PRISCILA APARECIDA DAL POZO GOMES

Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

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

2013

PRISCILA APARECIDA DAL POZO GOMES

Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

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.

Área de concentração: Microbiologia

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

Coorientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

SÃO PAULO

2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Gomes, Priscila Aparecida Dal Pozo.

Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) / Priscila Aparecida Dal Pozo Gomes. -- São Paulo, 2013.

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

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Microbiologia Aplicada.

Versão do título para o inglês: Development of new vaccine approaches against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) based nontoxic variants of Stx2 toxin of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC).

1. Toxina de Shiga 2. STEC 3. Adjuvantes 4. Síndrome hemolítica urêmica 5. Vacina I. Ferreira, Profa. Dra. Rita de Cássia Café
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB016/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscila Aparecida Dal Pozo Gomes.

Título da Tese: Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicas da toxina Stx2 de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC).

Orientador(a): Profa. Dra. 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:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **82** nas fls. **71** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rita de Cássia Café Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)** do qual participou(aram) o(s) alunos **Priscila Aparecida Dal Pozo Gomes, Juliano Domiraci Paccez, Catarina Joelma Magalhães Braga** e o pesquisador **Luis Carlos de Souza Ferreira** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **22.06.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de junho de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEa - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEa - ICB/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.050.12

WTL/mcgn

São Paulo, 12 de junho de 2012.

REF.: Protocolo nº 82.09.

"Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicas da toxina Stx2 de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)".

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, foi prorrogada até 22.06.2015.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.

Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

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

DEDICATÓRIA

Àos meus pais, José Francisco e Eugênia
por todo incentivo
e apoio incondicional
Ào meu marido Renato, pela paciência,
companheirismo e amor

AGRADECIMENTOS

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

À Profa. Rita de Cássia Café Ferreira, por novamente oferecer a oportunidade de continuidade do trabalho. Pela amizade, paciência, orientação, conselhos, zelando por todos os alunos e pelo laboratório, pelas sugestões, contribuindo muito para o desenvolvimento não só do meu projeto, como também o meu desenvolvimento pessoal e profissional, sendo mais que uma orientadora e sim uma amiga.

Ao Prof. Luis Carlos de Souza Ferreira, pela orientação prestada neste projeto e também pelos ensinamentos, pelo exemplo de pesquisador ético e exigente na medida necessária, pelas críticas construtivas, pela paciência, pelas brilhantes ideias e sugestões.

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

Ao meu esposo Renato, por todo apoio e incentivo, desde a época da faculdade, por ser além do meu amor, meu melhor amigo, é também um excelente companheiro e ouvinte, sempre disposto a me auxiliar e motivar. Pela compreensão as minhas ausências em casa, sou muito agradecida a toda paciência demonstrada nesses onze anos de convivência e de carinho.

À Maria Elisabete Sbrogio de Almeida pelo exemplo de dedicação e seriedade, pela ajuda e ensinamentos, principalmente nas boas práticas de laboratório, nos experimentos com animais, zelando pela boa convivência com todos.

Às minhas amigas e companheiras de muitas conversas e desabafos, nem sempre científicas, Aline, Carol, Débora, Daniela e Renata, pessoas maravilhosas que tive oportunidade de conhecer em São Paulo, que tornaram o ambiente de trabalho um local extremamente prazeroso, também pelo apoio e incentivo nos momentos

desanimadores, espero poder contar com vocês sempre, fico muito feliz pela oportunidade de conhecê-las.

Aos amigos e amigas de Laboratório, Juliana, Camila, Cariri, Rafael, Jaime, pelo auxílio científico, pelas interessantes sugestões e também pelas descontraídas conversas.

Aos demais colegas de laboratório: Rúbens, Vinícius, Wilson, Raiza, Milene, Mônica, Naína, Mariana C. e Mariana D., Ewerton, Luana, Natiely, Márcia.

Ao meu amigo Roberto e também vizinho de bancada, por todas as conversas descontraídas, pela companhia no laboratório, pelos almoços e pela força, me escutando e tranquilizando. À Deni apesar da pouca convivência, foi um prazer conhecê-la.

Ao Robert, meu companheiro de projeto, ainda que efêmero, pelo seu bom humor, e pelas interessantes sugestões de metodologia.

À Loren e ao Eduardo pelo apoio técnico e também por manterem o laboratório sempre organizado, controlando as finanças e sempre prestando auxílio a todos os alunos.

À Bruna minha amiga de longa data, pela amizade e ajuda e pelos momentos de descontração.

Ao pessoal do biotério de parasitologia Juliane e Sandra pelo auxílio com os animais de experimentação.

Às secretarias do departamento, Naíde e Aninha pelos excelentes serviços prestados e as funcionárias da biblioteca, Eva e Mônica, pelo auxílio no preparo da tese.

À Letícia Verônica Bentancor, por toda ajuda metodológica, sendo uma pessoa fundamental para a realização deste trabalho.

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

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

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

"O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece."
Benjamin Disraeli

RESUMO

GOMES, P. A. D. P. **Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC).** 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A toxina de Shiga (Stx), produzida por linhagens de *Escherichia coli* (STEC), pode ocasionar diarreia, colite hemorrágica e, em alguns casos, a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em humanos. A Stx2 é uma toxina do tipo AB5 composta de uma subunidade A monomérica e uma subunidade B pentamérica. A subunidade A é consiste em duas porções: o domínio A1 com atividade enzimática relacionada com a inibição da síntese proteica nas células humanas e o domínio A2 atóxico que conecta a porção A1 à subunidade B, envolvida na ligação ao receptor glicolipídico encontrado na superfície das células alvo. Neste estudo avaliamos o potencial imunogênico de uma forma recombinante atóxica da Stx2 (Stx2 Δ AB) constituída pela subunidade B e o fragmento A2 como estratégia para o desenvolvimento de uma vacina voltada para imunoproteção contra a SHU. A proteína Stx2 Δ AB foi administrada em camundongos combinada a diferentes adjuvantes: a toxina termo-lábil (LT), oriunda de linhagens de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a flagelina FliCi de *Salmonella entérica* – Typhimurium e hidróxido de alumínio. Cada animal recebeu quatro doses pela via subcutânea com 25 μ g da proteína Stx2 Δ AB em combinação com um dos adjuvantes mencionados acima. Adicionalment o efeito do adjuvante de Freund foi avaliado, sendo um grupo imunizado com CFA / IFA e o outro apenas com IFA em cada dose. Adicionalmente testamos a influência conformacional da proteína na proteção, imunizando os animais com a toxina desnaturada pelo aquecimento, juntamente com adjuvante completo/incompleto de Freund. O estudo revelou que os títulos séricos de IgG anti-Stx nos animais imunizados com o adjuvante de Freund foram os mais elevados, sendo mais proeminentes para ambas subclasses IgG1 e IgG2a. Adicionalmente, 77% dos animais vacinados com a preparação (CFA / IFA) ficaram protegidos após desafio com a dose letal da holotoxina Stx2, índice de proteção de 40% foi atingindo com o uso do adjuvante IFA. Animais imunizados com o toxóide desnaturado não apresentaram proteção, apesar dos elevados títulos séricos alcançados. Os resultados demonstram o potencial protetor do antígeno vacinal como vacina de subunidade e a importância da conformação da proteína na proteção. Os resultados suportam futuras avaliações da Stx2 Δ AB em formulações vacinais ou imunoterapia para o controle da SHU em humanos.

Palavras-chave: Toxina de Shiga. STEC. Adjuvantes. Síndrome Hemolítica Urêmica. Vacina.

ABSTRACT

GOMES, P. A. D. P. **Development of new vaccine approaches against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) based on nontoxic variants of the Stx2 toxin of Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC).** 2013. 118 p. Thesis (Ph. D. Thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The Shiga toxin (Stx) produced by *Escherichia coli* (STEC), has been shown to cause diarrhea, hemorrhagic colitis and in some cases, Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) in humans. Stx2 is an AB5-type toxin composed of a catalytic A subunit monomer and a B subunit pentamer. The A subunit consists of two parts: the A1 domain with enzymatic activity related to inhibition of protein synthesis in human cells and the nontoxic A2 domain that connects the A1 moiety to the B subunit, involved in binding to the glycolipid receptor found on the surface of target cells. In this study we evaluated the immunogenic potential of a non toxic recombinant form of Stx2 (Stx2 Δ AB) consisting of the B subunit and the A2 fragment as a strategy for vaccine development focused on immunoprotection against HUS. The Stx2 Δ AB protein was administered to mice in combination with different adjuvants: the heat-labile toxin (LT), derived from enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains, the flagellin FliC_i of *Salmonella enteric*-Typhimurium, aluminum hydroxide. Each animal receive four subcutaneous doses of 25 μ g of Stx2 Δ AB in combination with one of the above mentioned adjuvants. Also, the effect of Freund's adjuvants was assessed, whereby one group receive CFA / IFA and the other only IFA in each dose. Additionally we tested the influence of protein conformation on protection, immunizing the animals with the denatured toxin by heating, along with complete (CFA) / incomplete (IFA) Freund adjuvant. The study identified the animals immunized with Freund's adjuvant to produce the highest anti-Stx IgG serum titers, with both IgG1 and IgG2a being the dominant subclasses. Additionally, 77% of the animals vaccinated with the preparation (CFA / IFA) were protected after challenge with a lethal dose of Stx2 holotoxin, while 40% protection was achieved with the use of IFA adjuvant. Animals immunized with the denatured toxoid showed no protection, despite the high serum titers produced. The results show the potential protective effect of the Stx2 Δ AB vaccine regimen and also reveals the importance of protein conformation on the induction of immunoprotection. The present results support future assessments of Stx2 Δ AB in vaccine formulations or immunotherapy for the control of HUS in humans.

Keywords: Shiga toxin. STEC. Adjuvants. Hemolytic Uremic Syndrome. Vaccine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - albumina de soro bovino

B. subtilis – *Bacillus subtilis*

CT – toxina colérica

CFA – Adjuvante Completo de Freund

DL – dose letal

DO – densidade óptica

E. coli – *Escherichia coli*

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio de imunoadsorção enzimática

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

HCl – ácido clorídrico

IL - interleucina

IFA – Adjuvante Incompleto de Freund

IPTG - isopropil- β -D-tiogalactosideo

kDa - kilodaltons

LPS – lipopolissacarídeo

LT- toxina termo-lábil

LEE - Locus of Enterocyte Effacement

mA - miliampére

OPD – Ortho-Phenylenediamine

PBS – tampão salina fosfato

PBST - tampão salina fosfato acrescido de 0,5 % de tween 20

PMSF – phenylmethysulfonyl fluoride.

PSA – persulfato de amônio

qsp – quantidade suficiente para

rpm – rotações por minuto

SDS – duodecil sulfato de sódio

SFB - Soro Fetal Bovino

SHU - Síndrome Hemolítica Urêmica

STEC - *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga

Stx - toxina de Shiga

ST- toxina termo-estável

µg – microgramas

UFC - Unidade formadora de colônia

TTSS - Type Three Secretion System

Tir - Translocated Intimin Receptor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura da toxina de Shiga.....	27
Figura 2 - Representação esquemática do vetor de expressão para <i>E. coli</i> pET22b e fragmento Stx2 Δ AB inserido.	46
Figura 3 - Representação dos grupos de imunizações submetidos a diferentes desafios.....	52
Figura 4 - Respostas de anticorpos anti-Stx2 Δ AB específicos obtidos em camundongos BALB/c submetidos ao regime de imunização prime-boost, sensibilizados com a vacina de DNA.....	58
Figura 5 - Respostas de anticorpos anti-Stx2 Δ AB específicos obtidos em camundongos BALB/c submetidos ao regime de imunização prime-boost, sensibilizados com o vetor vazio	59
Figura 6 - Respostas de anticorpos anti-StxB em camundongos imunizados com pStx2 Δ AB e pCDNA.	60
Figura 7- Expressão, purificação e caracterização da proteína recombinante Stx2 Δ AB analisada por SDS-PAGE e imunodeteção.	63
Figura 8 - Detecção da subunidade A por imunodeteção. Ensaio de imunodeteção em filtro utilizando o soro policlonal de camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB	64
Figura 9 -Ligação da Stx2 Δ AB recombinante a receptores Gb3 na superfície de células Vero.....	65
Figura 10 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB combinada ou não a adjuvantes.	67
Figura 11 - Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).	68
Figura 12 - Resposta sérica das subclasses anti-Stx2 Δ AB obtida em camundongos após a quarta dose (dia 55).	69

Figura 13 - Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.	70
Figura 14 - Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2 Δ AB com ou sem adjuvante.	71
Figura 15 - Ensaio de neutralização <i>ex vivo</i> da Stx2 com anticorpos gerados em animais imunizados com Stx2 Δ AB.	73
Figura 16 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada a adjuvantes e IFA.	76
Figura 17 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada a adjuvantes e IFA.	77
Figura 18 - Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).	78
Figura 19 - Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).	79
Figura 20 - Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.	80
Figura 21 - Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.	81
Figura 22 - Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2 Δ AB.	82
Figura 23 - Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2 Δ AB.	83
Figura 24 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB na conformação nativa e desnaturada.	85
Figura 25 - Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).	86
Figura 26 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com 50 μ g da proteína recombinante Stx2 Δ AB.	87

