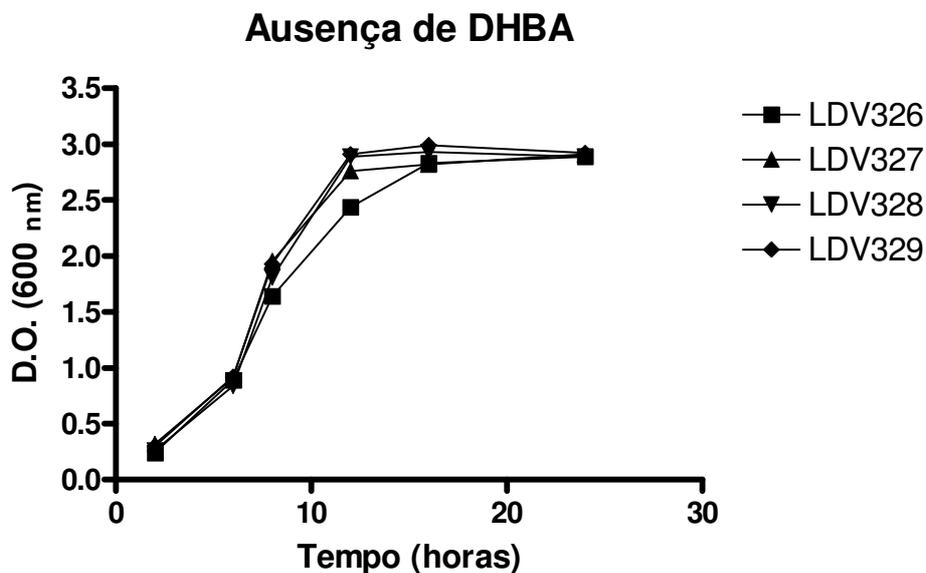


Figura 7. Curvas de crescimento em ausência de DHBA nas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* utilizadas neste estudo. As linhagens foram mantidas sob pressão seletiva (ampicilina) a 37 °C e agitação intensa (200 rpm) por aproximadamente 24 horas. O ensaio é representativo de três experimentos independentemente em duplicata.

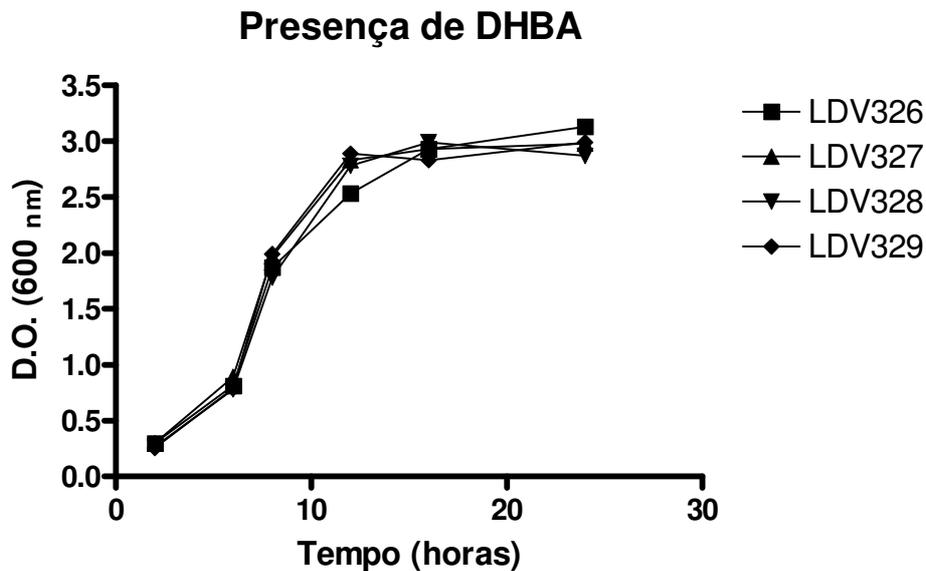


Figura 8. Curvas de crescimento em presença de DHBA nas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* utilizadas neste estudo. As linhagens foram mantidas sob pressão seletiva (ampicilina) a 37 °C e agitação intensa (200 rpm) por aproximadamente 24 horas. O ensaio é representativo de três experimentos independentes em duplicata.

Para verificar possíveis diferenças na produção da flagelina foi realizada a análise da expressão desta proteína nas linhagens recombinantes por Western blot, mostrando-se na figura 9A que as linhagens flageladas, LDV328 e LDV329, mostram respectivamente uma banda de massa molecular de 52 kDa, e ausência desta proteína nas linhagens sem flagelo (LDV326 e LDV327). Posteriormente à confirmação da expressão da flagelina, foi realizado o ensaio de mobilidade para a demonstração da funcionalidade dos flagelos nestas linhagens. A avaliação da mobilidade *in vitro* foi o primeiro passo. Esse ensaio consiste na observação do crescimento em ágar semi-sólido, no qual o diâmetro do halo de crescimento foi medido após 24 horas de

incubação. Os resultados do ensaio de mobilidade para as diferentes linhagens utilizadas neste trabalho estão representadas na figura 9C. Podemos observar que tanto a linhagem LDV328 quanto LDV329 (que expressam a proteína flagelina) apresentam mobilidades semelhantes, demonstrando que não há diferença na mobilidade dessas linhagens, corroborando o trabalho de Massis et al.(2009) realizados em nosso laboratório.

Outra variável analisada neste estudo foi à confirmação da expressão da proteína Stx2 Δ AB nas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*. Esta análise foi realizada em sobrenadantes de cultura e em extratos celulares provenientes de cultivos das linhagens recombinantes por 12 horas, e confirmamos o tamanho molecular utilizando a proteína de 7 kDa da subunidade B expressa na linhagem de *E. coli* BL21pLysS. A figura 9B mostra a presença de uma banda de 7 kDa que reage com o anticorpo policlonal anti-Stx2 Δ AB obtido após imunização em camundongo para as linhagens recombinantes LDV327 e LDV329, tanto em extrato celular como em sobrenadante. As linhagens controle, LDV326 e LDV328, não mostraram reatividade com o anticorpo policlonal anti-Stx2 Δ AB.

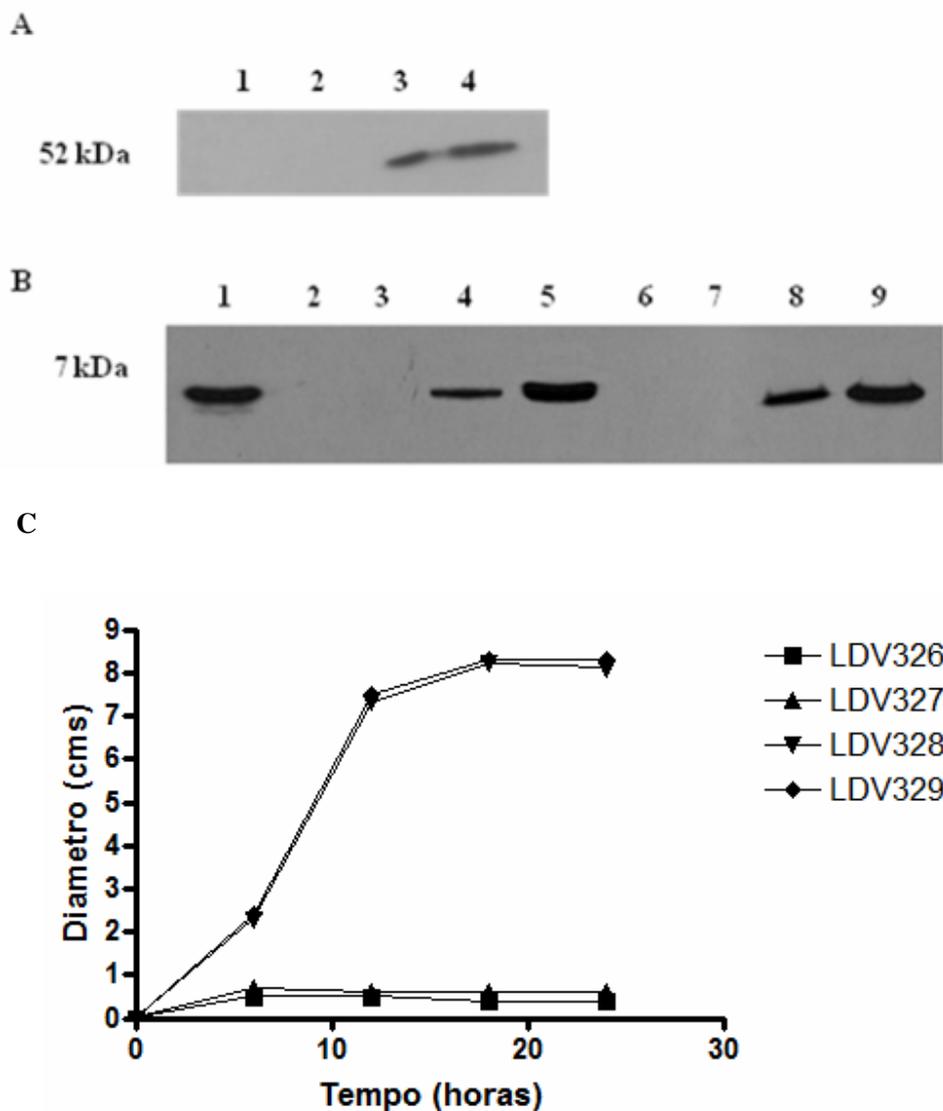


Figura 9. Caracterização das linhagens vacinais de *S. Typhimurium*. (A) Detecção de expressão da proteína Flic nas linhagens *S. Typhimurium*. Detecção da proteína Flic foi realizada em Western blots desenvolvidos com anticorpos policlonais anti-Flic em extratos celulares das linhagens bacterianas. Amostras: 1, linhagem LDV326; 2, linhagem LDV327; 3, linhagem LDV328; 4, linhagem LDV329. (B) Detecção da proteína Stx2ΔAB secretada no sobrenadante de cultura a partir das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*. Amostras: 1, proteína Stx2B recombinante purificada; 2, proteína secretada no sobrenadante de cultura da linhagem LDV326; 3, extrato celular da linhagem LDV326; 4, proteína secretada no sobrenadante de cultura da linhagem LDV327; 5, extrato celular da linhagem LDV327; 6, proteína secretada no sobrenadante de cultura da linhagem LDV328; 7, extrato celular da linhagem LDV328; 8, proteína secretada no sobrenadante de cultura da linhagem LDV329; 9, extrato de celular da linhagem LDV329. (C) teste de mobilidade *in vitro* das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*. Linhagens testadas de *S. Typhimurium*: LDV326 (■), LDV327 (▲), LDV328 (▼); LDV329 (◆).

A quantidade de antígeno Stx2 que estaria sendo expresso nas linhagens recombinantes LDV327 e LDV329 foi determinada por ensaios de “Dot Blot” em extratos celulares e sobrenadantes de bactérias em fase logarítmica de crescimento e cultivadas em meio LB a 37 °C. Nessas condições, aproximadamente 10^{10} UFC de *S. Typhimurium* das linhagens LDV327 e LDV329 acumularam intracelularmente aproximadamente 3,5 µg de Stx2ΔAB, sem diferenças significativas entre elas. Além disso, a quantidade de antígeno secretado em sobrenadante de cultura foi de aproximadamente 150 ng/mL para as duas linhagens (Figura 10).

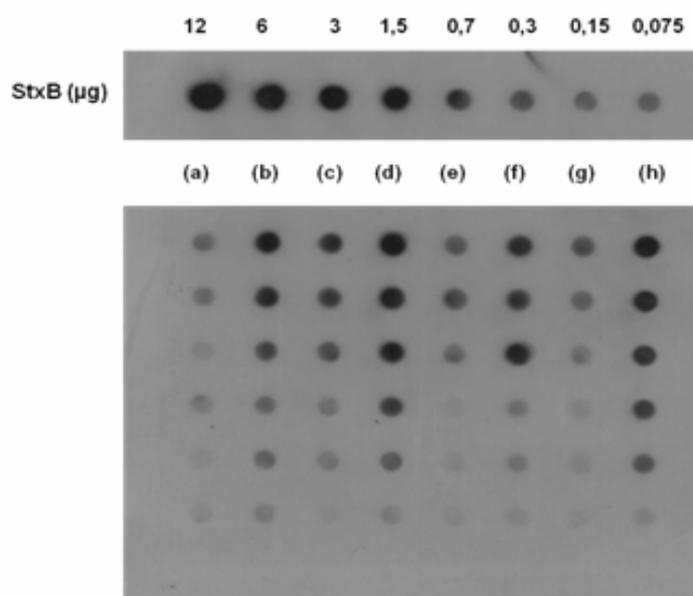


Figura 10. Expressão da proteína Stx2ΔAB pelas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* em ensaios de Dot Blot. Uma curva padrão foi realizada a partir da proteína Stx2B recombinante e purificada com valores de 12 até 0,075 µg (A). Em (B), (a), amostra de sobrenadante de cultivo obtido a partir da linhagem LDV326. (b), amostra de sobrenadante do cultivo da linhagem LDV327. (c), amostra de extrato total de bactérias da linhagem LDV326. (d), extrato total de bactérias da linhagem LDV327. (e), amostra de sobrenadante de cultivo obtido a partir da linhagem LDV328. (f), amostra de sobrenadante do cultivo da linhagem LDV329. (g), amostra de extrato total de bactérias da linhagem LDV328. (h), extrato total de bactérias da linhagem LDV329.

4.3 Análise da estabilidade *in vitro* e *in vivo* do plasmídeo pCVT2 nas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*

As linhagens recombinantes foram semeadas em meio líquido LB-Amp, a partir de estoques a -70°C , e incubadas por 18 horas a 37°C com agitação (200 rpm). Como mostram as figuras 11 e 12, existe uma maior estabilidade nas linhagens recombinantes que expressam a proteína Stx2AB em comparação com as linhagens usadas como controle, a partir do segundo dia de cultivo, mantendo-se por 4 dias, sugerindo que o plasmídeo pCVT2 apresenta maior estabilidade na linhagem LDV329 do que na linhagem LDV327. Pode-se ainda concluir que por um período de até 4 dias esse plasmídeo mantém 100% de estabilidade na linhagem LDV329. A linhagem LDV327 apresenta 50% de estabilidade plasmidial no mesmo período de tempo. A partir dos resultados encontrados é possível inferir que a menor estabilidade do plasmídeo apresentada pelas linhagens LDV326 e LDV328 seja resultante da ausência da expressão flagelar.

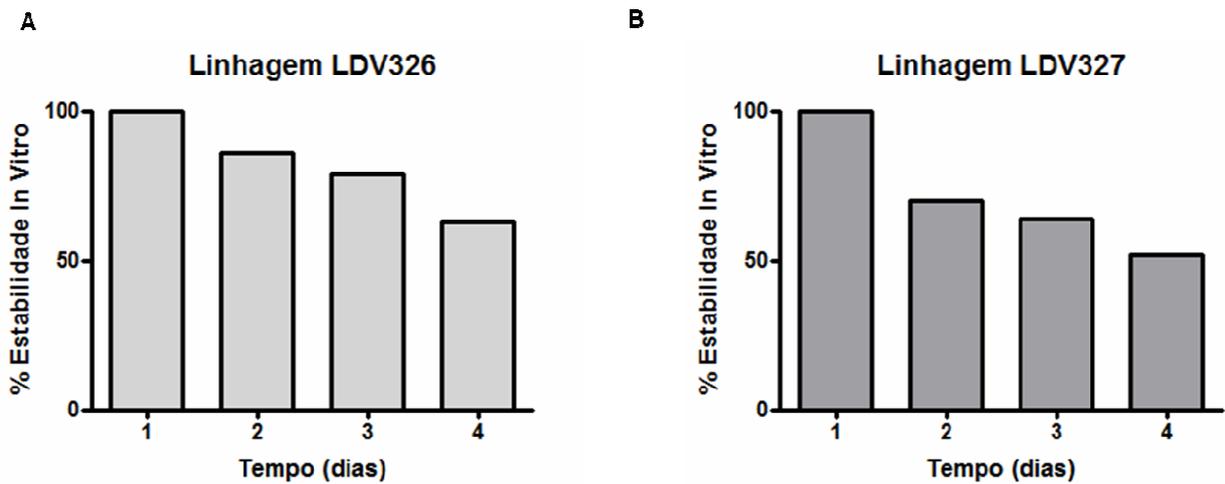


Figura 11. Análise da estabilidade *in vitro* das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* que não apresentam a expressão do flagelo: LDV326, linhagem controle albergando o vetor vazio. LDV327, linhagem experimental expressando a forma atóxica da Stx2.

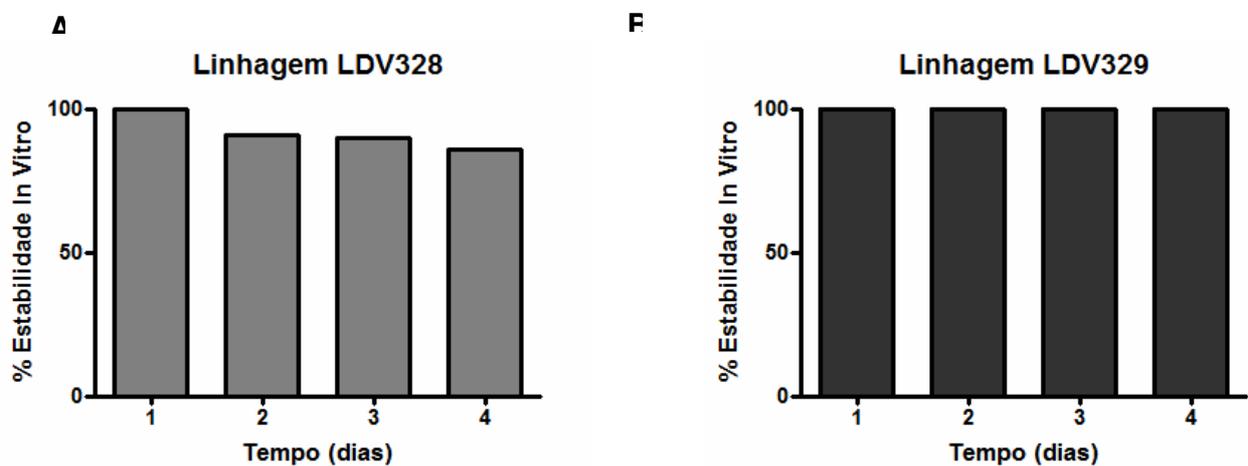


Figura 12. Análise da estabilidade *in vitro* das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* que apresentam a expressão do flagelo: LDV328, linhagem controle albergando o vetor vazio. LDV329, linhagem experimental expressando a forma atóxica da Stx2.

A avaliação da estabilidade *in vivo* foi realizada em camundongos BALB/c. Colônias bacterianas obtidas a partir de extratos de placas de Payer desses camundongos foram selecionadas para os ensaios de estabilidade *in vivo*. Observou-se uma diminuição na estabilidade plasmídeo da linhagem LDV329 (Figura 13 e 14), que apresentou estabilidade de 78% durante 72 horas de ensaio. Um valor semelhante, 62% de estabilidade, foi encontrado para a linhagem LDV327, o que demonstra uma elevada estabilidade do plasmídeo dessas linhagens em camundongos. Desta forma, pode se sugerir que as linhagens recombinantes que expressam a proteína Stx2 Δ AB possuem maior estabilidade do plasmídeo pCVT2 comparado as linhagens controle LDV326 e LDV328.

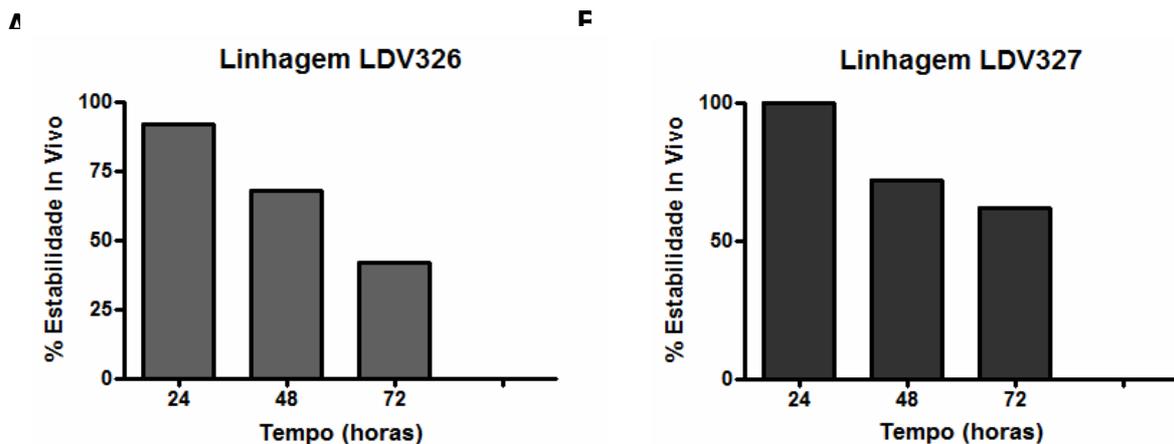


Figura 13. Análise da estabilidade *in vivo* das linhagens vacinais aflageladas de *S. Typhimurium*. As linhagens recombinantes foram transformadas com pGEMT e pGEMT-Stx2ΔAB (LDV326 e LDV327, respectivamente) e selecionadas por resistência à ampicilina em placas contendo LB. Os ensaios de colonização em Placas de Payer foram realizados até um período de 72 horas. As colônias de *S. Typhimurium* de 5 Placas de Payer/animal foram recuperados de camundongos e semeados em placas de Agar-LB para verificar a resistência à ampicilina após a administração oral de 10^{10} células das linhagens vacinais analisadas. Valores no eixo ordenada indicam a porcentagem de colônias Amp^r / número totais de colônias analisadas.