Figura 27 - Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).	88
Figura 28 - Resposta sérica das subclasses anti-Stx2 Δ AB obtida em camundongos após a quarta dose (dia 55).	89
Figura 29 -Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.	90
Figura 30 - Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2 Δ AB.	91
Figura 31 - Ensaio de neutralização <i>ex vivo</i> da Stx2 com anticorpos gerados em animais imunizados com Stx2 Δ AB.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de iniciadores com suas sequências e sítio de restrição.....	45
Tabela 2 - Grupos de imunização	50
Tabela 3 - Níveis de uréia sérica após desafio com Stx2 incubadas com soros dos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB e adjuvantes.....	74
Tabela 4 - Níveis de uréia sérica após desafio com Stx2 incubadas com soros dos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB e adjuvantes.....	93

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 A descoberta da Síndrome Hemolítica Urêmica: um novo desafio para a saúde pública.....	23
1.2 Mecanismos de colonização e entrada da Stx na circulação.....	24
1.3 A patogênese da toxina de Shiga.	26
1.4 Epidemiologia e progressão das infecções com linhagens de STEC	28
1.5 Estratégias de prevenção e controle da SHU.	30
1.5.1 Bloqueio da infecção.	30
1.5.1 Estratégias terapêuticas.....	31
1.5.3 Uso de análogos sintéticos do receptor Gb3.	32
1.5.4 Uso de anticorpos monoclonais	32
1.6 Estratégias Profiláticas.....	33
1.6.1 Vacinas baseadas em bactérias recombinantes.	33
1.6.2 Vacinas baseadas em toxóides.....	34
1.6.3 Vacinas baseadas em proteínas purificadas ou peptídeos.	35
1.6.4 Vacinas baseadas em ácidos nucleicos purificados (vacinas de DNA).	36
1.7 Uso de adjuvantes em estratégias vacinais contra a SHU.	36
2 OBJETIVOS.....	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Meios de cultura utilizados:	40
3.2 Tampões, soluções e outros reagentes	40
3.3 Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.	43
3.4 Indução da expressão do gene StxΔAB nas linhagens de <i>B. subtilis</i> recombinantes.....	46
3.5 Preparação de esporos de <i>B. subtilis</i>.	47
3.6 Purificação da subunidade Stx2ΔAB recombinante por cromatografia de afinidade.	47

3.7 Dosagem da proteína Stx Δ AB recombinante produzidas em linhagens de <i>E. coli</i>	48
3.8 Determinação da antigenicidade do fragmento Stx2 Δ AB por imunodeteção.	48
3.9 Ensaio de ligação da proteína recombinante Stx2 Δ AB a células Vero.	48
3.10 Ensaio de imunização do regime vacinal prime-boost.	49
3.11 Ensaio de imunização com a proteína Stx2 Δ AB recombinante administrada com adjuvantes.	51
3.12 Ensaio de imunização com a proteína Stx2 Δ AB recombinante administrada em regime de combinação de adjuvantes.	51
3.13 Ensaio de imunização com a proteína Stx2 Δ AB recombinante em diferentes conformações.....	52
3.14 Adjuvantes utilizados.	53
3.15 Coleta e processamento das amostras.....	53
3.16 Determinação da resposta anti-Stx2 Δ AB.	53
3.17 Determinação da afinidade do anticorpo anti-Stx2 Δ AB obtidos após ensaio de imunização.....	54
3.18 Preparação da toxina Stx2 para testes de proteção.	54
3.19 Ensaio de desafio e teste de neutralização <i>in vitro</i> e <i>ex vivo</i>	55
3.20 Determinação da concentração de uréia sérica.	55
4 RESULTADOS.....	56
4.1 CAPÍTULO 1.....	57
4.1.1 Avaliação do potencial vacinal da linhagem recombinante de <i>B. subtilis</i> LDVP2 em combinação com a vacina de DNA nos ensaios de prime-boost.....	57
4.2 CAPÍTULO 2.....	62
4.2.1 Avaliação do potencial vacinal da proteína recombinante Stx2 Δ AB em combinação com diferentes adjuvantes.	62
4.2.2 Expressão, purificação e caracterização antigênica da proteína recombinante Stx2 Δ AB.....	62
4.2.3 Ligação da proteína recombinante Stx2 Δ AB em células Vero.....	64

4.2.4 Indução de resposta imune específica em camundongos imunizados com a proteína Stx2ΔAB.	65
4.2.5 Avaliação das subclasses de anticorpos séricos (IgG) de camundongos imunizados com a proteína Stx2ΔAB.	68
4.2.6 Determinação da afinidade dos anticorpos ao antígeno Stx2ΔAB.	69
4.2.7 Proteção vacinal conferida a desafios com a toxina Stx2.	70
4.2.8 Ensaios in vitro e ex vivo de neutralização da toxina Stx2.	72
4.2.9 Determinação da concentração sérica de uréia após ensaio ex vivo.	73
4.2.10 Avaliação da produção de anticorpos séricos (IgG) de camundongos imunizados com a proteína Stx2ΔAB em combinação de adjuvantes.	74
4.2.11 Determinação da afinidade dos anticorpos ao antígeno Stx2ΔAB.	79
4.2.12 Desafio com a toxina Stx2.	81
4.3 CAPÍTULO 3.	84
4.3.1 Avaliação do papel da conformação da proteína Stx2ΔAB na proteção.	84
4.3.2 Avaliação das subclasses de anticorpos séricos (IgG) de camundongos imunizados com a proteína Stx2ΔAB nativa e desnaturada.	89
4.3.3 Determinação da afinidade do anticorpo ao antígeno alvo.	90
4.3.4 Desafio com a toxina Stx2.	91
4.3.5 Ensaios ex vivo de neutralização da toxina Stx2.	92
4.3.6 Determinação da concentração sérica de uréia após ensaio ex vivo.	93
5 DISCUSSÃO.	94
6 CONCLUSÃO.	103
6.1 Conclusões gerais.	103
7 PERSPECTIVAS.	103
8 REFERÊNCIAS.	104
9 APÊNDICE A.	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 A descoberta da Síndrome Hemolítica Urêmica: um novo desafio para a saúde pública.

Os primeiros relatos de casos fatais em crianças com sintomas similares e característicos de uma síndrome como: forte anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda, foram descritos em 1955 na Europa, entretanto, naquela época sua etiologia era desconhecida. (GASSER et al., 1955). Alguns anos depois, em 1964, na América do Sul, o médico e pesquisador argentino Gianantonio observou os mesmos sintomas em 58 crianças em um hospital infantil em Buenos Aires, denominando-a naquele momento de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), porém não foi esclarecido se os sinais clínicos apresentados caracterizavam uma mesma doença ou outras patologias que apresentavam sintomas similares. Em 1975 no Canadá foram descritos casos semelhantes de SHU e a partir de estudos epidemiológicos entre familiares, concluíram que se tratava de uma doença infecciosa (KAPLAN et al., 1975). Dois anos depois, uma nova citotoxina foi descrita em filtrados de culturas de *Escherichia coli*, obtidas de isolados clínicos de casos de diarreia infantil e em suíno, esta apresentava efeitos citotóxicos em células Vero distintos aos das toxinas LT (termo-lábel) e ST (termo-estável), sendo então denominada de VT (Verotoxina) (KONOWALCHUK, 1977).

A etiologia da SHU foi esclarecida somente alguns anos depois com a associação da produção da citotoxina produzida pelas linhagens de *Escherichia coli* com os sintomas da doença (KARMALI et al., 1983). No mesmo ano, surgiram surtos de colite hemorrágica e SHU, inicialmente foram associados ao consumo de carne (hambúrgueres) mal cozida servida em uma rede de “fast-food” (RILEY et al., 1983), os casos se sucederam em diferentes locais nos Estados Unidos e também em outros países como Canadá, Europa e Japão causando preocupação (SMITH e SCOTLAND, 1988). Uma característica comum nestes surtos era a presença de uma linhagem com um perfil sorológico considerado raro na época, o sorotipo O157:H7. No mesmo período constatou-se que a propriedade tóxica da *E. coli* O157:H7 era semelhante à

linhagem de *Shigella dysenteriae* tipo I, esta toxina, portanto, passou a ser denominada de “Shiga-like toxin” (O'BRIEN et al., 1983; KARMALI, 1989). Atualmente a toxina de Shiga e as linhagens bacterianas produtoras foram então denominadas de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), sendo as EHEC um subgrupo. Há mais de um século se conhece os efeitos da toxina de Shiga produzida pela bactéria do gênero *Shigella* (O'BRIEN e HOLMES, 1987), a descrição de uma toxina produzida por *E. coli* com ação semelhante despertou o interesse e os esforços para caracterizar este novo problema de saúde pública. Estas observações formaram a base do nosso atual entendimento da SHU, gerando esforços multidisciplinares para prevenir e tratar a doença causada por este sorotipo virulento de *E. coli*.

1.2 Mecanismos de colonização e entrada da Stx na circulação.

A maioria dos casos de SHU inicia-se com a ingestão da bactéria presente em alimentos ou água contaminada (HUSSEIN, 2007), a dose de infecção, particularmente para o sorotipo O157:H7, é muito baixa (< 100 UFC) e a patogênese complexa (PATON e PATON, 1998, OBRIG, 2010). Após a ingestão, a bactéria atravessa o ambiente ácido do estômago e coloniza a mucosa intestinal induzindo uma lesão histopatológica definida como “attaching and effacing” (A/E), esta lesão é caracterizada por mudanças no citoesqueleto devido a acumulação de filamentos de actina polimerizada abaixo da bactéria, suprimindo as microvilosidades das células intestinais, isto ocasiona a formação de um pedestal, local onde a bactéria se adere intimamente (HACKER et al., 1997). Este complexo mecanismo de adesão, característico das *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) e enterohemorrágicas (EHEC), é governado por uma grande ilha de patogenicidade definida como região LEE (Locus of Enterocyte Effacement). A região LEE codifica as proteínas responsáveis pelo aparato secretor do tipo III (TTSS), as principais proteínas de montagem, (EspA, B e D), a intimina, principal adesina bacteriana e seu próprio receptor Tir (Translocated Intimin Receptor), trata-se de uma proteína transmembrana inserida dentro da membrana celular do hospedeiro pelo TTSS.

Além do Tir, outras duas proteínas eucarióticas localizadas na superfície das células funcionam como receptores para a intimina (SINCLAIR e O'BRIEN, 2004), uma é a Beta-1 integrina (FRANKEL et al., 1996) e a outra é denominada de nucleolina, esta ocorre em abundância no núcleo e possui como função primária a biogênese do ribossomo, entretanto ela pode ser expressa na superfície celular. Pesquisas recentes demonstraram que a produção da Stx na mucosa intestinal aumenta a síntese de nucleolina eucariótica, isto eleva o número de receptores disponíveis para a adesão da EHEC antes da translocação do Tir, aumentando a efetividade da infecção (ROBINSON et al., 2006). Algumas STEC não contêm a região LEE, como exemplo a O113:H21 que produz uma adesina denominada saa desempenhando papel na colonização da mucosa intestinal (PATON e PATON, 1998).

No lúmen intestinal a bactéria inicia a liberação da toxina Stx, esta atravessa o epitélio intestinal, cai na corrente sanguínea e liga-se a células que expressam quantidades elevadas do receptor específico. O mecanismo pelo qual a toxina Stx tem acesso à circulação sistêmica é objeto de estudo, evidências recentes mostram que a passagem pela barreira intestinal ocorre via rota celular, através da transcitose (LUKYANENKO et al., 2011). A colonização por EHEC estimula a macropinocitose, o que significativamente aumenta a captação de Stx e sua subsequente transcitose, Demonstrou-se que o remodelamento dos filamentos de actina, que ocorre no local da lesão A/E, também acontece globalmente na superfície celular, provendo assim uma rota para a disseminação sistêmica da holotoxina, contrapondo com o baixo conteúdo do receptor nos enterócitos (ZUMBRUN et al., 2010), ao longo do processo a toxina mantém sua integridade (LUKYANENKO et al., 2011).

Outro fator que contribui para a disseminação da toxina está associado à resposta inflamatória na lâmina própria intestinal, neste ambiente a presença da toxina Stx desencadeia a produção de quimiocinas pelas células epiteliais ou macrófagos residentes, levando ao influxo de células inflamatórias ao local, promovendo a injúria e causando hemorragia intestinal, este dano permite o acesso da Stx à corrente sanguínea, circulando livremente ou ligada aos polimorfonucleares (PMN), sendo então, distribuída aos órgãos-alvos (KING, 2002). Durante todo o processo infeccioso a EHEC não invade o organismo permanecendo aderida ao epitélio intestinal.