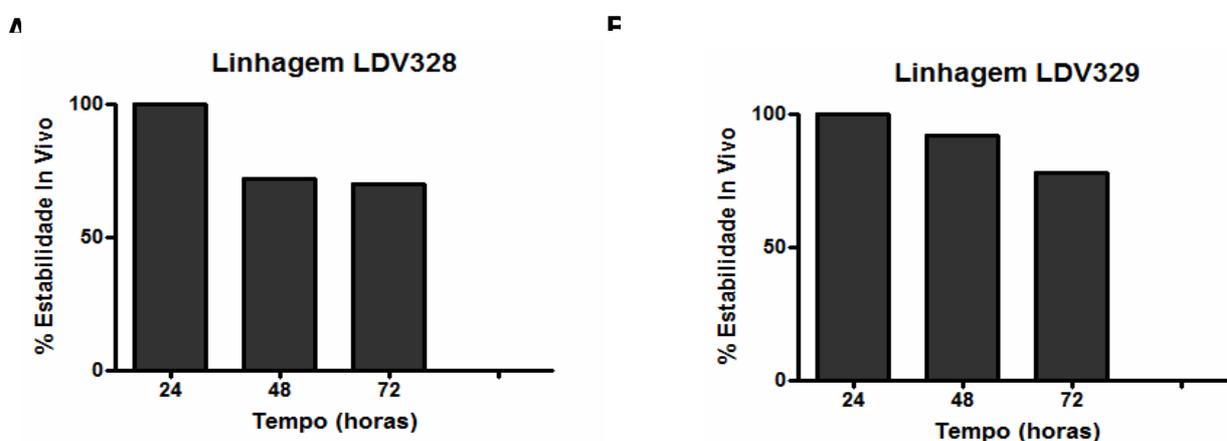


Figura 14. Análise da estabilidade *in vivo* das linhagens flageladas de *S. Typhimurium*. As linhagens foram selecionadas pela resistência à ampicilina em placas LB em ensaios de colonização em Placas de Payer por 72 horas. Colônias de *S. Typhimurium* isoladas de 5 Placas de Payer/animal foram recuperados de camundongos inoculados para a resistência à ampicilina após a administração oral de 10^{10} células das linhagens vacinais. Valores no eixo da ordenada indicam a porcentagem de colônias Amp^r / número totais de colônias analisadas.

4.4 Avaliação da capacidade de colonização e invasão das linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* após administração oral

A análise pelo número de colônias viáveis recuperadas nas placas de Payer e no baço de camundongos BALB/c após inoculação oral, confirmou a capacidade de colonização das linhagens recombinantes que expressam a proteína Stx2 Δ AB, linhagens LDV327 e LDV329. Surpreendentemente observamos um maior número de UFC das linhagens produtoras de Stx2 Δ AB nas placas de Payer num período de observação de 5 dias após a inoculação em comparação às linhagens controle que não expressam a proteína Stx2 Δ AB (Figura 15A). A cinética de colonização durante 5 dias mostra que as linhagens recombinantes que expressam a proteína Stx2 Δ AB aumentam significativamente a capacidade de colonizar Placas de Payer a partir das 48 horas após a inoculação. Esse padrão permanece até 72 horas (Figura 15B) e a partir do 5^o dia observa-se uma queda no número de colônias nas Placas de Payer. O número de colônias das linhagens controle LDV326 e LDV328 mostraram-se relativamente constante durante as 120 horas após a inoculação oral. Não foi possível encontrar colônias das linhagens recombinantes estudando o baço após a inoculação oral pelo período de tempo analisado.

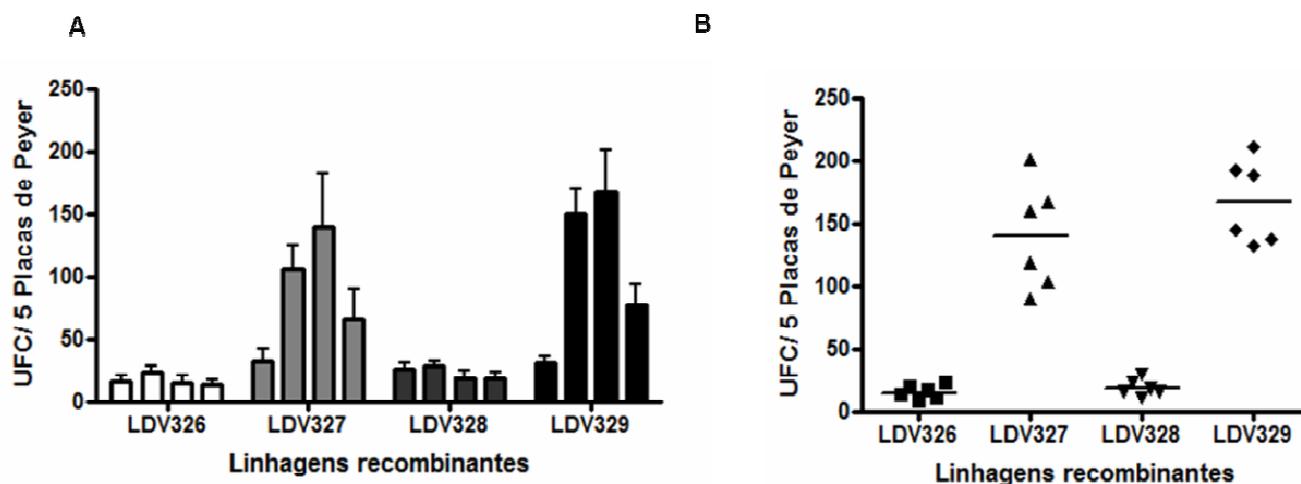


Figura 15. Ensaio de colonização em camundongos BALB/c pelas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* por via oral. A- Cinética de colonização durante 5 dias. As quatro barras de cada linhagem representam 24, 48, 72 e 120 horas de ensaio. **B,** colonização em Placas de Payer no 3º dia pelas linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*. Não houve diferenças estatisticamente significativas em relação aos camundongos imunizados com a *S. Typhimurium* LDV326 e a linhagem LDV 328.

4.5 Respostas imunológicas e efeitos neutralizantes dos anticorpos gerados em camundongos imunizados com linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*

A imunogenicidade de Stx2ΔAB expressa por linhagens vacinais *S. Typhimurium* foi determinada em camundongos após três administrações orais, nos dias 1, 22 e 36. Soros e amostras de fezes de camundongos imunizados foram analisadas para a presença de anticorpos anti-Stx2B, tanto no soro (IgG) e extratos de fezes (IgA), utilizando placas de ELISA incubados previamente com a proteína Stx2B recombinante e purificada (figuras 16, 17 e 18). Anticorpos contra a subunidade B da Stx2ΔAB foram detectados nos camundongos imunizados pela via oral nas três doses das linhagens

recombinantes de *S. Typhimurium* LDV327 e LDV329 expressando o antígeno Stx2 Δ AB recombinante. A média dos títulos anti-IgG para Stx2B em camundongos imunizados após as três doses da *S. Typhimurium* LDV327 ou estirpes LDV329 atingiu títulos de anticorpos de $931,15 \pm 274$ e $1.654,7 \pm 252$, respectivamente e a cinética de imunização mostrou um aumento gradativo nos níveis de produção de anticorpos após cada dose (figura 16). Respostas de anticorpos anti-IgA para a subunidade Stx2B em amostras fecais foram detectados apenas em camundongos imunizados com as linhagens de *S. Typhimurium* LDV327 e LDV329 (figura 18).

Para avaliar os efeitos neutralizantes dos anticorpos gerados nas imunizações com as linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* foram realizados ensaios de neutralização em condições *in vitro*, *ex vivo* e desafio (Tabela 3). Alíquotas da proteína nativa Stx2 promovendo efeitos citotóxicos nas células *Vero* ou causando 100% de letalidade em camundongos BALB/c foram incubadas com diferentes diluições de amostras de soro coletadas de camundongos vacinados, a fim de avaliar o título neutralizante dos anticorpos anti-Stx2. Os resultados na tabela 3 mostram que soros coletados de camundongos imunizados com as linhagens recombinantes LDV327 e LDV329 neutralizam 100% os efeitos citotóxicos frente a Stx2 nativa em ensaios *in vitro* com células *Vero*, com valores de diluições de 1/30 e 1/60, respectivamente. Além disso, a incubação dose letal de Stx2 com soro diluído coletados de camundongos imunizados com a linhagem LDV329 de *S. Typhimurium* tiveram um efeito protetor parcial sobrevivendo 3 camundongos de um total de 12 camundongos (25% de neutralização). Por outro lado, não houve proteção em camundongos inoculados com Stx2 letal exposta a amostras de soro de camundongos imunizados com a linhagem

LDV327 de *S. Typhimurium* em ensaios de neutralização *Ex vivo*. Da mesma forma, nenhuma atividade de neutralização de Stx2 foi detectada em amostras de soro coletadas de camundongos imunizados com as linhagens de *S. Typhimurium* LDV326 e LDV328 (Tabela 3).

A imunidade humoral protetora contra Stx2 em camundongos imunizados com as linhagens recombinantes *S. Typhimurium* foi determinada após desafio dos camundongos vacinados com dose letal de 15 dias após a última dose vacinal Stx2. Os dados obtidos mostram 25% dos camundongos imunizados com três doses da cepa LDV329 foram protegidos em um ensaio de desafio com Stx2 nativa, enquanto 12,5% dos animais imunizados com três doses da cepa LDV37 sobreviveram ao mesmo desafio letal (Tabela 3). Não houve proteção em animais imunizados com as linhagens de LDV326 e LDV328 de *S. Typhimurium*.

Com o intuito de identificar se os soros obtidos das imunizações podem detectar as duas subunidades da Stx2, avaliamos por Western Blot os soros frente a um extrato total de células de *E. coli* JM109 que contem a proteína Stx2 nativa. Os resultados na figura 19 mostram que os soros gerados podem identificar claramente a subunidade B em extratos celulares contendo proteína Stx2 nativa e apresenta alguns indicativos que os soros poderiam detectar elementos da subunidade A como é observado nos soros das imunizações com as linhagens recombinantes. O western blot sugere que soros obtidos de imunizações com a linhagem LDV329, eventualmente, apresentam uma maior capacidade de detecção de uma banda de aproximadamente 29-30 kDa comparado com a linhagem LDV327, dados muito semelhantes comparados aos

obtidos por Bentancor e colaboradores (2009) utilizando o mesmo fragmento imunogênico da forma atóxica da Stx2.

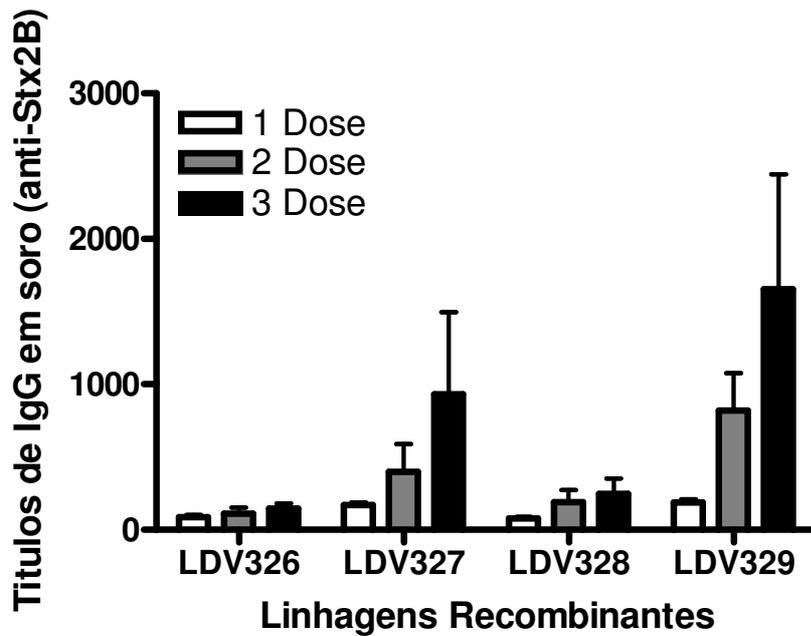


Figura 16. Cinética da resposta de anticorpos IgG detectada em soro dos camundongos imunizados com as diferentes linhagens de *S. Typhimurium*. Grupos de Imunização: barras abertas, camundongos imunizados com uma dose das vacinas; barras cinza, camundongos imunizados com duas doses das vacinas; barras pretas, camundongos imunizados com três doses das vacinas. Os títulos de anticorpos anti-stx2 B foram determinadas em ELISA utilizando uma proteína purificada da subunidade Stx2B recombinante.

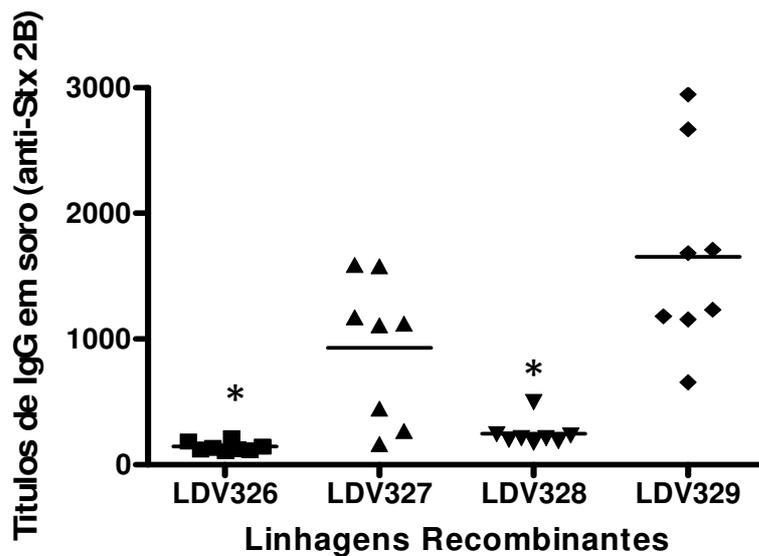


Figura 17. Títulos de anticorpos IgG sistêmicos nos soros individuais obtidos a partir de camundongos imunizados com três doses com as linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*. Os títulos de anticorpos anti-stx2 B foram determinadas mediante ELISA utilizando uma proteína purificada da subunidade Stx2B recombinante, a partir da 3 dose. * Mostra as diferenças que não são estatisticamente significativas em relação aos camundongos imunizados com as linhagens de *S. Typhimurium* LDV327 ou LDV329 ($p < 0,05$).

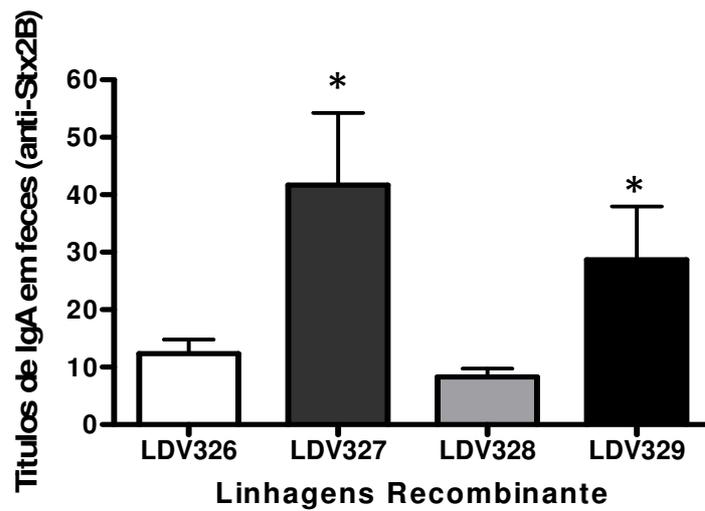


Figura 18. Resposta local de anticorpos anti-IgA detectados em amostras fecais obtidos a partir dos camundongos imunizados com três doses das vacinas. Os níveis de IgA foram medidos em pool de amostras coletadas a partir de animais do mesmo grupo de imunização. * Mostra a diferença estatisticamente significativa em relação aos ratos imunizados com a *S. Typhimurium* LDV326 ou LDV328 cepas ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Atividade neutralizante Anti-Stx2 dos soros obtidos na imunização com linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*.

Linhagens	Efeito de neutralização		
	Títulos anti-Stx2 <i>in vitro</i> ^a	<i>Ex vivo</i> ^b	<i>In vivo</i> ^c
LDV326	< 5 ^d	0/12	0/8 (0)
LDV327	30 (931.1± 274.2)	0/12	1/8 (12.5)
LDV328	< 5	0/12	0/8 (0)
LDV329	60 (1,654.7± 252.4)	3/12 (25)	2/8 (25)

^a Títulos de anticorpos neutralizantes anti-Stx2ΔAB de pools de soros foram coletados de camundongos imunizados com as diferentes linhagens de *S. Typhimurium* e analisadas em ensaios de neutralização com células Vero. Os títulos de neutralização Stx2 foram determinados como a diluição sérica máxima que abolia os efeitos citotóxicos de Stx2 usando células Vero. Em parênteses, representa-se os valores de média + SD dos soros com títulos de anticorpos IgG imunizados com diferentes linhagens recombinantes (n = 8).

^b Número de animais sobreviventes ao ensaio *Ex vivo* com a proteína Stx2 nativa previamente incubada com soro de camundongos imunizados com as diferentes linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*. Amostras com a toxina nativa de Stx2 foram incubadas com amostras de soro na diluição final 1:10, conforme descrito em material e métodos. Os camundongos sobreviventes foram acompanhados até 96 h após o desafio.

^c Numero de camundongos que sobreviveram ao desafio *in vivo* frente à toxina nativa Stx2. Cada grupo de camundongos foi imunizado com 3 doses das linhagens de *S. Typhimurium* utilizadas neste estudo.

^d Não houve atividade de neutralização a diluições mais baixa de 1:5

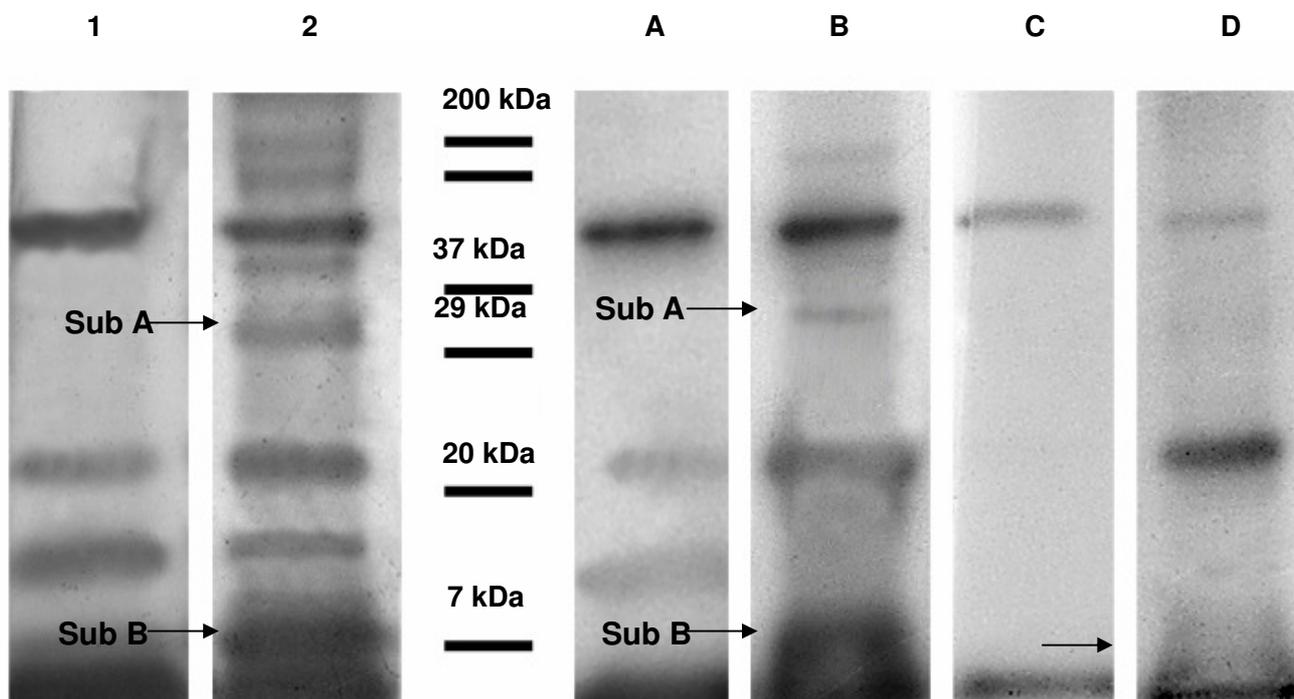


Figura 19. Análise e reconhecimento das subunidades A e B em soros obtidos da imunização com as linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*. 1, extrato de JM109 com plasmídeo vazio e revelado com soro controle anti-Stx2B. 2, extrato de JM109 com Stx2 inteira e revelado com soro controle antiStx-2B. A, extrato de JM109 com plasmídeo vazio e revelado com soro obtido da imunização com a linhagem LDV328. B, extrato de JM109 com Stx2 inteira em revelado com soro da imunização com a linhagem LDV329. C, extrato de JM109 com plasmídeo vazio revelado com soro da imunização com a linhagem LDV326. D, extrato de JM109 com plasmídeo Stx2 inteira e revelada com soro da imunização com a linhagem LDV327.

4.6 Determinação da concentração sérica de uréia e creatinina em animais submetidos ao ensaio de neutralização *in vivo*

A concentração de uréia sérica e creatinina, considerados marcadores fisiológicos de função renal, não se mostraram alterados nos animais submetidos ao ensaio de desafio (figuras 20 e 21) a partir das 72 horas de ensaio. Soros obtidos após

24 horas de ambos os ensaios de neutralização mostram valores normais de uréia e creatinina, porém esses valores aumentam após 72 horas de ensaio, o que sugere um comprometimento da função renal durante esse período e ausência de anticorpos neutralizantes nos soros avaliados. O soro de apenas dois animais imunizados com a linhagem LDV329 apresentou valores de uréia normais em ensaios de neutralização *in vivo*, e estes camundongos sobreviveram ao desafio com toxina nativa (figura 20). Podem-se observar valores normais de uréia sérica nas primeiras 24 horas de ensaio com aumento desses valores a partir da 72 horas de ensaio em animais imunizados com as linhagens avaliadas. A imunização com as linhagens LDV327 e LDV329 mostrou-se novamente promissora quando analisados os valores de uréia sérica após 72 horas de ensaio. Desse grupo experimental (n=6), os 2 camundongos sobreviventes após 96 horas de ensaio apresentaram valores de uréia sérica intermediários em comparação aqueles encontrados nos grupos controles que mostram altas concentrações séricas de uréia (figura 20).