1.3 A patogênese da toxina de Shiga.

A toxina Stx é caracterizada por ser uma toxina do tipo AB₅, isto é, uma toxina formada por duas subunidades independentes com estrutura e função própria. A subunidade A é responsável pelos efeitos tóxicos no organismo, promovendo o bloqueio da síntese proteica, possuindo atividade de RNA N-glycosidase, clivando uma base de adenina na posição 4324 da subunidade ribossomal 28S, inativando a elongação proteica. Durante o trânsito intracelular, a subunidade A é clivada em dois fragmentos (A1 e A2) sendo que a atividade tóxica está relacionada à subunidade A1. A segunda porção, ou domínio ligante da toxina Stx é representada por cinco subunidades B que se organizam na forma de um barril no qual se encaixa a subunidade A tóxica (Figura 1). As subunidades B têm como função o reconhecimento e a ligação a um receptor celular glicolipídico, denominado Gb₃ (globotriaosil ceramida Gal α [1-4]Gal β [1-4]glicosil ceramida), com exceção da variante Stx_{2e} que liga preferencialmente ao Gb₄. (PATON et al., 2000; FRASER et al., 2004). O receptor Gb₃ é encontrado na superfície de muitas células do corpo, como no epitélio do intestino delgado, mas é particularmente abundante em células de endotélio microvascular renal e cerebral, assim como no pâncreas e pulmões (BIELASZEWSKA et al., 1997, OBRIG, 2010, PATON et al., 2000),

A resposta inflamatória do hospedeiro potencializa a toxicidade da Stx. Inicialmente notou-se uma ação sinérgica entre a toxina de Shiga e o fator de necrose tumoral (TNF) em células endoteliais das veias umbilicais humanas (LOUISE e OBRIG, 1991), e células do endotélio cerebral (EISENHAUER, et al., 2001), este mesmo efeito foi observado com a presença de LPS e Stx, esse mecanismo deve-se ao fato de LPS induzir a expressão de interleucinas e TNF pelos macrófagos (LOUISE e OBRIG, 1992). A maneira como estes mediadores inflamatórios aumentam a citotoxicidade é estimulando a síntese de Gb₃ nas células endoteliais, isto ocorre pela indução da atividade da galactosil-transferase (VAN DE KAR et al., 1995, EISENHAUER, et al., 2001), as interleucinas (IL-1 α , IL-1 β) agem pelo mesmo mecanismo, porém em menor extensão (VAN DE KAR et al., 1992, EISENHAUER, et al., 2001) estes mediadores

inflamatórios apresentaram o mesmo efeito em células mesangiais (SIMON et al., 1998).

De fato, a toxina Stx em concentrações subinibitórias, também demonstrou capacidade de mediar a resposta inflamatória aumentando a transcrição de vários genes envolvidos na produção de quimiocinas, citocinas e fatores de transcrição envolvidos na resposta imune e apoptose (MATUSSEK et al., 2003).

Figura 1- Estrutura da Toxina de Shiga

A) Ilustração da toxina de Shiga, demonstrando a subunidade A, a qual é clivada nos fragmentos A1 e A2, a subunidade B pentamérica. B) Diagrama da toxina de Shiga, destacando os sítios de ligação ao receptor Gb3 na subunidade B. C) Destaque para o sítio de clivagem da subunidade A gerando os fragmentos A1 e A2.

Fonte: Adaptado de Johannes e Romer (2009)

1.4 Epidemiologia e progressão das infecções com linhagens de STEC

A SHU caracteriza-se por surtos ou casos isolados, com o aumento crescente de casos da doença a preocupação relacionada à segurança dos alimentos aumentou, sendo que, em todo o mundo a *E. coli* O157:H7 e demais sorogrupos que causaram doenças em humanos, foram isolados com maior prevalência em carnes de gado e derivados, especialmente carne moída. Além da ingestão de carne bovina crua ou mal passada, outros alimentos, como frutas, vegetais, água e contato pessoal são fontes alternativas de infecção para os seres humanos (HUSSEIN, 2007), de fato, muitas pessoas podem albergar STEC como parte da sua microflora transiente sem apresentar sinais da doença (CAPRIOLI et al., 2005). Estudos avaliando a presença de STEC na pecuária são realizados em todo o mundo. Na América do Norte, Europa e Oceania, STEC é isolada tanto no gado de corte como no leiteiro (CAPRIOLI et al., 2005), sendo prevalente também no Brasil (OLIVEIRA et al., 2008, TIMM et al., 2007), outros animais ruminantes também podem ser vetores de STEC (CAPRIOLI et al., 2005). A ocorrência pode ser minimizada pela aplicação de técnicas com alto padrão de higiene em todas as etapas da cadeia de produção de alimentos.

As maiores vítimas são crianças menores de 5 anos e idosos, sendo a principal causa de falência renal aguda em crianças nos EUA (EKLUND et al., 2002) e Argentina, e respondem por 20% dos casos de transplantes renais na Argentina tanto em crianças como em adolescentes (EXENI, 2001). O primeiro sintoma, a colite hemorrágica é caracterizada por diarreia com presença de sangue nas fezes, fortes dores abdominais, febre e vômitos (HUSSEIN, 2007). As lesões mais graves, característica da SHU, estão associadas à presença da toxina na circulação sanguínea, causando, falência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia (PATON et al., 2001). Uma fração significativa dos indivíduos infectados (aproximadamente 25%) podem apresentar sequelas como: disfunção renal crônica, hipertensão, crise convulsiva, cefaleia severa, cegueira, paralisia, letargia e diabetes (PATON e PATON, 1998, NATARO e KAPER, 1998). A SHU normalmente é uma condição ameaçadora à vida e a letalidade pode chegar a mais de 6% e, entre idosos, pode atingir a 50% dos indivíduos infectados (CDC 2006, 2009). Os pacientes mais

severamente afetados requerem transfusões de sangue e terapia com diálise (diálise peritoneal e hemodiálise) que apesar de reduzirem a mortalidade não extingue a possibilidade de sequelas (JOHANNES e ROMER, 2010).

O intervalo entre a ingestão do veículo contaminado e o início da diarreia é em média 3 dias, inicialmente não há presença de sangue nas fezes, porém, em mais 2-3 dias, torna-se sanguinolenta em 90% dos casos (TARR et al., 2005, OBRIG, 2010). Os sintomas da SHU aparecem nos indivíduos infectados cerca de duas semanas após a infecção com a bactéria (TARR et al., 2005). O patógeno e fatores do hospedeiro contribuem para as manifestações clínicas da infecção por STEC, caracterizando a SHU como uma doença multifatorial, e o processo patogênico não é totalmente esclarecido (CAPRIOLI et al., 2005). Uma vez em contato com as células alvo, não é possível neutralizar a toxina e, conseqüentemente, evitar os danos celulares e teciduais associados à SHU.

Dentre os vários sorotipos de EHEC, linhagens do sorotipo O157:H7 receberam maior destaque, pois foram responsáveis por surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Argentina, Chile e alguns países europeus (BANATVALA et al., 2001, SCOTLAND et al., 1985; KARMALI et al., 1986; FRIEDRICH et al., 2002). Recentemente (2011), um surto na Alemanha e mais 15 países Europeus e Norte Americanos, apresentaram dados incomuns, com 22% dos casos progredindo para a SHU, afetando 88% adultos, sendo causado por um organismo híbrido, apresentando características comuns a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e STEC, este surto mostrou que a troca de material genético entre organismos pode gerar um patógeno hipervirulento aumentando a incidência da doença em adultos (PETRUZZIELO-PELLEGRINI e MARSDEN, 2012).

São conhecidos dois grandes grupos de toxinas Stx produzidas por linhagens de STEC: Stx1 e Stx2, ambas possuem variantes, sendo a toxina Stx2 mais heterogênea, subdividindo-se em Stx2c, Stx2d, Stx2d_{ativável} Stx2e e Stx2f. A toxina Stx1 é mais conservada está relacionada à toxina de Shiga produzida por *S. dysenteriae* tipo I, sendo, portanto, neutralizada por anticorpos preparados contra essa toxina, a Stx2 não pode ser neutralizada pelos anticorpos anti-toxina de Shiga, possuindo propriedades imunológicas distintas (KARMALI et al., 1986; SCOTLAND et al., 1985, STROCKBINE

et al., 1986). A toxina Stx2 é responsável pela maior severidade da doença, fato epidemiologicamente comprovado pela associação da maioria dos casos de SHU com linhagens produtoras apenas da toxina Stx2 ou em combinação (Stx2/Stx2c ou Stx2/Stx1) (ORTH et al., 2007, EKLUND et al., 2002). Realmente as células endoteliais micro e macrovasculares apresentam diferentes susceptibilidades à ação da Stx1 e Stx2, sendo a Stx2 mais tóxica ao microendotélio que a Stx1, tornando este fator relevante para a patogênese da SHU, pois o microendotélio vascular é o tecido mais afetado (BAUWENS et al., 2011). A comprovação do potencial tóxico da Stx2 também ocorreu nos ensaios *in vivo* (ACHESON et al., 1995; BIELASZEWSKA et al., 1997; FRIEDRICH et al., 2002, WADOLKOWSKI et al., 1990), em ratos a Stx2 demonstrou uma DL₅₀ 400 vezes menor que Stx1 (TESH et al., 1993). Linhagens que produzem os variantes Stx2d e Stx2e são associadas a diarreias em humanos, mas não a SHU e linhagens produtoras de Stx2f não são patogênicas aos humanos (FRIEDRICH et al., 2002).

Os variantes da Stx, portanto, são diferenciados pela atividade biológica, reatividade imunológica e afinidade aos receptores ao qual se ligam (FRASER et al., 2004), de fato moléculas de Gb3 apresentam na superfície celular diferentes domínios com diferentes ceramidas, podendo estar arranjadas na membrana diversamente levando a uma diferencial interação com Stx1 e Stx2, apesar da cadeia de trissacarídeo ser idêntica (OBRIG, 2010).

1.5 Estratégias de prevenção e controle da SHU.

1.5.1 Bloqueio da infecção.

Como o TTSS é essencial para a colonização da EHEC, ele é o principal alvo das pesquisas para a obtenção de uma vacina que possa impedir a transmissão da EHEC aos humanos. Na tentativa de obter uma resposta imunológica apropriada, especialmente de mucosa, fez com que na última década, pesquisas de novas estratégias vacinais, que visassem o bloqueio da adesão bacteriana ao epitélio

intestinal do gado, principalmente o sorotipo O157:H7, fossem relatadas em vários estudos (MOXLEY et al., 2009, MCNEILLY et al., 2010, PETERSON et al., 2007, SMITH et al., 2009, VAN DONKERSGOED et al., 2005), o objetivo é impedir a adesão, reduzir a colonização e consequente eliminação dos micro-organismos pelas fezes do gado, reduzindo o risco da exposição humana a este patógeno. Um grupo de pesquisadores testou uma vacina que está para ser comercializada, baseada em sobrenadante concentrado de proteínas secretadas de *E. coli*, como um coquetel, a eficácia foi evidente em vários estudos, em condições de exposição natural ou após inoculação da própria EHEC (MOXLEY et al., 2009, PETERSON et al., 2007, SMITH et al., 2009), adicionalmente, nestes estudos foi observado que a vacinação da maioria dos animais oferece efeito protetor (imunidade de rebanho) aos não vacinados que convivem no mesmo local (PETERSON et al., 2007). Este efeito também foi confirmado em larga escala em estudos feitos com gado comercial, resultando em diminuição de 92% na colonização pela *Escherichia coli* O157:H7 (SMITH et al., 2009).

O benefício de usar proteínas do sobrenadante, abordagem que está mais próxima de ser comercializada, é o conteúdo da preparação, que consiste em uma mistura de vários antígenos que podem contribuir para a eficácia da vacina, incluindo proteínas do TTSS, flagelina e LPS, apesar da probabilidade de não conter a intimina, por não ser uma proteína secretada, estas estratégias vacinais apresentam resultados promissores.

1.5.2 Estratégias terapêuticas.

A exposição à bactéria STEC ainda é um problema em alguns países e a indisponibilidade de tratamento um desafio atual, isto incentivou as pesquisas que visam encontrar alternativas terapêuticas mais efetivas para combater a doença. O uso de análogos sintéticos do receptor da toxina Stx e o uso de anticorpos monoclonais são as principais, a finalidade de ambas é adsorção ou neutralização da toxina, seja no intestino ou na circulação, impedindo sua ligação ao receptor Gb3.

1.5.3 Uso de análogos sintéticos do receptor Gb3.

As pesquisas voltadas para encontrar uma molécula que mimetize o receptor apresentaram bons resultados *in vitro* e em animais. Teoricamente, os receptores análogos podem ser administrados tanto oralmente como parenteralmente, a primeira forma, adsorveria a toxina no intestino impedindo sua entrada na circulação e o uso parenteral bloquearia a Stx já circulante de ligar aos tecidos alvos. Testes em animais foram bem sucedidos usando *E. coli* recombinante, viva ou morta, expressando o oligossacarídeo na sua superfície (PATON et al., 2000, PATON et al., 2001). Outros estudos avaliando a eficácia do uso oral de polímeros de Gb3 sintetizados quimicamente (Synsorb-PK), foram bem sucedidos em teste clínicos de fase I, porém inconclusivos em fase II, em três estudos diferentes, e prematuramente interrompido em teste de fase III (KARMALI, 2004). Outros testes em animais foram bem sucedidos utilizando outros receptores sintéticos, com afinidades à Stx muito maiores que o Synsorb-PK, inclusive pela via parenteral, (Super Twig, Starfish, Daisy, “Gb3 polymer”), porém até o momento, não foram testados clinicamente (KARMALI, 2004).