Os valores de creatinina tiveram um comportamento similar aos valores de uréia, mostrando que o efeito neutralizante dos soros é parcial em condições de desafio com a proteína Stx2 nativa. Podem-se observar valores normais de creatinina sérica nas primeiras 24 horas de ensaio com aumento desses valores a partir da 72 horas de ensaio em animais imunizados com as linhagens avaliadas. A imunização com as linhagens LDV327 e LDV329 mostrou-se novamente promissora quando analisados os valores de creatinina sérica após 72 horas de ensaio. Desse grupo experimental (n=6), os 2 camundongos sobreviventes após 96 horas de ensaio

apresentaram valores de creatinina intermediários em comparação aqueles encontrados nos grupos controles (figura 21).

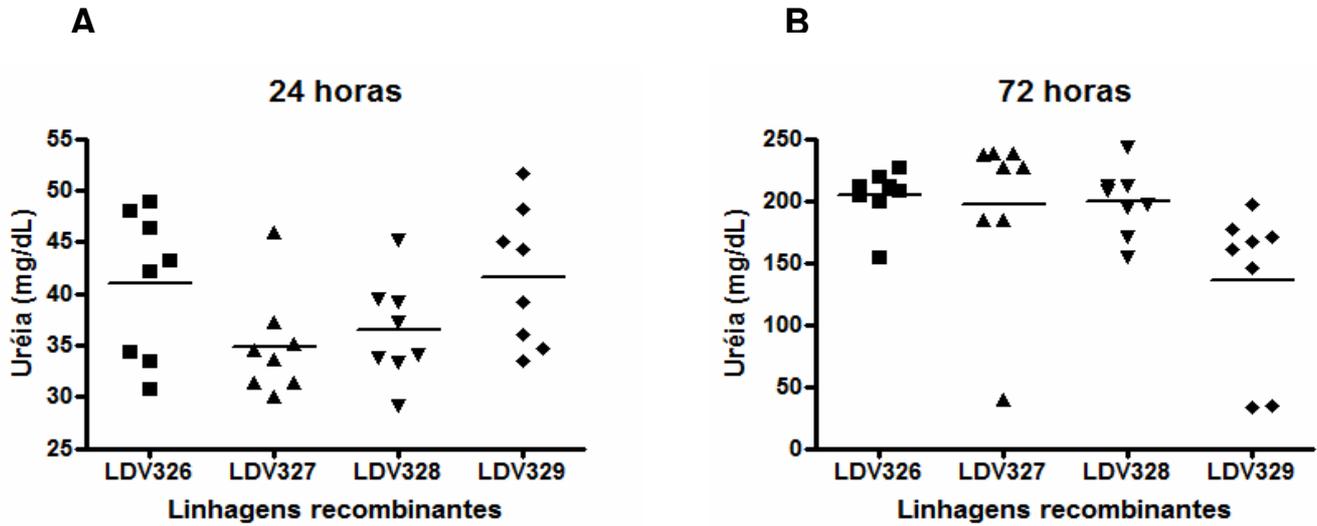


Figura 20. Níveis de nitrogênio uréico (uréia) em soro de camundongos imunizados com as linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* e desafiados com a toxina nativa de *Stx2*. As concentrações de uréia no soro dos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes LDV327 (n=1) e LDV329 (n=2) que sobreviveram após desafio foram 39,13 mg/dL e $36,05 \pm 1,07$ mg/dL respectivamente.

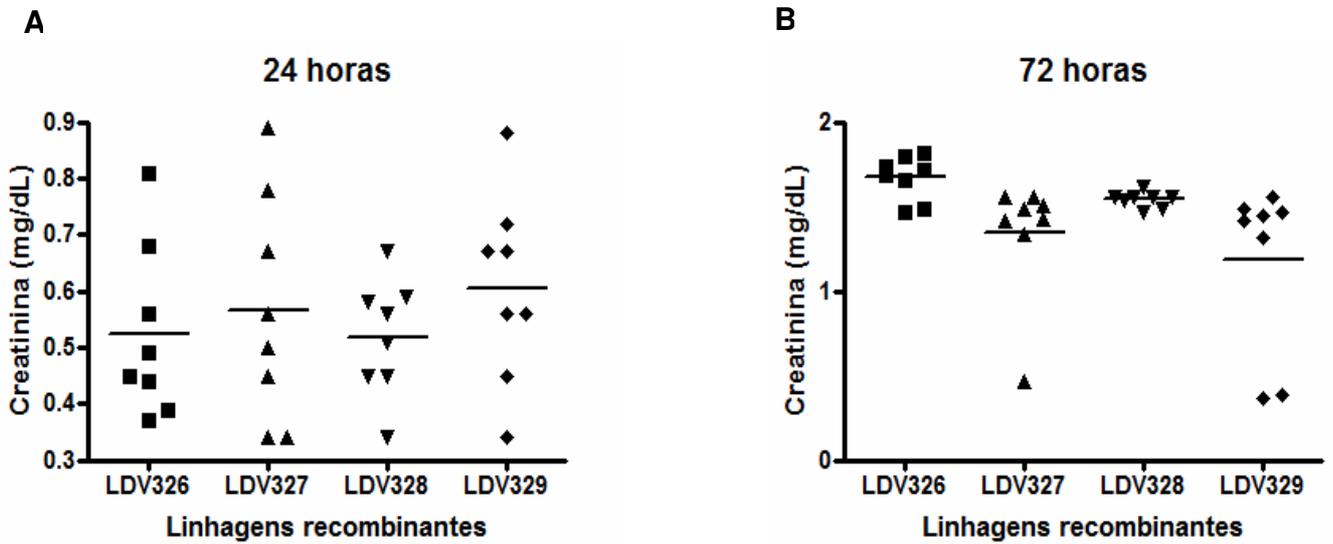


Figura 21. Níveis de creatinina em sangue de camundongos imunizados com as linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* e desafiados com a toxina nativa de Stx2. As concentrações de creatinina no soro dos camundongos imunizados com as linhagens recombinantes LDV327 (n=1) e LDV329 (n=2) que sobreviveram após desafio foram de 0,47 mg/dL e 0.37 ± 0.015 mg/dL respectivamente.

5 DISCUSSÃO

O uso de linhagens vacinais de *S. Typhimurium* tem sido intensamente investigado como um veículo seguro e eficaz de entrega de antígenos heterólogos, e um eficiente sistema de ativação de respostas do tipo humoral e celular contra diversos antígenos, após administração oral e colonização transitória da mucosa intestinal (GALEN, 2009; STOCKER, 2000). Além disso, esse modelo vacinal pode ter uma participação importante em modular o perfil de resposta imunológica (BUENO et al., 2009). No presente estudo, foram utilizadas duas cepas de *S. Typhimurium* que são atenuadas na via metabólica de aminoácidos aromáticos (*AroA*), sendo uma delas deficiente na expressão de flagelina. Essas linhagens foram geneticamente modificadas para expressar um derivado não tóxico de Stx2 (Stx2 Δ AB) e avaliadas quanto seu potencial imunogênico para o controle da SHU. Os resultados mostrados neste estudo são os primeiros a demonstrar com sucesso que um toxóide da Stx2 geneticamente modificado pode ser expresso e secretado ativamente por linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* e ser capaz pela via oral de induzir resposta de anticorpos do tipo IgG e IgA em modelo murino.

Surpreendentemente, observamos também que as linhagens de *S. Typhimurium* carregando a forma atóxica da proteína Stx2 apresentam um aumento na colonização intestinal, avaliado pelo número de colônias detectadas nestas linhagens em placas de Payer. Este aumento foi significativo tanto na linhagem de *S. Typhimurium* flagelada quanto na aflagelada que expressam a Stx2 Δ AB, sugerindo que a presença de flagelina não é relevante na capacidade invasiva da *S. Typhimurium*. Este interessante resultado esta em concordância com os trabalhos de Robinson e colaboradores (2006)

que demonstraram que a proteína nativa de Stx2 de linhagens de EHEC O157:H7 derivadas de humanos incrementa significativamente a adesão e colonização no intestino de camundongos. No modelo bovino, a expressão elevada da Stx2 em isolados de EHEC O157:H7 também possui um efeito modulador na colonização intestinal (LOWE et al., 2009). De fato foi reportado que linhagens de EHEC têm um marcado tropismo pelas placas de Payer e células epiteliais do íleo terminal do intestino (CHONG et al., 2007). A colonização do hospedeiro via intimina por linhagens de EHEC produtoras de Stx2 é maior em comparação às EHEC incapazes de expressar a toxina (SINCLAIR e O'BRIEN, 2002). Considerando-se que as linhagens de *S. Typhimurium* não expressam intimina, o aumento da colonização observado em nossos resultados sugere que a forma atóxica da proteína Stx2 poderia estar envolvida direta ou indiretamente nos mecanismos de adesão bacteriana. Os mecanismos pelo qual toxinas do tipo "Shiga" induzem colonização intestinal ainda não estão esclarecidos. Outras explicações podem ser atribuídas a capacidade da toxina de diretamente funcionar como uma molécula de adesão e incrementar os níveis de seu receptor Gb3 no hospedeiro ou de suprimir a resposta do hospedeiro, o que permitiria uma melhor colonização (ALLEN et al., 2006; OLIVIER et al., 2007; KRYSTLE, et al., 2010).

Flagelinas bacterianas mostram um forte efeito adjuvante quando são administradas por via de mucosa ou parenteral, seja na forma de proteína purificada e co-administrada ao antígeno alvo, ou como proteína híbrida geneticamente fusionada com o antígeno heterólogo de interesse (BARGIERI et al., 2008; BRAGA et al., 2009; HONKO et al., 2006; HULEATT et al., 2007; PINO et al., 2005). Nossos resultados

demonstraram que o uso vacinal das linhagens recombinantes derivadas de *S. Typhimurium* SL3261, proficiente na expressão de ambos os genes de flagelina (FliC e FliB), ou das linhagens de *S. Typhimurium* LDV321, que está bloqueada especificamente na expressão de ambas fases de flagelina (MASSIS et al., 2008), não diferem significativamente na capacidade de induzir respostas locais e sistêmicas contra Stx2, nem na indução de respostas neutralizantes e protetoras sob o desafio com a toxina Stx2 em camundongos vacinados. Desde que os efeitos da flagelina bacteriana como adjuvante exige despolimerização dos flagelos em monômeros (SMITH et al., 2003), é possível supor que durante o trânsito pelo trato gastrointestinal a quantidade de monômeros de flagelina liberada não tenha sido suficientemente elevada para promover uma forte resposta pro-inflamatória e, conseqüentemente, exercer efeitos adjuvantes para o antígeno heterólogo que essas linhagens recombinantes expressam. Curiosamente, tem sido demonstrado na literatura que flagelinas de EHEC promovem invasão em cultura de tecidos celulares (LUCK et al., 2005, 2006; ROGERS et al., 2006) e apresentam efeito sinérgico com a Stx2 aumentando respostas pró-inflamatórias (JANDHYALA et al., 2010), deixando aberto a possibilidade de que vias de ativação pró-inflamatórias dependentes de flagelina em conjunto com Stx2 possam promover o começo da SHU durante a infecção. Outra possível explicação para a ausência de atividade adjuvante da flagelina nessa proposta vacinal é que a expressão da proteína Stx2 Δ AB poderia depender de diversos fatores intrínsecos do intestino do hospedeiro como a microbiota intestinal. Nossas observações e os resultados apresentados por outros grupos de pesquisa indicam que a administração oral de cepas vacinais de salmonelas flageladas, em contraste com

administração parenteral, não ativa respostas de anticorpos contra flagelina e alguns antígenos heterólogos geneticamente fusionados ou não (MASSIS et al., 2008; SANDERS et al., 2006; SBROGIO-ALMEIDA et al., 2004). Tal comportamento imunológico é coerente com a evolução de um ambiente de supressão imunológica no trato gastrointestinal que, em condições saudáveis não permite a ativação de uma forte resposta inflamatória contra a flagelina, uma proteína altamente conservada entre várias espécies encontradas em enterobactérias (MIZEL et al., 2002; SANDERS et al., 2006; WINTER et al., 2009; YOSHIOKA et al., 2008).

As linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* induziram uma resposta de anticorpos específicos para a proteína Stx2 com atividade neutralizante parcial. A administração oral das linhagens recombinantes aflagelada LDV327 e flagelada LDV329 resultou na produção de respostas de anticorpos anti-Stx2 Δ AB sistêmicos e secretados em todos os camundongos testados. Camundongos imunizados com a linhagem LDV327 apresentaram menores títulos de anticorpos, mas não foram estatisticamente diferentes quando comparados aos títulos obtidos com a linhagem LDV329. Em ambos os grupos os títulos detectados de anti-Stx2 Δ AB não atingem valores acima de 2.000, o que pode refletir a baixa imunogenicidade intrínseca que apresenta a Stx2 nativa, particularmente a subunidade B, em diferentes hospedeiros mamíferos (BIELASZEWSKA et al., 1997; BYUN et al., 2001; MARCATO et al., 2001-2005). Os soros obtidos dos camundongos imunizados com as linhagens LDV327 e LDV329 inibiram a toxicidade da toxina nativa em ensaios de avaliação da neutralização com células *Vero*. No entanto, na abordagem *In vivo* os soros dos camundongos imunizados com a linhagem flagelada LDV329 levaram a uma proteção

parcial de 25%, e o soro dos animais imunizados com a linhagem não flagelada LDV327 apenas protegeu 12,5% dos camundongos desafiados. As diferenças observadas nas condições *in vitro*, *ex vivo* e desafio podem ser explicadas pela melhor capacidade dos ensaios em células *Vero* de avaliar o poder neutralizante de anticorpos Stx2-específicos, posto que os modelos de desafio *in vivo* para estudo de proteção contra a toxina Stx2 ainda não são adequados. Um modelo animal ideal para avaliação de medidas profiláticas contra Stx2 seria reproduzir as condições naturais observadas durante a infecção bacteriana, onde as respostas locais de S-IgA anti-Stx2 são fundamentais para reduzir a quantidade de toxinas livre que atingem a corrente sanguínea. Diferentes tentativas anteriores usando o mesmo antígeno alvo codificado por uma vacina de DNA também resultou em respostas com títulos baixos de anticorpos específicos para anti-Stx2 nos camundongos vacinados (BENTANCOR et al., 2009). Estes autores sugerem que importantes epítomos imunogênicos para a proteção contra a Stx2 estão presentes nas subunidades A e B da Stx2, e anticorpos contra estes peptídeos sinergicamente podem ter propriedades neutralizantes contra a toxina Stx2 nativa. No entanto, outros trabalhos na literatura mostram que toxóides derivados da proteína Stx2 podem conservar a imunogenicidade em camundongos (SMITH et al., 2006; GOMES, et al, 2009).

Embora se admita que a quantidade de Stx2 produzida pelas linhagens de *E. coli* O157:H7 no intestino seja fundamental para o desenvolvimento da doença, diversos fatores representados pela microbiota intestinal do hospedeiro poderiam ter um papel importante na modulação da síntese Stx2 e, portanto, na patogênese

desencadeada pela EHEC. A presença da flora intestinal reduz a colonização de linhagens de *E. coli* O157:H7 e produção da proteína Stx2 no intestino de camundongos (GAMAGE et al., 2006). Recentemente foi demonstrado que fatores produzidos pela microbiota intestinal normal podem modular a síntese e a expressão da proteína Stx2 de linhagens de *E. coli* O157:H7 (DE SABLET et al., 2009). Isto pode trazer diferentes e graves consequências nas estratégias vacinais utilizando vetores biológicos frente a toxinas intestinais e o tipo de resposta imunológica induzido. Alterações na microbiota intestinal resultam em alterações nas células imunes do intestino que ativam respostas imunológicas aumentando a dúvida se o sistema imune humano, que foi desenhado para controlar microorganismos, é de fato controlado pela microbiota intestinal (ROUND e MAZMANIAN, 2009). É tentador especular que as pessoas com alguma perturbação em sua microbiota poderiam apresentar uma maior susceptibilidade a infecção por EHEC e teriam maior risco para o desenvolvimento da SHU. Isso pode ser especialmente interessante para investigar e correlacionar à composição da microbiota humana dos indivíduos afetados por infecção por EHEC com novas estratégias de vacinação em busca de respostas imunes com capacidade neutralizante da toxina Stx2. A informação da importância da microbiota intestinal em modular as respostas imunológicas deve ser bem considerada nas futuras estratégias de vacinação utilizando vetores biológicos, especialmente no uso de *S. Typhimurium* como candidato vacinal.

Nossos resultados demonstram que a expressão de toxóides da proteína Stx2 em cepas recombinantes de *S. Typhimurium* pode representar uma alternativa para aumentar a imunogenicidade e geração de anticorpos neutralizantes da Stx2 em

estratégias vacinais contra SHU. No entanto, maiores estudos são necessários para melhorar o potencial neutralizante de soros gerados por estratégias vacinais utilizando vetores biológicos vivos. Além disso, seria interessante observar se anticorpos anti-Stx2 gerados através de veículos vacinais, como *S. Typhimurium*, poderiam reduzir a colonização intestinal como recentemente foi observado em EHEC O157:H7 (KRYSTLE et al., 2010), demonstrando duplo potencial desses anticorpos: propriedade neutralizante contra a toxina e inibição da colonização bacteriana.

6 CONCLUSÕES

.- As linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* expressam formas atóxicas de Stx2, codificadas pelo vetor pGEMT-Stx2 e secretam para o ambiente externo;

.- As linhagens recombinantes de *S. Typhimurium*, que expressam a forma atóxica de Stx2, exibiram maior capacidade de colonização nas placas de Payer que as linhagens que não expressam esta forma atóxica;

.- As Linhagens vacinais recombinantes de *S. Typhimurium* são imunogênicas, e induzem resposta imune humoral local (IgA) e sistêmica (IgG) contra a Stx2, em modelo murino;

.- Os soros gerados após as imunizações, por via oral, com as linhagens recombinantes de *S. Typhimurium* apresentaram capacidade neutralizante parcial em ensaios de desafio com toxina nativa em modelo murino;

.- Os marcadores séricos de SHU, uréia e creatinina, se mantiveram dentro de parâmetros normais nos camundongos que sobreviveram ao desafio com a toxina Stx.

7 PERSPECTIVAS

Em nossos resultados observamos um aumento da colonização intestinal pelas linhagens de *S. Typhimurium* capazes de expressar a forma atóxica da Stx2. Essa constatação nos permite propor interessantes modelos biológicos para os seguintes estudos:

a) Interações entre essa toxina e as células imunológicas, como células dendríticas e macrófagos, nas placas de Payer;

b) Mecanismos envolvidos na adesão e na invasão mediados pela toxina na colonização de órgãos imunes no intestino;

c) Interações entre a microbiota intestinal e o patógeno e seu impacto na modulação imune;

d) A influência da expressão dessa toxina no intestino de animais gnotobióticos (criados em biotérios e livres de microrganismos) nos processos de resposta imune e colonização intestinal, além de avaliar as interações com a microbiota residente.

REFERÊNCIAS*

ACHESON, D. W. K.; LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; KEUSCH, G. T. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. **Infect. Immun.**, v. 63, p.301-308, 1995.

ACHESON, D. W.; LEVINE, M. M.; KAPER, J. B.; KEUSCH, G. T. Protective immunity to Shiga-like toxin I following oral immunization with Shiga-like toxin I B subunit-producing *Vibrio cholera* CVD 103-HgR. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 355–357, 1996.

ALLEN, K. P.; RANDOLPH, M.M.; FLECKENSTEIN, J.M. Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.**, v. 72, 869 – 875, 2006.

BABIUK, S.; ASPER, D. J.; ROGAN, D.; MUTWIRI, G. K. and POTTER, A. A. Subcutaneous and intranasal immunization with type III secreted proteins can prevent colonization and shedding of *Escherichia coli* in mice. **Microb. Pathog.**, v. 45, p. 7–11, 2008.

BACKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A., GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v. 5717, p. 1915-20, 2005.

BARGIERI, D. Y.; ROSA, D. S.; BRAGA, C. J. M.; CARVALHO, B. O.; COSTA, F. T.; SPINDOLA, N. M.; VAZ, A. J.; SOARES, I. S.; FERREIRA, L. C. S. and RODRIGUES, M. M.. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella* Typhimurium FliC flagellin. **Vaccine**, v. 26, p. 6132-6142, 2008.

BARMAN, M.; UNOLD, D.; SHIFLEY, K.; AMIR, E.; HUNG, K.; BOS, N.; SALZMAN, N. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 907-15, 2008.

BARRETT, B. T.; COOKSON, L. V.; ADEREM, A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 1247-1253, 2002.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:**

Informação e documentação: referencias: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BAST, D. J.; BANERJEE, L.; CLARK, C.; READ, R.J; BRUNTON, J.L. 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.

BENTANCOR, L. V.; BILEN, M.; FERNANDEZ BRANDO, R. J.; RAMOS, M. V.; FERREIRA, L. C. S.; GHIRINGHELLI, P. D.; PALERMO, M. S. DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Shiga-like toxin 2 (Stx2) A2 and B subunits confers protective immunity to Stx challenge in the murine model. **Clin. Vaccine. Immunol.**, v. 16, p. 712- 718, 2009.

BIELASZEWSKA, M.; CLARKE, I.; KARMALI, M.A.; PETRIC, M. 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.; GARIEPY, 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.

BRAGA, C. J. M.; RITTNER, M. G.; HENAO, J. E. M.; TEIXEIRA, A. F.; MASSIS, L. M.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; TABORDA, C. P.; TRAVASSOS, L. R.; FERREIRA, L. C. S. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagellin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1700-1707, 2009.

BRANDTZAEG, P. Role of secretory antibodies in the defense against infections. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 293, p. 3-15, 2003.

BRANDTZAEG, P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. **Vaccine**, v. 30, p. 5467-84, 2007.

BREY, R. N.; BIXLER, G. S.; FULGINITI, J. P.; DILTS, D. A., SABARA, M. I. Oral delivery of antigens in live bacterial vectors. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 303, p. 169-184, 1991.

BUENO, S. M.; GONZALEZ, P. A.; KARLEGUIS, A. M. Use of genetically modified bacteria to modulate adaptive immunity. **Curr. Gene Ther.**, v.3, 171-84, 2009.

BUTTERTON, J. R.; RYAN, E.T.; ACHESON, D.W.; CALDERWOOD, S.B. Co-expression 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.; OHMURA, M.; FUJIHASHI, K.; YAMAMOTO, S.; MCGHEE, J.R.; UDAKA, S.; KIYONO, H.; TAKEDA, Y.; KOHSAKA, T.; YUJI, Y. 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, S.B.; ACHESON, D.W.; GOLDBERG, M.B.; BOYKO, S.A.; DONOHUE-ROLFE, A. 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.