1.5.4 Uso de anticorpos monoclonais

O uso de anticorpos monoclonais atualmente adquiriu importante destaque no campo terapêutico, seja o uso de quiméricos, humanizados ou totalmente humanos. Realmente, a administração passiva de anticorpos representa uma alternativa real para o tratamento da SHU em pessoas infectadas, sendo efetiva em prevenir a doença em modelos experimentais, como camundongos (KIMURA, et al., 2002, SHEORAN et al., 2003) e suínos (SHEORAN et al., 2005, JEONG et al., 2010). O uso de monoclonais murinos para terapia em humanos é limitado, isto se deve pela geração de resposta contra o anticorpo terapêutico e a meia-vida do anticorpo murino na circulação humana ser curta (1-2 dias), para contornar esta desvantagem, anticorpos quiméricos (murino/humano) foram desenvolvido, apesar de uma pequena melhora, os problemas continuaram, (KIMURA et al., 2002). Para reduzir a imunogenicidade do monoclonal, o

uso de anticorpos humanizados ou humanos, atualmente são as melhores opções, apresentando menor da toxicidade ou efeito adverso (TZIPORI et al., 2004), entretanto, a humanização de anticorpos é um processo complicado e caro.

O grau de proteção depende da dose do anticorpo e do tempo de administração (TZIPORI et al., 2004, SHEORAN et al., 2005), quanto maior o intervalo de tempo entre a infecção e a administração do anticorpo, maiores doses são requeridas. (MATISE et al., 2001, TZIPORI et al., 2004), os monoclonais que reconhecem a subunidade A, mostraram-se mais promissores em neutralizar os variantes da Stx2 (TZIPORI et al., 2004). Testes clínicos de fase I realizados na Argentina demonstraram que monoclonal humanizado contra a subunidade B da toxina Stx2 é bem tolerado, persistiu por longos períodos na circulação e apresentou baixa imunogenicidade (LÓPEZ et al., 2010). Considerando que os resultados com os anticorpos monoclonais mostram-se promissores, o maior desafio é determinar quando estes agentes devem ser administrados para conseguir o desejável efeito de impedir o desenvolvimento da SHU, já que há uma estreita janela de oportunidade de intervenção terapêutica (KARMALI , 2004). No entanto, o custo elevado e as dificuldades inerentes a um diagnóstico rápido e preciso limitam a aplicação desses reagentes.

1.6 Estratégias Profiláticas

1.6.1 Vacinas baseadas em bactérias recombinantes.

O uso de vetores bacterianos vivos baseia-se na geração de linhagens bacterianas recombinantes que expressam formas atóxicas da toxina Stx de forma a promover a produção de anticorpos específicos na mucosa intestinal e na corrente sanguínea. Foram descritos resultados de imunização em condições laboratoriais com linhagens vacinais de *Vibrio cholerae* (BUTTERTON et al., 1997), *Salmonella enterica* (SU et al., 1992, ROJAS et al., 2010), *Shigella dysenteriae* (WU et al., 2011) e *Bacillus subtilis* (GOMES et al., 2009). As linhagens são modificadas geneticamente para

expressar a subunidade B da Stx ou derivados de Stx constituídos pela subunidade B e porções não tóxicas da subunidade A. Em 2011, Gu e colaboradores avaliaram uma estratégia de “prime boost” utilizando salmonela recombinante pela via oral expressando as proteínas Esp A, a porção terminal da intimina e a StxB (denominada EIS) primando o sistema imune, este mesmo fragmento na forma de proteína recombinante purificada foi usado como estímulo pela via parenteral. Os animais ficaram protegidos ao desafio oral com EHEC, porém esta proteção não pode ser atribuída à presença apenas dos anticorpos protetores contra a Stx, pois uma resposta gerada contra os fatores de adesão presentes na vacina também ocorre, impedindo a colonização pela EHEC, protegendo os animais ao desafio.

A administração pela via oral, especialmente utilizando bactérias recombinantes como vetor, promove a indução de imunidade de mucosa (anticorpos IgA no trato intestinal), porém a relevância destes anticorpos na proteção ainda não foi comprovada. A utilização de linhagens patogênicas atenuadas, como a *Salmonella* entérica, *Shigella dysenteriae* e *Vibrio cholerae* trazem um potencial risco de reversão para a forma virulenta, além disso, a presença de LPS compromete sua validação como veículo vacinal. Em geral, os resultados revelam baixa imunogenicidade sistêmica (anticorpos IgG específicos na corrente sanguínea) e proteção parcial a desafios com a toxina nativa em modelo experimental murino.

1.6.2 Vacinas baseadas em toxóides.

Toxóides são obtidos pela inativação de toxinas por métodos físicos ou químicos. Nessa estratégia de imunização, a toxina Stx é utilizada na sua composição completa, o que preserva suas propriedades imunogênicas, possibilitando a obtenção de anticorpos que reconhecem e neutralizam a toxina nativa. No caso das estratégias voltadas para o controle da SHU, os toxóides são inativados quimicamente por tratamento com glutaraldeído (BIELASZEWSKA et al., 1997, LUDWIG et al., 2002). Embora os resultados tenham sido promissores em modelo experimental, receios

inerentes à inativação completa da Stx criam restrições em relação à segurança da vacina para uso em humanos.

Como alternativa ao uso de toxóides, laboratórios pesquisam o uso de toxinas recombinantes contendo mutações que reduzem ou inativem as propriedades tóxicas da Stx. Tal estratégia mostra-se atraente, pois dispensa o tratamento químico da toxina, o que simplifica o processo de produção do imunógeno. No caso específico de Stx foram descritas mutações na subunidade A que reduzem a toxicidade sem comprometimento da imunogenicidade (ISHIKAWA et al., 2003, SMITH et al., 2006, WEN et al., 2006), e também mutação na subunidade B da Stx1, prejudicando a ligação ao receptor (BAST et al., 1997), ambas gerando anticorpos protetores.

1.6.3 Vacinas baseadas em proteínas purificadas ou peptídeos.

O maior alvo das pesquisas nessa linha é a subunidade B da Stx, responsável pela ligação ao receptor das células alvo. Por não estar envolvida com o efeito tóxico da Stx, não há necessidade de etapas adicionais relacionadas à inativação da proteína purificada. No entanto, dificuldades encontradas na expressão da proteína em sistemas heterólogos, a montagem na sua conformação pentamérica, pequeno tamanho e reduzida imunogenicidade, têm sido os principais fatores que restringiram as pesquisas de vacinas baseadas na subunidade B da Stx a condições laboratoriais. O uso de adjuvantes é fundamental para tornar a vacinação eficaz, como demonstrado em diversos trabalhos que caracterizaram o potencial imunogênico da subunidade B (BYUN et al., 2001, IMAI et al., 2004, TSUJI et al., 2008a, 2008b, ZHU et al., 2008, MARCATO et al., 2001, 2005, GAO et al., 2009, GU et al., 2009, CAI et al., 2011, GUPTA et al., 2011).

Outra estratégia envolve o uso de peptídeos sintéticos correspondendo a sequências da subunidade B (HARARI et al., 1988, 1990, BOYD et al., 1991). Esses peptídeos correspondem geralmente a regiões hidrofílicas da proteína, ou seja, trechos da molécula que estão expostos na toxina, permitindo o reconhecimento por anticorpo.

Embora resultados iniciais tenham sido promissores em condições experimentais, o alto custo de produção e a baixa imunogenicidade restringiram o aprimoramento dessa estratégia vacinal.

1.6.4 Vacinas baseadas em ácidos nucleicos purificados (vacinas de DNA).

Vacinas de DNA empregam a informação genética do patógeno para a geração de plasmídeos purificados como constituintes da formulação vacinal. O DNA plasmidial consiste em promotor capaz de controlar a expressão de um ou mais antígenos em células de mamíferos após a inoculação em tecido muscular resultando na produção do antígeno vacinal alvo. Resultados promissores foram obtidos em condições experimentais com formulações que codificam a subunidade B e porções atóxicas da subunidade A (CAPOZZO et al., 2003, BENTANCOR et al., 2009). Como principais vantagens dessa estratégia estão o baixo custo de produção e a simplicidade do processo de preparação que prescinde da purificação do antígeno alvo. No entanto, a baixa imunogenicidade das formulações testadas, sobretudo, para a produção de anticorpos específicos, indica que aprimoramentos ainda devem ser alcançados antes que essas vacinas possam ser testadas em seres humanos.

1.7 Uso de adjuvantes em estratégias vacinais contra a SHU.

Os adjuvantes têm sido usados em combinação às vacinas convencionais para obtenção de uma resposta imune elevada e duradoura, sendo fundamental para vacinas de subunidades e proteínas purificadas, que são fracamente imunogênicas. Com o uso de adjuvantes a quantidade do antígeno é menor e poucas doses podem ser requeridas para estimular a resposta imune, economizando no custo da vacina (GUPTA e SIBER, 1995). O potencial adjuvante da maioria das formulações desenvolvidas está associado a efeitos adversos, como reação local, estimulação exacerbada das células do sistema imune, mas estes mecanismos envolvidos são na

sua maioria atribuídos a adjuvantividade (GUPTA et al., 1993). Contudo, o adjuvante deve ser estável em consideração a sua toxicidade e função, sem qualquer interação com o antígeno, deve ser biodegradável e não gerar imunogenicidade contra si. Nenhum adjuvante disponível até o momento atende todos esses critérios (GUPTA E SIBER, 1995).

Na tentativa de bloquear o processo de internalização da toxina, a subunidade B ligante da toxina de Shiga tornou-se alvo, dentre os vários trabalhos focados na subunidade B associada a adjuvantes, destacamos apenas um estudo comparativo sobre o papel de vários adjuvantes na resposta contra a Stx2B, os resultados de proteção ficaram aquém do esperado, a sobrevivência dos animais não alcançou 144 horas (MARCATO et al., 2005), melhoraram apenas após o uso de uma molécula carreadora (KLH – Keyhole Limpet Hemocyanin) em combinação com o adjuvante RAS-TDM (Ribi Adjuvant System).

A utilização preferencialmente da toxina Stx1B de *E. coli* ou *S. dysenteriae* (IMAI et al., 2004, ZHU et al., 2008, CAI et al., 2011, GUPTA et al., 2011), dificulta uma análise comparativa, pois trata-se de um imunógeno diferente, e com pouca relevância clínica. Os poucos trabalhos descritos para a Stx2 não foram muito promissores, podemos destacar o uso Stx2B purificada na qual a proteção obtida foi apenas após a administração do imunógeno com uma alta contaminação com LPS (MARCATO et al., 2001). Outros autores também falharam na obtenção de anticorpos anti-Stx2B e na neutralização dos mesmos (ACHESON et al., 1995, BYUN et al., 2001). Em outro experimentos utilizando a proteína Stx2B a proteção obtida foi decepcionante (10%), a melhora nos resultados foi obtida após a co-administração com Stx1B (Stx2B+Stx1B) ou após a fusão de ambas subunidades (GAO et al., 2009), estes poucos trabalhos demonstram a dificuldade de se obter uma potencial imunoterapia usando a subunidade B da toxina Stx2.

Em nosso laboratório foi previamente reportado que camundongos imunizados com linhagens recombinantes de *Salmonella* e *Bacillus* modificados para expressar uma forma recombinante de Stx (Stx2 Δ AB) geraram anticorpos em soro e mucosas e, no caso de *Salmonella*, proteção parcial a desafios com doses letais da toxina Stx2 (GOMES et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Neste estudo, damos continuidade à

avaliação do antígeno Stx2 Δ AB (subunidade B mais o fragmento A2) previamente testado pelo nosso grupo em animais imunizados com vacina de DNA e linhagens *S. Typhimurium* recombinantes como vetor oral, ambas abordagens vacinais apresentaram características promissoras (BENTANCOR et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Iniciamos o trabalho testando a estratégia de “prime boost” utilizando a vacina de DNA (BENTANCOR et al., 2009) para sensibilização e como estímulo linhagens recombinantes de *B. subtilis* expressando o antígeno Stx2 Δ AB intracelularmente como reforço. Aprofundamos nossos ensaios utilizando a proteína recombinante como vacina de subunidade, complementando a análise do fragmento Stx2 Δ AB em diferentes abordagens: vacinas de DNA, bactéria recombinante e proteína purificada. O toxóide Stx2 Δ AB foi produzido em linhagens de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e o seu potencial vacinal foi avaliado em combinação com adjuvantes clássicos (Freund e hidróxido de alumínio) ou bem caracterizados em nosso laboratório (enterotoxina termo-lábil (LT) e flagelina. (FliCi), assim como seu estado conformacional, como estratégia de prevenção da síndrome hemolítica urêmica (SHU).

2 OBJETIVOS

Desenvolver uma estratégia vacinal de subunidade (acelular) contra a SHU, baseada na forma atóxica Stx2 Δ A2B. A proposta baseia-se na formulação que emprega o variante atóxico da toxina Stx2: a subunidade B acrescida de 31 aminoácidos da porção A2 (Stx2 Δ A2B). O variante atóxico Stx2 purificado será avaliado quanto a sua funcionalidade, imunogenicidade em camundongos na presença de diferentes adjuvantes (flagelina, LT, hidróxido de alumínio, Freund) e determinação da imunidade protetora em modelos de desafio e ensaios in vivo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura utilizados:

Meio completo LB (Luria Bertoni) foi usado rotineiramente para o cultivo das linhagens bacterianas (Sambrock et al., 1989). Quando necessário foi adicionado aos meios ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (10 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL), dependendo do vetor utilizado. O meio sólido foi obtido acrescentando-se 2% de ágar ao meio LB.