CAPPOZO, A.; PISTONE, E.; CREYDT, V.; DRAN, G.; FERNANDEZ, G.; GOMEZ, S.; BENTANCOR, L.V.; RUBEL, C.; IBARRA, C.; ISTURIZ, M.; PALERMO, M.S. Development of DNA vaccines against Hemolytic Uremic Syndrome in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3971-3978, 2003.

CHATFIELD, S. N.; CHARLE, I. G.; MAKOFF, A. J.; OXER, M. D.; DOUGAN, G.; PICKARD, D.; SLATER, D.; FAIRWEATHER, N. F. Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. **Biotechnology (NY)**, v. 10, p. 888-892, 1992.

CHONG, Y.; FITZHENRY, R.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D. Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157: H7--initial colonization of terminal ileum and Peyer's patches and minimal colonic adhesion *ex vivo*. **Microbiology**, v. 3, p. 794-802, 2007.

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

DE SABLET, T.; CHASSARD, C.; BERNALIER-DONADILLE, A.; VAREILLE, M.; GOBERT, A. P.; MARTIN, C. Human microbiota-secreted factors inhibit shiga toxin synthesis by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 2, p. 783-90, 2009.

DE VOS, T.; DICK, T. A. A rapid method to determine the isotype and specificity of coproantibodies in mice infected with *Trichinella* or fed cholera toxin. **J. Immunol. Methods.**, v.141, p. 285 – 288, 1991.

DOUGAN, G.; HORMAECHE, C. E.; MASKELL, D. J. Live oral *Salmonella* vaccines: potential use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system. **Parasite Immunol.**, v. 9, p. 151-160, 1987.

DUERKOP, B. A.; VAISHNAVA, S.; HOOPER, L. V. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. **Immunity**, v. 3, p. 368-76, 2009.

DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; STRUGNELL, R. A. Comparison of the abilities of different attenuated *Salmonella Typhimurium* strains to elicit humoral immune responses against a heterologous antigen. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 732-740, 1998.

DUNSTAN, S. J.; SIMMONS, C. P.; STRUNGELL, R. A. Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enteric* var. Typhimurium. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5133-5141, 1999.

FRASER, M.E.; FUJINAGA, M.; CHERNEY, M.M.; MELTON-CELSA, A.R.; TWIDDY, E.M.; O'BRIEN, A.D.; JAMES, M.N. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. **J. Biol.Chem.**, v. 279, p. 27511-27517, 2004.

FRIEDRICH, A. W.; BILEASZEWSKA, M.; ZHANG, W.L.; PULZ, M.; KUCZIUS, T.; AMMON, A.; KARCH, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 74-84, 2002.

GALEN, J. E.; LEVINE, M. M. Can' a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 372-376, 2001.

GALEN, J. E.; PASETTI, M. F.; TENNANT, S.; RUIZ-OLIVERA, P.; SZTEIN, M. B.; LEVINE, M. M. *Salmonella enterica serovar Thyphi* live vectors vaccines finally come of age. **Immunol. Cell Biol.**, v. 87, p. 400-412, 2009.

GAMAGE, S. D.; PATTON, A. K.; STRASSER, J. E.; CHALK, C. L.; WEISS, A. A. Commensal bacteria influence *Escherichia coli* O157:H7 persistence and Shiga toxin production in the mouse intestine. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 1977-83, 2006.

GARRETT, W. S.; GORDON, J. I.; GLIMCHER, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. **Cell**, v. 140, p. 859-870, 2010.

GARMORY, H. S.; BROWN, K. A.; TITBALL, R. W. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 339-353, 2002.

GOMES, P.A.; BENTANCOR, L. V.; PACCEZ, J. D.; SBROGIO – ALMEIDA, M. E.; PALERMO, M.S.; FERREIRA, R.C.; FERREIRA, L.C.S. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing StxB2 subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, 333 – 338, 2009.

GORDON, J. L. A genomic view of our symbiosis with members of the gut microbiota. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 40, Suppl. 1:S28, 2005.

HARARI, I.; DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G.; ARNON, R. Synthetic peptides of Shiga toxin B subunit induce antibodies which neutralize its biological activity. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1618-1624, 1988.

HARARRI, I.; ARNON, R. Carboxy-terminal peptides from the B subunit of Shiga toxin induce a local and parenteral protective effect. **Mol. Immunol.**, v. 27, p. 613–621, 1990.

HEYDERMAN, R. S.; SORIANI, M.; HIRST, T. R. Is immune cell activation the missing link in the pathogenesis of post-diarrhoeal HUS?. **Trends Microbiol.**, v. 6, p. 262-6, 2001.

HOHMANN, E. L.; OLETTA, H. A.; MILLE, S. A. Evaluation of a *phoP/phoQ*-deleted, *aroA*-deleted live oral *Salmonella Typhi* vaccine strain in human volunteers. **Vaccine**. v. 14, p.19-24, 1996.

HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature**, v. 291,p. 238-239, 1981

HONKO, A. N.; SRIRANGANATHAN, N.; LEES, C. J.; MIZEL, S. B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 1113-1120, 2006

HOOPER, L. V; Macpherson, A.J. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 3, p. 159-69, 2010.

HULEATT, J. W.; JACOBS, A. R.; TANG, J.; DESAI, P.; KOPP, E. B.; HUANG, Y.; SONG, L.; NAKAAR, T. J. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. **Vaccine**, v. 25, p. 763-765, 2007.

IKEDA, J.; SCHMITT, C.; DARNELL, S.; WATSON, P.; BISPHAM, J.; WALLIS, T. Flagellar phase variation of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium contributes to virulence in the murine typhoid infection model but does not influence *Salmonella*-induced enteropathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3021 – 3030, 2001.

IMAI, Y.; NAGAI, R.; ONO, Y.; ISHIKAWA, T.; NAKAGAMI, H.; TANIKAWA, T.; KUROHANE, K. 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.; KATO, M.A.; VAZ, T.M.; RAMOS, II; SOUZA, M.A.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; GUTH, B.E. 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.

ISHIKAWA, S.; KAWAHARA, K.; KAGAMI, Y.; ISSHIKI, Y.; KANEKO, A.; MATSUI, H.; OKADA, N.; DANBARA, H. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3235-3239, 2003.

JANDHYALA, D. M ; ROGERS, T. J ; KANE, A. ; PATON, A. W. ; PATON, J. C. ; THORPE, C. M. Shiga toxin 2 and flagellin from Shiga toxigenic *Escherichia coli* super-induce IL-8 through synergistic effects on host SAPKinase activation. **Infect. Immun.**, v. 78, p. 2984-94, 2010.

KANG, H. Y.; CURTISS, R. III. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccines following oral immunization. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 37, p. 99-104, 2003.

KAUFFMANN, S. H.; FENSTERLE, J.; HESS, J. The need for a novel generation of vaccines. **Immunobiology**, v. 201, p. 272-282, 1999.

KARMALI, M. A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S.; LIOR, H. 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. Sporadic cases of Hemolytic Uremic Syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, p. 619-620, 1983.

KARMALI, M.A. ; PETRIC, M. ; LOUIE, S.; CHEUNG, R. Antigenic heterogeneity of *Escherichia coli* verotoxins. **Lancet**, p. 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. 355-359, 2004.

KITOV, P. I.; SADOSKKA, J.M.; MULVEY, G.; AMSTRONH, G.D.; LING, H.; PANNU, N.S.; READ, R.J.; BUNDLE, D.R. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. **Nature**, v. 403, p. 669-672, 2000.

KONADU, E.; DONOHUE-ROLFE, A.; CALDERWOOD, S. B.; POZSGAY, V.; SHILOACH, J.; ROBBINS, J. B.; SZU, S. C. Syntheses and immunologic properties of *Escherichia coli* O157 O-specific polysaccharide and Shiga toxin 1 B subunit conjugates in mice. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 6191–6193, 1999.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J. I.; STRAVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 18, p. 775-9, 1997.

KRAUTZ-PETERSON, G.; CHAPMAN-BONOFIOLIO, S.; BOISVERT, K. et al. Intracellular neutralization of Shiga toxin 2 by a subunit-specific human monoclonal antibody. **Infect. Immun.**, v. 8, p. 1931-1939, 2008.

KRYSTLE, L.M.; MELTON, A. R.; ROBINSON, C. M.; O'BRIEN, A.D. Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing *Escherichia coli* O157:H7. **Vaccine**, v. 28, p. 4777 – 4785, 2010.

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

LASARO, M. O.; LUIZ, W.B.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; NISHIMURA, I.; Guth, B.E.; FERREIRA, L. C. Combined vaccine regimen based on parenteral priming with a DNA vaccine and administration of an oral booster consisting of a recombinant *Salmonella enterica serovar* Typhimurium vaccine strain for immunization against infection with human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Infect Immun.**, v.2, p. 6480-91, 2004.

LLOP, P.; CARUSO, P.; CUBERO, J.; MORENTE, C.; LOPEZ, M.M. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. **J. Microbiol. Methods.**, v. 37, p. 23-31, 1999.

LOWE, R. M.; BAINES, D.; SELINGER, L. B.; THOMAS, J. E.; McALLISTER, T. A., SHARMA, R. *Escherichia coli* O157:H7 strain origin, lineage, and Shiga toxin 2 expression affect colonization of cattle. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 15, p. 5074-81, 2009.

LOUSIE, C. B.; ORIG, 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.

LOUSIE, 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.

LUCK, S. N.; BADEA, L.; BENNETT-WOOD, V.; ROBINS-BROWNE, R.; HARTLAND, E. L. Contribution of FliC to epithelial cell invasion by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O113:H21. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 6999- 7004, 2006.

MACPHERSON, A. J.; HARRIS, N. L. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 4, p. 478–485, 2004.

MARCATO, P.; MULVEY, G.; READ, R. J.; VANDER HELM, K.; NATION, P. N.; ARMSTRONG, G.D. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2B subunit. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 435-443, 2001.

MARCATO, P.; GRIENER, T. P.; MULVEY, G. L.; ARMSTRONG, G. D. Recombinant shiga toxin B-subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from shigatoxemia. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 6523-6529, 2005.

McSORLEY, S. J.; ASCH, S.; COSTALONG, M.; REINHARDT, R. L.; JENKINS, M. K. Tracking *Salmonella*-specific CD4 T Cells in vivo reveals a local mucosal response to a disseminated **Infect. Immun.**, v. 16, p. 365-377, 2002.

MALIK, B.; GOYAL, A. K.; MANGAL, S.; ZAKIR F.; VYA, S. P. Implication of gut immunology in the design of oral vaccines. **Curr. Mol. Med.**, v. 10, p. 47-70, 2010.

MARCATO, P.; MULVEY, G.; READ, R. J.; VANDER HELM, K.; NATION, P.N.; ARMSTRONG, G. D. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 435-443, 2001.

MARCATO, P.; GRIENER, T. P.; MULVEY, G.L.; ARMSTRONG, G. D. Recombinant Shiga toxin B subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from shigatoxemia. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 6523-6529, 2005.

MASSIS, L. M.; BRAGA, M. C. J.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; LAUAND, L., NEWTON, S. M.; KLEBBA, P. E.; FERREIRA, L. C. S. Anti-flagellin antibody responses elicited in mice orally immunized with attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* vaccine strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 606-610, 2008.

MIZEL, S. B.; SNIPES, J. A. Gram-negative flagellin-induced self-tolerance is associated with a block in interleukin-1 receptor-associated kinase release from toll-like receptor 5. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 22414-22420, 2002.

MITTRUCKER, H. W.; RAUPACH, B.; KOLHER, A.; KAUFMANN, S. H. E.. Cutting edge: Role of B lymphocytes in protective immunity against *Salmonella* Typhimurium infection. **J. Immunol.**, v. 164, p. 1648-1652, 2000.

MOHAWK, K. L.; MELTON-CELSA, A. R.; ROBINSON, C. M.; O'BRIEN, A. D. Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing *Escherichia coli* O157:H7. **Vaccine**, v. 30, p. 4777-85, 2010.

MUHLDORFER, I.; HACKER, J.; KEUSCH, G. T.; ACHESON, D. W.; TSCHAPE, H.; KANE, A. V.; RITTER, A.; OLSCHAGER, T.; DONOHUE-ROLFE, A. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 495-502, 1996.

MUKHERJEE, J.; CHIOS, K.; FIHSWILD, D.; HUDSON, D.; O'DONNELL, S.; RICH, S. M.; DONOHUE-ROLF, A.; TZIPORI, S. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* OP157:H7 infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 612-619, 2002.

MULVEY, G. L.; MARCATO, P.; KITOV, P. I.; SADOSWKA, J.; BUNDLE, D. R.; ARMSTRONG, G. D. 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.

NISHIKAWA, K.; MATSUOKA, K.; WATANABE, M. Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. **J. Infect. Dis.**, v. 191, p. 2097-2105, 2005.

NISHIKAWA, K.; WATANABE, M.; KITA, E.; IGAI, K.; OMATA, K.; YAFFE, M.B.; NATORI, Y. A multivalent peptide library approach identifies a novel Shiga toxin inhibitor that induces aberrant cellular transport of the toxin. **FASEB J.**, v. 20, p. 297-2599, 2006.

OLIVIER, V.; SALZMAN, N.H.; SATCHELL, K.J. Prolonged colonization of mice by *Vibrio cholera* El Tor O1 depends on accessory toxins. **Infect. Immun.**, v. 75, 5043 – 5051, 2007.

ORTH, D.; KHAN, A. B.; NAIM, A.; GRIF, K.; BROCKMEYER, J.; KARCH, H.; JOANNIDIS, M.; CLARK, S. J.; DAY, A. J.; FIDANZI, S.; STOIBER, H.; DIERICH, M. P.; ZIMMERHACKL, L. B.; WURZNER, R. Shiga toxin activates complement and binds factor H: evidence for an active role of complement in hemolytic uremic syndrome. **J. Immunol.**, v. 182, p. 6394-400, 2009.

PALERMO, M. S.; EXENI, R. A.; FERNANDEZ, G. C. Hemolytic uremic Syndrome: pathogenesis and update of interventions. **Expert reviews**, v. 6, p. 697-707, 2009.

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

PATON, A. W.; MORONA, R.; PATON, J. C. Neutralization of Shiga toxins Stx1, Stx2c and Stx2e by recombinant bacteria expressing mimics of globotriose and globotetraose. **Infect. Immun.**, v. 3, p. 1967-1970, 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.

PERNA, N. T.; PLUNKETT, G 3rd.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J. D.; ROSE, D. J.; MAYHEW, G. F.; EVANS, P. S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H. A.; POSFAI, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTBECK, E. J.; DAVIS, N. W.; LIM, A.; DIMALANTA, E. T.; POTAMOUSIS, K. D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T. S.; LIN, J.; YEN, G.; SSHWARTZ, D. C; WELCH, R. A.; BLATTNER, F. R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v. 409, p. 529-533, 2001.

PINO, O. ; MARTIN, M ; MICHALEX, S. A. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica serovar* Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 6763–6770, 2005.

POTTER, A. A.; KLASHINSKY, S.; LI, Y.; FREY, E.; TOWNSEND, H.; ROGAN, D; ERICKSON, G.; HINKLEY, S.; KLOPFENSTEIN, T.; MOXLEY, R. A.; SMITH, D. R.; FINLAY, B. B. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. **Vaccine**, v. 22, p. 362-369, 2004.

ROBINSON, C.M.; SINCLAIR, J.F.; SMITH, M.J.; O'BRIEN, A.D. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.103, 9667 – 9672, 2006.

ROGERS, T. J.; PATON, J. C.; WANG, H.; TALBOT, U. M.; PATON, A. W. Reduced virulence of an *fliC* mutant of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21. **Infect. Immun.**, v. 74, p. 1962-1966, 2006.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Immunol.**, v. 9, p. 313-324, 2009.

SAMBROOCK, J.; FRISTCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDERS, C. J.; YY, Y.; MOORE III, D. A.; WILLIAMS, I. R.; GEWIRTZ, A. T. Humoral immune response to flagellin requires T cells and activation of innate immunity. **J. Immunol.**, v. 177, p. 2810-2818, 2006.

SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; MOSCA, T.; MASSIS, L. M.; ABRAHAMSOHN, I. A.; FERREIRA, L. C. Host and bacterial factors affecting induction of immune responses to flagellin expressed by attenuated *Salmonella* vaccine strains. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 2546-2555, 2004.

SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; ROWE, B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, p. 885-886, 1985.

SHEORAN, A. S.; CHAPMAN, S.; SINGH, P.; DONOHUE-ROLFE, A.; TZIPORI, S. Stx2-specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing Stx2 variants. **Infect. Immun.**, v. 6, p. 3125-3130, 2003.

SCHEIRING, J.; ANDREOLI, S. P.; ZIMMERHACKL, L. B. Treatment and outcome of Shiga-toxin-associated hemolytic uremic syndrome (HUS). **Pediatr. Nephrol.**, v. 10, p. 1749-1760, 2008.

SILBERSTEIN, C.; COPERLAND, D. P.; CHIANG, W.; REPETTO, H. A., IBARRA, C. A. glucosylceramide synthase inhibitor prevents the cytotoxic effects of Siga-toxin-2 ob human renal tubular epithelial cells. **J. Epithel. Biol. Pharmacol.**, v. 5, p. 71-75, 2009.

SINCLAIR, J. F.; O'BRIEN, A. D. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 32, p. 33751-8, 2002.

SMITH, K. D.; ANDERSEN-NISSEN, E.; HAYASHI, F.; STROBE, K.; BERGMAN, M.A.; BARRETT, L.R.; COOKSON, B.T.; ADEREM, A Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. **Nat. Immunol.**, v. 4p. 1247-1253, 2003.

SMITH, M. J.; TEEL, L. D.; CARVALHO, H. M.; MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN A. D. 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.

SMITH, M. J.; CARVALHO, H. M.; MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN, A. D. The 13C4 monoclonal antibody that neutralizes Shiga toxin type 1 (Stx1) recognizes three regions on the Stx1 B subunit and prevents Stx1 from binding to its eukaryotic receptor globotriaosylceramide. **Infect. Immun.**, v. 12, p. 6992-6998, 2006.

STOCKER, B. A. D. Aromatic-dependent *Salmonella* as anti-bacterial vaccines and as presenters of heterologous antigens or of DNA encoding them. **J. Biotechnol.**, v. 83, p. 45-50, 2000.

STROCKBINE, N. A.; MARQUES, L. R.; NEWLAND, J. W.; SMITH, H. W.; HOLMES, R. K.; O'BRIEN, A. D. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. **Infect. Immun.**, v. 53 p. 135-140, 1986.

SU, G. F.; BRAHMBHATT, H. N.; WEHLAND, J.; ROHDE, M.; TIMMIS, K. N. 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.

TACKET, C. O.; KELLY, S. M.; SCHODEL, F.; LOSONSKY, G.; NATARO, J. P.; EDELMAN, R.; LEVINE, M. M.; CURTISS, R. III. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella Typhi* vaccine vector strain 619 expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 3381-3385, 1997.

TAKEDA, Y. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **World Health Stat. Q.**, v. 50, p. 74-80, 1997.

TESH, V. L.; BURRIS, J.A.; OWENS, J. W.; GORDON, V. M.; WADOLSKOSKI, E. A.; O'BRIEN, A. D.; SAMUEL, J. E. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3392-3402, 1993.

TRACHTMAN, H.; CNAAN, A.; CHRISTSEN, V. A.; GIBBS, K.; ZHAO, S.; ACHESON, D.W.; WEISS, R.; KASKEL, F. J.; SPITZER, A.; HIRSCHMAN, G. H. Effect on a oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic Syndrome in children: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 100, p. 1337-1344, 2003.

TSUJI, T.; SHIMIZU, T.; SASAKI, K.; SHIMIZU, H.; TSUKAMOTO, K.; ARIMITSU, H.; OCHI, S.; SUGIYAMA, S.; TANAGUCHI, K.; NERI, P.; MORI, H. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. **Vaccine**, v. 26, p. 469–476, 2008.

VAN DE KAR, N. C.; MONNENS, L. A.; KARMALI, M. A.; VAN HINSBERGH, V. W. 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.

VILTE, D.; LARZA´BAL, A. M.; CATALDI, A. A.; MERCADO, E. C. Bovine colostrum contains immunoglobulin G antibodies against intimin, EspA, and EspB and inhibits hemolytic activity mediated by the type three secretion system of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15, p. 1208–1213, 2008.

WADOLKOWSKI, E. A.; SUNG, L. M.; BURRIS, J. A.; SAMUEL, J. E.; O'BRIEN A.D. 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.; MATSUOKA, K.; KITA, E.; IGAI, K.; HIGASHI, N.; MIYAGA, A.; WATANABE, T.; YANOSHITA, R.; SAMEJIMA, Y.; TERUNUMA, D.; NATORI, Y.; NISHIKAWA, K. Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxicogenic *Escherichia coli* Infections. **J. Infect. Dis.**, v. 189, p. 360-368, 2004.

WEN, S. X., TEEL, L. D., JUDGE, N. A.; O'BRIEN, A. D. S. Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. **Vaccine**, v. 24, p. 1142–1148, 2006.

WINTER, S. E.; THIENNIMITR, P.; NUCCIO, S. P.; HANEDA, T.; WINTER, M. G.; WILSON, R. P.; RUSSELL, J. M.; HENRY, T.; TRAN, Q. T.; LAWHON, S. D.; GOMEZ, G.; BEVINS, C. L.; RUSSMANN, H.; MONACK, D. M.; ADAMS, L. G.; BAUMLER, A. J. Contribution of flagellin pattern recognition to intestinal inflammation during *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* infection. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1904-1916, 2009.

YOSHIOKA, A.; OKAMOTO, R.; OSHIMA, S.; AKIYAMA, S.; TSUCHIYA, K.; NAKAMURA, T.; KANAI, T.; WATANABE, M. Flagellin stimulation suppresses IL-7 secretion of intestinal epithelial cells. **Cytokine**, v. 44, p. 57-64, 2008.

ZHU, C.; YU, J.; YANG, Z.; DAVIS, K.; RIOS, H.; WANG, B.; GLENN, G. BOEDEKER, E.C. Protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin B subunit. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 2, p. 359-366, 2008.

ANEXO

ARTIGO PUBLICADO DURANTE A EXECUÇÃO DESTE TRABALHO