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

3.2 Tampões, soluções e outros reagentes:

Soluções para mini-preparação de DNA-plasmidiano

- Solução P1

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

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

Água mili-Q qsp 100 mL

Autoclavar 20 minutos a 120 °C

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

- Solução P2

200 µg/mL NaOH 10 N

500 µL SDS 20%

Água mili-Q qsp 100 mL

- Solução P3

29,4 g de KOAc

11,4 mL de ácido acético glacial

Água mili-Q qsp 100 mL

Homogeneizar e autoclavar 20 minutos a 120 °C

Armazenar à 4 °C.

Soluções para eletroforese de proteínas (SDS-PAGE)

- Tampão de amostra – 2% SDS

4% 2-mercaptoetanol

10% Glicerol

0,06 M Tris-HCl pH 6,8

4 mM EDTA

Azul de bromofenol adicionado livremente.

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

• Gel de separação (17,5%):	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 mL
	Acrilamida/Bis C=1,6%	2,92 mL
	Água bidestilada	0,35 mL
	SDS 10%	50 µL
	PSA 10%	75 µL
	TEMED	2 µL
• Gel de empilhamento (5%):	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,375 mL
	Acrilamida/Bis C=5%	0,5 mL
	Água bidestilada	2,05 mL
	SDS 10%	30 µL
	PSA 10%	30 µL
	TEMED	3 µL

Soluções para coloração do gel

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

Soluções para purificação da proteína Stx2 Δ AB.

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

Soluções para imunodeteção em filtro (imunoblot)

- Tampão de transferência: 39 mM Glicina
20 % Metanol
0,0375 % SDS
48 mM Tris-HCl
- Tampão para bloqueio e hibridização com anticorpo: 5% de leite desnatado em pó em PBS-Tween 20 a 0,05%.

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

Soluções para ensaios imunoenzimáticos (ELISA)

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

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

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

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

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

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

3.3 Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados.

Linhagens de *E. coli* laboratoriais: BL21(DE3)pLysS, JM 109, DH5α e *B subtilis* utilizadas durante a execução do projeto foram descritas previamente (KIM et al, 1996; PACCEZ et al., 2006, 2007, Novagen). Para amplificação dos fragmentos necessários

à expressão de Stx2 foram empregados iniciadores específicos (tabela 1) e DNA extraído de uma linhagem de EHEC O157:H7 EDL 933W, coleção de cultura do laboratório. O vetor de expressão em *B. subtilis*, pHCMC03 foi preparado para albergar os insertos *stx2ΔAB*, por meio da dupla digestão com as enzimas *Bgl II* e *Aat II*, semelhantemente ao já descrito com o inserto StxB (GOMES et al, 2009), este vetor denominado pLDVP2, permite a expressão do antígeno codificado em linhagens de *B. subtilis* a partir do promotor (*gsiB*) induzido por condições de estresse (NGYEN et al, 2005), esta construção foi realizada e explorada durante o mestrado. Os iniciadores utilizados para esta construção contendo as enzimas *Bgl II* e *Aat II* encontram-se descritos na tabela 1.

A linhagem bacteriana *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, USA), foi rotineiramente cultivada em meio Luria-Bertani (LB) com adição de cloranfenicol (20 µg/mL), as culturas eram crescidas a 37 °C com agitação. Células de *E. coli* quimiocompetentes eram preparadas após tratamento com CaCl₂ de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK et al., 2001). O vetor pGEMT Easy albergando a sequência do operon Stx2 contendo o sítio de restrição com *EcoRI* a jusante e a montante (pCVT1), foi inserido em linhagem *E. coli* JM 109, denominada de LDV 15, (ROJAS et al., 2010), sendo utilizada em ensaios de desafio e *ex vivo*.

O plasmídeo pCVT-2 com o fragmento atóxico Stx2ΔAB foi descrito previamente (BENTANCOR et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Após a transformação e propagação em *E. coli* DH5α, o plasmídeo pCVT-2 foi usado como modelo para o próximo passo no processo de clonagem no vetor de expressão pET-22b(+) (Novagen, USA). O plasmídeo pCDNA 3.1 para a utilização como vacina de DNA foi descrito previamente (BENTANCOR, et al., 2009),

Para a produção da proteína Stx2ΔAB em linhagens de *E. coli* utilizamos o vetor pET22b inserido com fragmento de DNA, responsável pela codificação da toxina Stx2ΔAB, clonados entre os sítios de restrição *Nde I* e *Xho I*. A proteína codificada é formada pela subunidade B mais os 31 aminoácidos subunidade A2, semelhante à vacina de DNA (BENTANCOR et al, 2009). O plasmídeo recombinante pLStxAB (Figura 2) foi utilizado para transformarmos em linhagem de *E. coli* BL21plysS.

Tabela 1 - Lista de iniciadores com suas sequências e sítio de restrição.

Iniciadores	Sequência 5' - 3'	Sítio de restrição
Stx Δ AB2 Fw	CAGATAGCT <u>AGATCT</u> ATGCCTGTTATAAAA	<i>Bgl II</i>
StxB2Rv	CGAATCAGAC <u>GC</u> TCGCCTCAGTCATTATT	<i>Aat II</i>
Stx Δ A Fw	AGGAACACCTG <u>CATATG</u> AAGTGT	<i>Nde I</i>
Stx Δ A Rv	CCGCTCGAGTTTACCCGTTGT	-
StxB2Fw	GGGTAATAAAGGAGTTCCATATGAAGAAG	-
StxB2Rv	CCGCTCGAGGTCATTATTAAACAG	<i>Xho I</i>

Figura 2- Representação esquemática do vetor de expressão para *E. coli* pET22b fragmento Stx2 Δ AB inserido.

O fragmento com o gene stx2 Δ AB foi clonado nos sítios de restrição Nde I e Xho I do vetor pET22b dando origem ao vetor pLStxAB. Representação esquemática do vetor de expressão para *E. coli* pET22b e fragmento Stx2 Δ AB inserido.

3.4 Indução da expressão do gene Stx Δ AB nas linhagens de *B. subtilis* recombinantes.

As análises da expressão em *B. subtilis* recombinantes albergando o plasmídeo (pLDVP2) foram realizadas de acordo como descrita anteriormente (GOMES et al., 2009).

3.5 Preparação de esporos de *B. subtilis*.

As etapas de esporulação de *B. subtilis* foram realizadas segundo o método de exaustão como previamente descrito (NICHOLSON et al, 1990). Culturas eram mantidas por 48 horas em meio específico, seguidas por tratamento com lisozima e incubação em elevada temperatura (65° C) para inativação de células vegetativas residuais (PACCEZ et al, 2006). Esporos viáveis eram titulados e depois estocados a – 20 °C até o uso.

3.6 Purificação da subunidade Stx2ΔAB recombinante por cromatografia de afinidade.

A proteína Stx2ΔAB foi purificada da linhagem de *E. coli* BLStx2ΔAB contendo o gene *stx2ΔAB*. A cultura crescida por 12 horas foi inoculada na diluição 1:100 em 1 litro de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/ml) e cloranfenicol (20 µg/ml) e a linhagem bacteriana BLStx2ΔAB foi crescida a 37°C com agitação de 200 rpm até a fase exponencial (OD₆₀₀, 0,6). Após aproximadamente 2 horas de cultivo, as culturas foram induzidas com 0,5mM de IPTG e incubadas por 3 horas adicionais. As bactérias foram sedimentadas por centrifugação e concentradas 10 vezes por ressuspensão em 100 mL de solução salina fosfato (PBS) pH 7.2. A parede bacteriana foi rompida inicialmente com lisozima (100 µg/mL) a temperatura ambiente por 30 minutos e depois lisada com auxílio do homogeneizador (Artepeças APLAB 10), a suspensão bacteriana obtida foi submetida à centrifugação a 15000 rpm por 40 minutos a 4 °C e o sobrenadante recuperado. A fração solúvel foi filtrada em membrana com poros 0,22 µm (Sartorius) e purificada por cromatografia de afinidade em coluna HiTrap (HP) carregada com Ni²⁺ (Amersham, Biosciences) utilizando o FPLC (Fine Performance Liquid Chromatography) AKTA (Amersham Pharmacia). As proteínas não ligadas a coluna eram lavadas com 25 mL de tampão A. A proteína Stx2ΔAB foi eluída com 600 mM de Imidazol em tampão B, dialisada e concentrada com PBS a um volume final de 1 mL pela passagem sobre a membrana de filtração com poros de 3 kDa (Amicon - Millipore).

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

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

3.8 Determinação da antigenicidade do fragmento Stx2 Δ AB por imunodeteção.

Imunodeteção foi feita por SDS-PAGE seguida por eletrotransferência para membrana de nitrocelulose (poros 0.45 μ m) a 60 mA por 40 minutos. Após a transferência a membrana foi bloqueada por 12 h em leite desnatado 3% em tampão salina fosfato (PBS) contendo 0.05% Tween 20 (PBST) a 4 °C. A membrana de nitrocelulose foi em seguida lavada três vezes com PBST e incubada com soro policlonal de coelho anti-Stx2 ou soro policlonal de camundongo anti-Stx2 Δ AB conforme a necessidade, seguida por novas lavagens e incubação com o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado a peroxidase [Sigma]), de acordo com o procedimento descrito previamente (ROJAS et al., 2010).

3.9 Ensaio de ligação da proteína recombinante Stx2 Δ AB a células Vero.

Para a realização deste experimento, células VERO foram cultivadas em meio DMEM completo com 10% de soro fetal bovino inativado em garrafas de cultivo e tripsinizadas após atingir 100% de confluência. Cerca de 1×10^6 células foram incubadas no gelo com 1 μ g da proteína Stx2 Δ AB purificada durante 30 minutos em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB), penicilina (10 U.I/mL), estreptomicina (10 mg/mL) (Cultilab) e gentamicina (10 mg/mL), em volume final de 100 μ L. A proteína foi usada na forma nativa ou desnaturada

(aquecimento a 100 °C por 10 minutos). Após a incubação as células foram submetidas a 3 ciclos de lavagens com PBS acrescido de 1% SFB (PBS-SFB). O anticorpo anti-Stx2ΔAB (título 10⁴) na diluição 1/200 foi adicionado a células por 30 minutos no gelo, para marcação extracelular da toxina. As células foram lavadas 3 vezes com (PBS-SFB) e incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo produzido em cabra conjugado a FITC) (BD Biosciences) diluído 1/100 por 30 minutos. Após outro ciclo de lavagens, as células foram ressuspensas em 200 µL em PBS-SFB e examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACScalibur (Becton Dickinson, Mountain View, CA). para a detecção da fluorescência emitida pelas células marcadas. Os dados foram analisados pelo programa “FlowJo” para a obtenção dos histogramas de fluorescência. Todo o ensaio de marcação foi realizado a 4 °C e entre cada lavagem as células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos.

3.10 Ensaio de imunização do regime vacinal prime-boost.

Os procedimentos para a detecção das propriedades imunomoduladoras do regime vacinal “prime-boost” foram determinados da seguinte forma: Grupos de 5 camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas, obtidos junto ao biotério da Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia – USP foram inoculados via intramuscular como primeiro estímulo com duas doses de 100 µg da vacina de DNA (BENTANCOR et al, 2009) com intervalo de 15 dias entre as doses (dias 1 e 15). Para a administração do reforço utilizou-se as linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* pela via oral com células vegetativas ou esporos transformadas com o vetor pLDVP2 albergando o fragmento Stx2ΔAB ou transformadas com o vetor vazio (LDV4). Os regimes de imunização para ambas as células ou esporos eram baseados em artigos previamente descritos para o uso de *B. subtilis* como veículo vacinal (PACCEZ, et al, 2008, GOMES et al, 2009). A imunizações orais eram feitas em alíquotas de 0,5 mL de suspensão bacteriana contendo aproximadamente 2X10¹⁰ UFC de células vegetativas e 2x10⁹ UFC de esporos usando uma gavagem intragástrica, os camundongos receberam 0,5mL de solução de bicarbonato de sódio 0,1M 30 minutos antes da administração das células vegetativas. Animais receberam três doses consistindo em

etapas de três consecutivas doses nos dias 30-32, 45-47, 60-62. As coletas de sangue (punção na região retro-orbital) foram feitas antes de qualquer tratamento (pré-imune) e nos dias 14, 29, 44, 59 e 77 e as coletas fecais foram realizadas apenas nos dias 44, 59 e 77.

Os grupos utilizados nos regimes vacinais encontram-se na tabela abaixo.

Tabela 2 - Grupos de imunização.

Grupos	Sensibilização	Reforço
G1	pStx2ΔAB	LDV4 (vegetativa)
G2	pStx2ΔAB	LDV4 (esporos)
G3	pStx2ΔAB	<i>Bacillus</i> LDVP2 (vegetativa)
G4	pStx2ΔAB	<i>Bacillus</i> LDVP2 (esporos)
G5	pCDNA ϕ	LDV4 (vegetativa)
G6	pCDNA ϕ	LDV4 (esporos)
G7	pCDNA ϕ	<i>Bacillus</i> LDVP2(vegetativa)
G8	pCDNA ϕ	<i>Bacillus</i> LDVP2 (esporos)
G9	pStx2ΔAB	pStx2ΔAB
G10	pCDNA ϕ	PBS

3.11 Ensaios de imunização com a proteína Stx2 Δ AB recombinante administrada com adjuvantes.

Iniciamos os ensaios de imunização em camundongos após a obtenção proteína Stx2 Δ AB recombinante purificada com a administração em conjunto com adjuvantes. Grupos de 9 camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas, obtidos junto ao biotério da Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia – USP foram imunizados com 4 doses pela via subcutânea, com intervalos de duas semanas entre as doses, com 25 μ g de proteína Stx2 Δ AB recombinante purificada sem adjuvante. Nos demais grupos 25 μ g da proteína Stx2 Δ AB misturada com 5 μ g da proteína termo-lábel (LT) ou flagelina FliCi, 12,5 μ g de gel de hidróxido de alumínio ou adjuvante completo de Freund na primeira dose e incompleto nas demais doses na proporção 1:1. Amostras de soros foram coletadas do plexo retro-orbital no dia zero (pré- imune) e nos dias 13, 27, 41, 55, 70 após a imunização. Trinta dias após a última dose, cinco animais de cada grupo foram submetidos ao desafio e os 4 animais restantes foram acompanhados por 60 dias para avaliação da memória. Repetiu-se a imunização com hidróxido de alumínio e adjuvante de Freund para a realização de ensaio adicional de desafio. Todos os procedimentos estavam em concordância com os princípios do código Brasileiro e aprovados pelo comitê de ética no uso de animais de laboratórios.

3.12 Ensaios de imunização com a proteína Stx2 Δ AB recombinante administrada em regime de combinação de adjuvantes.

Os ensaios de imunização em camundongos com a proteína Stx2 Δ AB recombinante purificada foram realizados com a administração dos adjuvantes em conjunto com adjuvante incompleto de Freund. Grupos de 10 camundongos BALB/c fêmeas com 6-8 semanas, foram imunizados com 4 doses pela via subcutânea com 25 μ g de proteína Stx2 Δ AB recombinante purificada sem adjuvante. Nos demais grupos 25 μ g da proteína Stx2 Δ AB foi adicionada a 5 μ g da proteína termo-lábel (LT) ou seu mutante atóxico (LTK4R) (RODRIGUES et al., 2011) ou flagelina FliCi e cada grupo

misturado ao adjuvante incompleto de Freund em todas as doses na proporção 1:1, nos dias 1, 14, 28 e 42, de acordo com a figura 3. Após cada dose foram coletadas amostras de soros nos dias 0 (pré-imune), 13, 27, 41, 55 e uma coleta adicional 30 dias após a última dose (dia 70) antes ao ensaio de desafio.

Neste experimento os animais foram divididos em dois grupos contendo cinco animais em cada, e a diferença entre os grupos era a dose da toxina Stx2 usada no ensaio de desafio. Trinta dias após a última os animais do Grupo A, foram desafiados com 8 DL₅₀ e os animais do Grupo B receberam 2 DL₅₀, desafio menos agressivo para comparar o perfil de proteção. Como controle imunizamos os animais com a proteína purificada Stx2ΔAB apenas.

Figura 3 – Representação dos grupos de imunizações submetidos a diferentes desafios.

Animais submetidos a dois desafios diferentes 8 DL₅₀ e 2 DL₅₀, foram previamente imunizados com a toxina termo-lábel e a flagelina como adjuvante contendo em sua formulação o adjuvante incompleto de Freund.

3.13 Ensaio de imunização com a proteína Stx2ΔAB recombinante em diferentes conformações.

Neste ensaio utilizamos a proteína Stx2ΔAB recombinante na forma nativa e desnaturada. A proteína foi desnaturada por aquecimento a 100 °C por 10 minutos antes de ser misturada ao adjuvante de Freund. Neste experimento imunizamos os animais com 25 µg da proteína nativa ou desnaturada com adjuvante incompleto de Freund em todas as doses (IFA) e um grupo controle com o adjuvante completo na primeira dose e incompleto nas subsequentes (CFA/IFA), exatamente como descrito no

sub-item 3.10. O esquema vacinal e as coletas de soros ocorreram conforme já descrito. Repetiu-se o ensaio usando 50 µg da proteína nativa de desnaturada e adjuvante de Freund (CFA/IFA).

3.14 Adjuvantes utilizados.

A toxina termo-lábel (LT) (LASARO et al., 2009) e seu mutante atóxico LTK4R (RODRIGUES et al., 2011) e a flagelina recombinante FliCi foram produzidas em nosso laboratório. O alumen (Alhydrogel (Al(OH)₃), Brenntag Biosector, Denmark) e adjuvante de Freund (Sigma-Aldrich) estão disponíveis comercialmente (Sigma-Aldrich).

3.15 Coleta e processamento das amostras.

A coleta de sangue dos camundongos foi realizada por punção retro-orbital, obtendo-se cerca de 500 µL de sangue total. O sangue foi mantido em estufa a 37° C por 30 minutos e 4 °C até a retração do coágulo, e centrifugados por 15 minutos a 3000 rpm a 4° C. O soro foi estocado a -20 °C.

3.16 Determinação da resposta anti-Stx2ΔAB.

Anticorpos específicos para a proteína Stx2ΔAB foram mensurados por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) usando placas de microtitulação MaxiSorp de 96 poços (Nalge Nunc) revestida com a proteína recombinante purificada Stx2ΔAB (1 µg/mL) em PBS pH 7,4 e incubada por 12 horas a 4 °C. Os anticorpos sistêmicos IgG foram quantificados com anti-IgG descrito acima na diluição 1/3000. Na detecção das subclasses de anticorpos a diluição do segundo anticorpo anti IgG1-HRP de camundongo usada foi de 1/5000 e para anti IgG2a-HRP 1/2000. Os procedimentos de ELISAS foram executados em acordo com a metodologia previamente publicada (GOMES et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Os títulos foram calculados usando o programa Microcal Origin 8.0 Professional. Resultados foram expressos pela média

aritmética e erro padrão do título da média foram obtidos de pelo menos 3 independentes experimentos para cada lote de soro obtido.

3.17 Determinação da afinidade do anticorpo anti-Stx2 Δ AB obtidos após ensaio de imunização.

A afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB obtidos após imunização dos camundongos foi determinada por ensaio de ELISA adaptado usando tiocianato de amônio (MAC DONALD et al., 1988). O procedimento é similar ao descrito em ensaio de ELISA padrão com a inclusão de uma etapa adicional, após incubação com concentrações normalizada de soros anti-Stx2 Δ AB (1/100 até 1/6000), obtidos dos diferentes grupos de imunização, as placas eram lavadas e concentrações variando de 0 a 8M de tiocianato de amônio diluídos em tampão PBS foram adicionadas aos poços em duplicata. As placas foram incubadas com o composto por 15 minutos a temperatura ambiente, realizou-se um novo ciclo de lavagens e o ensaio prosseguiu como o ELISA normal. A porcentagem de ligação foi determinada como segue: D.O. 492nm na presença de tiocianato de amônio X100 / D.O. 492nm na ausência de tiocianato de amônio.

3.18 Preparação da toxina Stx2 para testes de proteção.

A toxina stx2 foi obtida a partir do cultivo da linhagem *E. coli* LDV15 (ROJAS et al., 2010). A cultura foi crescida durante 12 horas em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com ampicilina (100 μ g/ml) a 37°C com agitação a 200 rpm. As bactérias foram recolhidas após centrifugação a 12000 g por 20 minutos e ressuspensas em 10 mL de tampão fosfato (PBS) pH 7.5 acrescido de Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) a uma concentração final de 1mM. Para lisar as células, sem prejudicar a atividade tóxica da Stx2, o extrato celular é submetido a 4 ciclos de choque térmico (passagem de -80 °C to 40 °C). . Em seguida realiza a precipitação da proteína com

solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) saturado 65%, sendo adicionado ao longo de 1 hora sobre agitação branda e mantidas a 0 °C. Após 2 horas de incubação a 4°C, o precipitado foi coletado por nova centrifugação a 12000 g por 20 minutos e ressuspenso em 5 mL de PBS, pH 7,5 acrescido de PMSF e dialisado com duas trocas de um litro cada com tampão PBS por 24 horas. As amostras foram estocadas em alíquotas a -80 °C.

3.19 Ensaio de desafio e teste de neutralização *in vitro* e *ex vivo*.

A atividade neutralizante dos soros obtidos após imunização com a proteína Stx2ΔAB em associação com adjuvantes foi avaliada em ensaios *in vitro* e *ex vivo* da mesma maneira que descrita previamente (BENTANCOR et al., 2009, GOMES et al., 2009, ROJAS et al., 2010). O ensaio de desafio (*in vitro*) foi realizado com a toxina Stx2 inoculada via intra-venosa um mês após a última dose, correspondendo a 53 ng/animal o que equivale a 8 DL₅₀, esta dose resulta em 100 % de mortalidade nos animais não protegidos 72-96 horas após a injeção. No teste *ex vivo* animais não imunizados recebem a toxina Stx 2 previamente incubada com soros obtidos após a última dose dos animais imunizados e a sobrevivência é monitorada.

3.20 Determinação da concentração de uréia sérica.

A concentração dos níveis séricos de uréia foi determinada nas amostras de soros coletadas dos animais 24 e 48 horas após ensaios *ex vivo* com a toxina Stx2, para a detecção foi utilizado o kit enzimático colorimétrico de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest, Brasil). Resultados foram mensurados em espectrofotômetro de placas (Multiscan MS Labsystem) usando filtro de 550 nm.

4 RESULTADOS

O antígeno Stx2 Δ AB é avaliado neste estudo em diferentes abordagens: expressos como vacina de DNA, bactéria recombinante (*B. subtilis*) e proteína purificada. Os resultados do presente trabalho serão divididos em três capítulos. Inicialmente é descrita a avaliação do potencial vacinal da estratégia de “prime-boost” utilizando para sensibilização dos animais a vacina de DNA previamente descrita (BENTANCOR, et al, 2009) e como estímulo as linhagens de *B. subtilis* recombinantes, na forma de células vegetativas ou esporos (Capítulo 1). Na segunda parte do trabalho descrevemos uma vacina de subunidade, caracterizando a proteína recombinante Stx2 Δ AB e avaliação do potencial vacinal da mesma em combinação com diferentes adjuvantes (Capítulo 2). Na terceira etapa do trabalho avaliamos a importância da conformação da proteína recombinante Stx2 Δ AB na proteção (Capítulo 3).

4.1 CAPÍTULO 1

4.1.1 Avaliação do potencial vacinal da linhagem recombinante de *B. subtilis* LDVP2 em combinação com a vacina de DNA nos ensaios de prime-boost.

A proteína Stx2 Δ AB expressa pela linhagem vacinal LDVP2, foi caracterizada durante a execução do mestrado, sendo os níveis de expressão semelhantes aos obtidos para a expressão apenas da subunidade B (GOMES et al, 2009). Com a linhagem LDVP2 realizamos ensaios de imunização em combinação com a vacina de DNA já descrita (BENTANCOR et al, 2009), para verificar se a linhagem de *B. subtilis* seria capaz de re-estimular o sistema imunológico dos animais, induzindo anticorpos após sensibilização com a vacina de DNA. Utilizou-se a vacina de DNA (pStx2 Δ AB) em duas doses pela via intramuscular e a linhagem LDVP2 em três doses pela via oral. Usou-se os vetores pCDNA vazio e a linhagem LDV4 como controle. As respostas de IgG sérico anti-StxB em animais imunizados com a vacina de DNA como estímulo estão apresentados na figura 4.

Como demonstrado na figura 4, os títulos de anticorpos séricos anti-StxB mantiveram-se em torno de 208 para a primeira dose, elevando para 490 na segunda dose, após a administração da vacina de DNA (pStx2 Δ AB). Nos animais estimulados com *B. subtilis* LDVP2 os títulos aumentaram após a quarta dose para valores em torno de 737 nas células vegetativas e no uso de esporos cresceram para valores 1010 apenas após a quinta dose. Já o uso de *B. subtilis* como células vegetativas albergando o vetor vazio (LDV4) os títulos também aumentaram após a terceira (706) e quarta dose (1295) e utilizando os esporos desta mesma linhagem os títulos aumentaram (770) após a quarta dose. Tais resultados indicam que a linhagem vacinal LDVP2, seja na forma de células vegetativas ou esporos, não foi capaz de promover um aumento específico nos níveis de anticorpos séricos anti-StxB em animais previamente sensibilizados com a vacina de DNA que codifica para o mesmo antígeno vacinal, Stx2 Δ AB.

Figura 4 - Respostas de anticorpos anti-Stx2 Δ AB específicos obtidos em camundongos BALB/c submetidos ao regime de imunização prime-boost, sensibilizados com a vacina de DNA.

Camundongos BALB/c foram imunizados com a vacina de DNA (pStx2 Δ AB) nas duas primeiras doses via intramuscular e estimulados com as linhagens LDV4 ou LDVP2 com célula vegetativa ou esporos pela via oral. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra StxB determinados com misturas das amostras colhidas dos animais de cada grupo. ■ pStx2 Δ AB/LDV4 vegetativa, □ pStx2 Δ AB/LDV4 esporos, ▨ pStx2 Δ AB/LDVP2 vegetativa ▩ pStx2 Δ AB/LDVP2 esporos. Os valores de títulos encontrados nas amostras pré-ímmes foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os valores representam as médias e os respectivos erros padrão.

A figura 5 representa o uso do vetor pCDNA vazio como estímulo, e as linhagens de *B. subtilis* LDV4 e LDVP2 administradas em células vegetativas e esporos como reforço. Os títulos em média para os animais que receberam como estímulo o vetor vazio atingiram níveis de anticorpos semelhantes ao ensaio anterior para a primeira (269) e segunda dose (458). Nas doses de reforço com as linhagens de *B. subtilis* LDVP2 os títulos obtidos tiveram um crescimento modesto indo de 659 na

terceira dose e 678 na quarta dose diminuindo para 457 na quinta dose, quanto ao uso de esporos os títulos aumentaram para 1415 na terceira dose, mantiveram elevados para 1070 na quarta dose e caíram para 688 na quinta dose. No uso da linhagem de *B. subtilis* LDV4, os títulos aumentaram a partir da quarta dose atingindo o valor de 1186 para célula vegetativa e 1071 na quinta dose para o uso de esporos.

Figura 5- Respostas de anticorpos anti-Stx2 Δ AB específicos obtidos em camundongos BALB/c submetidos ao regime de imunização prime-boost, sensibilizados com o vetor vazio.

Camundongos BALB/c foram imunizados com o vetor vacinal vazio pCDNA nas duas primeiras doses via intramuscular e estimulados com as linhagens LDV4 ou LDVP2 com célula vegetativa ou esporos pela via oral. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra StxB determinados com misturas das amostras colhidas dos animais de cada grupo. ■ pCDNA/LDV4 vegetativa, □ pCDNA/LDV4 esporos, ▨ pCDNA/LDVP2 vegetativa ▩ pCDNA/LDVP2 esporos. Os valores de títulos encontrados nas amostras pré-ímmunes foram descontados dos valores medidos nos animais vacinados. Os valores representam as médias e os respectivos erros padrão.

Como controle do experimento realizou-se um ensaio teste utilizando apenas a vacina de DNA em 5 doses com intervalo de 15 dias entre as doses, com 100 μ g da vacina pStx2 Δ AB e pCDNA vazio e o resultado do ensaio segue demonstrado na figura 6. Neste experimento podemos notar que não ocorre diferença nas duas primeiras

doses entre as vacinas de DNA, tanto a que expressa Stx2 Δ AB quanto a que possui o vetor vazio, apenas podemos notar diferença após a quarta dose, semelhante ao resultado obtido nos dois estímulos utilizados nos ensaios de “prime-boost” como demonstrado na figura 4 e 5, pois não houve diferença entre os diferentes vetores usados nos ensaios. Na primeira dose os títulos foram de 189 para pStx2 Δ AB e 184 para pCDNA, aumentando na segunda dose para 576 e 626 respectivamente. Na quarta dose os títulos ampliam para 1334 e 698 e por fim na quinta dose atingem valores de 1874 e 939 para pStx2 Δ AB pCDNA e respectivamente.

Figura 6 - Respostas de anticorpos anti-StxB em camundongos imunizados com pStx2 Δ AB e pCDNA.

Camundongos BALB/c foram imunizados com o vetor vacinal pStx2 Δ AB ou com o vetor vazio pCDNA em cinco doses via intramuscular. Os resultados estão apresentados na forma de títulos de IgG específicos contra StxB determinados com misturas das amostras colhidas dos animais de cada grupo. ■ pStx2 Δ AB, □ pCDNA. Os valores representam as médias e os respectivos erros padrão de dois independentes experimentos.

Ao final dos ensaios de imunização, utilizando a estratégia vacinal de “prime-boost”, os animais foram desafiados, em todos a sobrevivência não ultrapassou o

período de 96 horas, revelando que apesar de ocorrer um aumento no título de anticorpos em comparação aos soros pré-ímmes, não foi suficiente para oferecer proteção. Com relação ao ensaio *ex vivo* a sobrevivência foi semelhante atingindo o máximo de 96 horas. Neste experimento, devido à fragilidade dos animais, não foram coletadas amostras de soros para a realização da dosagem de ureia sérica.

Apesar dos trabalhos publicados pelo grupo (BENTANCOR et al, 2009; GOMES et al, 2009), a estratégia de combinar a vacina de DNA com linhagens bacterianas como vetor oral não demonstrou sinergismo. Após a obtenção de soros não protetores obtidos com a realização do ensaio de “prime-boost”, focamos nossos esforços na estratégia de utilização da proteína recombinante como antígeno vacinal, desta maneira iniciamos a pesquisa do melhor adjuvante vacinal para obtenção de anticorpos protetores.

4.2 CAPÍTULO 2

4.2.1 Avaliação do potencial vacinal da proteína recombinante *Stx2ΔAB* em combinação com diferentes adjuvantes.

Nesta segunda etapa do trabalho, continuamos nosso estudo com o antígeno *Stx2ΔAB* e priorizamos os trabalhos com a utilização da proteína recombinante como antígeno vacinal. Nosso trabalho de expressão da proteína recombinante *Stx2ΔAB* estão descritos na tese de mestrado “Desenvolvimento de uma nova estratégia vacinal contra Síndrome Hemolítica Urêmica utilizando linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* capazes de expressar a toxina *Stx2* de EHEC”, no entanto os procedimentos de purificação foram otimizados após testes com várias linhagens para expressão da proteína recombinante. Neste trabalho, exploramos a imunogenicidade e para isto a linhagem BL21 (DE3) pLysS foi escolhida para dar continuidade a produção, purificação e obtenção da proteína utilizada em ensaios de imunização.

4.2.2 Expressão, purificação e caracterização antigênica da proteína recombinante *Stx2ΔAB*.

A linhagem recombinante *E. coli* BL*Stx2ΔAB* foi capaz de expressar a proteína *Stx2ΔAB* (figura 7a). A expressão da proteína *StxB* (8 kDa) pela linhagem BL*Stx2ΔAB*, foi confirmada após a adição de IPTG à cultura, como visualizado em gel SDS-PAGE. Em função do reduzido peso molecular, não foi possível observar o fragmento A2 nas preparações obtidas. Para determinar a antigenicidade da proteína recombinante realizou-se ensaio de imunodeteção usando soro policlonal anti-*Stx2*, como demonstrado na figura 7b. A subunidade B da *Stx2ΔAB* foi reconhecida pelo soro policlonal anti-*stx2* confirmando a antigenicidade da proteína *Stx2ΔAB* expressa e purificada. Mais uma vez a ausência do fragmento A2 (3,6 kDa) no ensaio de imunodeteção deve ser atribuída à reduzida massa molecular. O nível de expressão da *Stx2ΔAB* foi aproximadamente 5% do total da proteína celular expressa e a solubilidade em torno de 40% (dados não demonstrados). A fração solúvel a partir de 1

litro de cultura induzida por 3 horas foi purificada por afinidade na coluna HiTrap carregada com Ni^{2+} e o rendimento final foi de 20 mg/L de proteína com grau de pureza acima de 95%.

Figura 7 - Expressão, purificação e caracterização da proteína recombinante Stx2 Δ AB analisada por SDS-PAGE e imunodetecção.

(A) Detecção da expressão de Stx2 Δ AB em linhagens de *E. coli* BL21. Amostras: M. marcador de massa molecular; 1. Extrato celular de BLStx2 Δ AB não induzida; 2. Extrato celular de BLStx2 Δ AB induzida; 3. Proteína Stx2 Δ AB purificada. (B) Antigenicidade da proteína recombinante. Imunodetecção feita com soro policlonal anti-Stx2 de coelho. 1. Extrato celular de BLStx2 Δ AB não induzida; 2. Extrato celular de BLStx2 Δ AB induzida; 3. Proteína Stx2 Δ AB purificada.

Para demonstrarmos que o fragmento A2 estava presente na Stx2 Δ AB recombinante, o soro policlonal anti-Stx2 Δ AB obtido de camundongos foi empregado na revelação de extratos celulares da linhagem selvagem EDL 933 O157:H7 e a linhagem LDV 15, ambas contendo a toxina nativa Stx2. Como observado na figura 8 a subunidade A foi detectada nos extratos das duas linhagens.

Figura 8- Detecção da subunidade A por imunodeteção.

Ensaio de imunodeteção em filtro utilizando o soro policlonal de camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB. Amostras: 1 Extrato celular da linhagem EDL 933 O157:H7; 2. Extrato celular da linhagem LDV15; 3. Proteína Stx2 Δ AB purificada.

4.2.3 Ligação da proteína recombinante Stx2 Δ AB em células Vero.

Para avaliarmos possíveis alterações na conformação e atividade biológica da Stx2 Δ AB recombinante, realizamos ensaio de ligação com células Vero. Neste experimento as células foram incubadas com Stx2 Δ AB em seu estado nativo ou desnaturado por 30 minutos a 4 °C. Como demonstrado na figura 9, ficou evidente que a proteína nativa manteve sua habilidade de ligar o receptor localizado na superfície das células Vero. No entanto a proteína desnaturada perdeu essa habilidade, com valores aproximados aos obtidos com o controle, usando apenas células Vero.

Figura 9- Ligação da Stx2 Δ AB recombinante a receptores Gb3 na superfície de células Vero.

A proteína recombinante foi incubada com células Vero (10⁶ células), e submetidas à citometria de fluxo para medição da fluorescência emitida, como descrito. A curva em cinza indica células sem incubação com a Stx2 Δ AB (2,4), a linha tracejada e contínua demonstra incubação com a proteína desnaturada (3,1) e a nativa (8,5) respectivamente. Os valores entre parênteses correspondem à mediana da intensidade de fluorescência.

4.2.4 Indução de resposta imune específica em camundongos imunizados com a proteína Stx2 Δ AB.

A fim de validarmos o antígeno vacinal, ensaios de imunização foram feitos utilizando adjuvantes co-administrados a Stx2 Δ AB. Os animais foram imunizados com quatro doses pela via subcutânea com a proteína recombinante Stx2 Δ AB sozinha ou misturada com um dos quatro adjuvantes (LT nativa, FliCi recombinante, hidróxido de alumínio ou Freund), amostras de soro foram coletadas após cada dose e analisadas quanto a presença de anticorpos em ensaios ELISA com a proteína Stx2 Δ AB purificada.

A cinética da resposta de anticorpos sistêmicos IgG permaneceu baixa até a segunda dose, mas apresentou um acentuado aumento após a terceira dose, os valores mais elevados foram obtidos usando o adjuvante de Freund, mantendo-se até um mês após a última dose (dia 70). Animais imunizados apenas com a proteína Stx2 Δ AB apresentaram baixos títulos de anticorpos específicos durante todo o ensaio alcançando um pico após a quarta dose (1:1331). Com o uso de adjuvantes os títulos de ELISA apresentaram até a terceira dose valores de 1:5498, 1:6323 e 1:3386 para os adjuvantes hidróxido de alumínio, FliCi e LT, respectivamente (Figura 10). A administração de Stx2 Δ AB com adjuvante de Freund (CFA/IFA) resultou nos maiores títulos de anticorpos específicos quando comparados com outros adjuvantes (Figura 10) atingindo o máximo de resposta um mês (dia 70) após a última dose (1:14273),

Na avaliação da persistência dos anticorpos circulantes foram coletados soros dos quatro animais que não foram submetidos ao desafio 60 dias após a última dose (dia 100). Os títulos de anticorpos circulantes nos animais submetidos ao protocolo de imunização ainda eram detectados, porém apresentavam decaimento em todos os grupos testados. O grupo que apenas recebeu a proteína recombinante isolada apresentou título de 1159, nos demais grupos os títulos ficaram em 2065, 2214, 2204, 481 para os adjuvantes LT, Freund, flagelina e hidróxido de alumínio respectivamente.

Figura 10 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos BALB/c imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB combinada ou não a adjuvantes.

Camundongos foram imunizados com 25 μ g de Stx2 Δ AB combinada ou não aos adjuvantes com 4 doses nos dias 0, 14, 28, 42. Amostras de soros foram coletadas um dia antes de cada imunização e outra coleta um mês após a última dose (dia 70). Amostras: ■, Stx2 Δ AB recombinante (n=5); □, STx2 Δ AB recombinante misturada com LT (n=9); ▨, Stx2 Δ AB recombinante misturada com hidróxido de alumínio (n=9); ▩, Stx2 Δ AB recombinante misturada com FliCi (n=9); ▤, Stx2 Δ AB recombinante misturada com adjuvante de Freund (n=9). Os resultados foram obtidos em três ELISAs independentes e os valores representam médias e erros padrão.

Quando analisamos a resposta individual após a quarta dose, percebemos que ocorre homogeneidade da resposta em quase todos os grupos, exceto com o uso do adjuvante de Freund, acreditamos que isto ocorra pela composição da formulação vacinal, sendo esta mais viscosa e, portanto, dificultando a aplicação (Figura 11). Todos os animais imunizados com hidróxido de alumínio e Freund demonstrados na figura foram submetidos ao desafio, enquanto que, apenas 5 animais imunizados com FliCi e LT que apresentaram os maiores títulos, foram submetidos ao desafio.

Os resultados apresentam as médias de cada grupo em linhas horizontais, os soros individuais representam os animais submetidos ao desafio.

4.2.5 Avaliação das subclasses de anticorpos séricos (IgG) de camundongos imunizados com a proteína Stx2 Δ AB.

O perfil de subclasses de IgG nos animais imunizados indicou que camundongos imunizados com Stx2ΔAB e adjuvante de Freund apresentaram uma resposta balanceada, com razão IgG1/IgG2a de 1,37. Animais imunizados com flagelina apresentaram resposta preponderante de IgG1 e razão de 2,21. Já o adjuvante LT apresentou resposta preponderante de IgG2a (razão 0,10). Os menores títulos para as duas subclasses foram obtidos com o uso do hidróxido de alumínio como adjuvante, gerando uma resposta mista (razão de 1,27) (Figura 12).

Figura 12- Resposta sérica das subclasses anti-Stx2 Δ AB obtida em camundongos após a quarta dose (dia 55).

Valores são expressos como média dos soros. Títulos de IgG1 e IgG2a. Resultados são expressos como a média dos valores em ensaios feitos em triplicata com erro padrão.

4.2.6 Determinação da afinidade dos anticorpos ao antígeno Stx2 Δ AB.

Os resultados obtidos indicam que os anticorpos anti-Stx gerados em animais imunizados com os diferentes adjuvantes testados apresentam valores de afinidade semelhantes, porém com os animais imunizados com o adjuvante de Freund, os anticorpos anti-Stx apresentaram menor afinidade ao antígeno alvo (Stx2 Δ AB) (Figura 13). Os valores de concentração molar de tiocianato para separar o 50% o anticorpo do antígeno foram 1,02 M para o soro obtido após imunização com uso da proteína Stx2 Δ AB, 1,04 M, 1,1 M, 1,12 M e 0,65 M para os adjuvantes FliCi, LT, hidróxido de alumínio e adjuvante de Freund respectivamente. O soro policlonal anti-Stx2 produzido em coelho com elevado efeito neutralizante apresentou afinidade à Stx2 Δ AB

semelhante aos anticorpos gerados em camundongos imunizados com flagelina (dados não mostrados).

Figura 13- Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.

Misturas de soros de camundongos imunizados (quarta dose) com Stx2 Δ AB administrada com os diferentes adjuvantes foram testados na presença de diferentes concentrações de tiocianato de amônio. Grupos: ● Stx2 Δ AB proteína recombinante ■ STx2 Δ AB misturada a LT, ▲ Stx2 Δ AB misturada a hidróxido de alumínio, ▼ Stx2 Δ AB misturada a FliCi, ◆ Stx2 Δ AB misturada ao adjuvante de Freund.

4.2.7 Proteção vacinal conferida a desafios com a toxina Stx2.

Os animais imunizados de cada grupo foram desafiados um mês após a última dose pela via intravenosa com 8 x DL₅₀ com lisado da linhagem LDV15 correspondendo a 53 ng por dose e observados diariamente por um mês. O desafio foi feito com 5 animais nos grupos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB, e os adjuvantes LT e FliCi, nos grupos imunizados com os adjuvantes hidróxido de alumínio e Freund o desafio foi realizado em 9 animais, conforme descrito em Materiais e métodos. Os animais imunizados com os adjuvantes FliCi, LT e hidróxido de alumínio sobreviveram no máximo 96 horas, semelhante ao grupo imunizado apenas com a

proteína Stx2 Δ AB, como demonstrado na figura 14. No entanto, o grupo que recebeu o antígeno administrado junto ao adjuvante de Freund apresentou sobrevivência de 77% (sete animais em um total de nove animais) ao final do experimento (Figura 14), os animais sobreviveram por um período de trinta dias, sendo sacrificado após este prazo. Como demonstrado na figura 11 os dois animais não protegidos apresentaram os menores títulos de anticorpos (títulos de 548 e 2182).

Figura 14- Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2 Δ AB com ou sem adjuvante.

Os camundongos foram desafiados um mês após a última dose com extrato total pela via intravenosa a uma dose correspondendo a 53 ng/animal (8 DL₅₀) da toxina Stx2, e sobrevivência foi analisada por 30 dias. Amostras: ●, proteína recombinante Stx2 Δ AB (n=5); ■, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LT (n=5); ▲, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada ao alumínio (n=9); ▼, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à FliCi (n=5); ◆, proteína recombinante misturada ao adjuvante de Freund (n=9).

4.2.8 Ensaios *in vitro* e *ex vivo* de neutralização da toxina Stx2.

Avaliamos a neutralização da toxina Stx2 pelas amostras de soros colhidas de animais imunizados com a Stx2 Δ AB combinada a diferentes adjuvantes em ensaios *in vitro* realizados com células Vero em cultura. Os resultados indicaram que, nas condições testadas, não foi possível demonstrar neutralização de Stx2 com as amostras de soros testadas após a terceira e quarta dose. Apenas o soro controle anti-Stx2 demonstrou neutralização até a diluição (1/4800) validando o ensaio (dados não mostrados). No ensaio *ex vivo*, amostras diluídas (1:10) de soros colhidas dos camundongos imunizados foram incubados com alíquotas da toxina Stx2 e posteriormente, inoculadas em animais não imunizados. Os soros dos animais imunizados com o adjuvante de Freund foram separados em dois grupos: os soros hiperimunogênicos (n=4) com média dos títulos anti-Stx em 1:14102 e os soros (n=3) com valores de título medianos (igual ou inferior a 1:8303). Os animais do primeiro grupo sobreviveram por um mês, sendo sacrificados ao final deste período. No segundo grupo a proteção foi mantida por 168 horas (Figura 15). Amostras de soros colhidas de animais imunizados com os outros adjuvantes combinados à Stx2 Δ AB não conferiram proteção e todos os animais inoculados morreram após 72 horas (Figura 15). Quando utilizamos os soros dos animais imunizados com adjuvante de Freund em uma maior diluição (1/25) não houve proteção (dados não mostrados).

Figura 15 - Ensaio de neutralização *ex vivo* da Stx2 com anticorpos gerados em animais imunizados com Stx2 Δ AB.

Valores representam a sobrevivência dos animais ao desafio com a Stx2 previamente incubada com a mistura de soros obtidos (dia 55) de animais imunizados com a Stx2 Δ AB misturada a diferentes adjuvantes. As amostras de soro foram testadas na diluição final 1:10. Sobrevivência foi monitorada por um mês. Amostras: ●, proteína recombinante Stx2 Δ AB (n=5); ■, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LT (n=5); ▲, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada ao alumínio (n=9); ▼, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à FliCi (n=5); ◆, proteína recombinante misturada ao adjuvante de Freund

4.2.9 Determinação da concentração sérica de uréia após ensaio *ex vivo*.

Níveis de uréia sérica foram determinados em camundongos submetidos ao ensaio *ex vivo*. O aumento dos níveis de uréia no soro é indicativo da disfunção renal causada pela Stx2. Foram coletadas amostras de soro 24 e 48 horas após o ensaio. Os níveis normais de uréia no soro normal foram, em média, 42 mg/dL. As amostras de soros analisadas 24 horas mostraram alterações nos níveis de uréia, os valores encontrados foram de 71 ± 19 , 52 ± 13 , 59 ± 4 , 152 ± 53 para Stx2 Δ AB, Stx2 Δ AB mais FliCi, hidróxido de alumínio e LT respectivamente. Os soros dos animais imunizados com adjuvante de Freund apresentaram valores normais 47 ± 8 (tabela 3). Nos testes usando

os soros coletados com 48 horas os níveis de uréia aumentaram sugerindo um dano renal, os valores encontrados foram de 92 ± 15 , 93 ± 11 , 137 ± 23 , 91 ± 9 para Stx2 Δ AB, Stx2 Δ AB mais FliCi, LT ou hidróxido de alumínio, respectivamente. Animais imunizados com o adjuvante de Freund apresentaram menores níveis de uréia sérica (74 ± 9). Os animais desafiados apenas com a toxina Stx2 apresentaram valores de 94 ± 19 e 154 ± 30 para 24 e 48 horas, respectivamente (tabela 3).

Tabela 3 - Níveis de uréia sérica após desafio com Stx2 incubadas com soros dos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB e adjuvantes.

Uréia sérica mg/dL ^a							
Tempo (h)	Soro normal	Toxina Stx2	Stx2 Δ AB	Stx2 Δ AB + LT	Stx2 Δ AB +FliCi	Stx2 Δ AB +alum	Stx2 Δ AB +Freund
24	44 ± 5	94 ± 19	71 ± 19	152 ± 53	52 ± 13	59 ± 4	47 ± 8 .
48	40 ± 3	154 ± 30	92 ± 15	137 ± 23	93 ± 11	91 ± 9	74 ± 9

^a Níveis de uréia sérica foram analisados em camundongos (n= 3) 24 h e 48 h após o desafio com Stx2 previamente incubada com misturas de soros obtidos dos animais imunizados com proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada com diferentes adjuvantes. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão dos soros testado individualmente em cada grupo de imunização.

4.2.10 Avaliação da produção de anticorpos séricos (IgG) de camundongos imunizados com a proteína Stx2 Δ AB em combinação de adjuvantes.

Ao final da caracterização da resposta imunológica da proteína Stx2 Δ AB, complementamos nossos resultados realizando imunizações com combinação de adjuvantes com o adjuvante incompleto de Freund. O objetivo era verificarmos o efeito sinérgico da resposta imunológica obtida, para isto imunizamos os animais com a mistura de cada adjuvante ao IFA (adjuvante incompleto de Freund). Os resultados

agrupados encontram-se representados nas figuras 16 e 17 que demonstram os resultados dos grupos 1 e 2 (descritos em materiais e métodos) respectivamente.

Como demonstrado na figura 16, os animais imunizados com a mistura de Stx2 Δ AB + LT + IFA apresentaram títulos crescentes até o dia anterior ao desafio (dia 70), apresentando valores de (31831) e (35545) nos dias 55 e 70. Os animais imunizados com o mutante derivado da LT (Stx2 Δ AB + LTK4R + IFA) apresentaram valores menores, porém com aumento após a terceira dose apresentando valores de (17048) e (16435) após a quarta e quinta dose (dia 55 e 70). Os animais imunizados com a flagelina FliCi (Stx2 Δ AB + FliCi + IFA) apresentaram títulos menores dentre os demais grupos, cuja média ficou em (10185) e (12093) após a terceira e quarta dose respectivamente, os animais imunizados apenas com a proteína recombinante apresentaram títulos baixos (454 e 528) nos dias 55 e 70 como nota-se nas figura 16 e 17.

Figura 16 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada a adjuvantes e IFA.

Camundongos Balb/c (Grupo A) foram imunizados com 25 μ g of Stx2 Δ AB ou misturada com adjuvantes com 4 doses nos dias 0, 14, 28, 42. Amostras de soros foram coletadas um dia antes de cada imunização e outra coleta um mês após a última dose (dia 70). Stx2 Δ AB proteína recombinante (n=5), STx2 Δ AB proteína recombinante misturada com LT + IFA (n=5), Stx2 Δ AB proteína recombinante misturada com LTK4R + IFA (n=5), Stx2 Δ AB proteína recombinante misturada com FliCi + IFA (n=5). Os resultados foram feitos a partir de três ELISAs independentes, com erro padrão obtidos a partir da média.

Figura 17 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada a adjuvantes e IFA.

Camundongos Balb/c (Grupo B) foram imunizados como descrito anteriormente. Stx2 Δ AB proteína recombinante (n=5), STx2 Δ AB proteína recombinante misturada com LT + IFA (n=5), Stx2 Δ AB proteína recombinante misturada com LTK4R + IFA (n=5), Stx2 Δ AB proteína recombinante misturada com FliCi + IFA (n=5). Os resultados foram feitos a partir de três ELISAs independentes, com erro padrão obtidos a partir da média.

Com a análise individual podemos notar que houve uma heterogeneidade nos grupos que receberam a toxina LT e seu mutante atóxico, parte desta diferença na resposta pode ser atribuída ao próprio uso do adjuvante incompleto de Freund que por ser muito viscoso dificulta a aplicação. Como demonstrado na figura 18 e 19 alguns animais em ambos os grupos responderam excessivamente, exacerbando a resposta final.

Figura 18- Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).

Os animais representam o Grupo A. Os resultados apresentam as médias de cada grupo em linhas horizontais.

Figura 19- Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).

Os animais representam o Grupo B. Os resultados apresentam as médias de cada grupo em linhas horizontais.

4.2.11 Determinação da afinidade dos anticorpos ao antígeno *Stx2*ΔAB.

Os resultados obtidos indicam que os anticorpos anti-Stx gerados em animais imunizados com adjuvante incompleto de Freund e misturado aos demais adjuvantes apresentam valores de afinidade semelhantes, sendo que a flagelina apresentou valores menores em ambos ensaios independente dos títulos observados, os demais soros apresentaram o perfil de afinidade próximos aos animais imunizados em ensaios anteriores. (Figura 20 e 21).

Figura 20- Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.

Misturas de soros de camundongos imunizados (quarta dose) pertencentes ao Grupo A, com Stx2 Δ AB administrada com os diferentes adjuvantes foram testados na presença de diferentes concentrações de tiocianato de amônio. Amostras: ●, proteína recombinante Stx2 Δ AB; ■, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LT + IFA; □, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LTK4R + IFA; ▼, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à FliCi + IFA.

Figura 21- Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.

Misturas de soros de camundongos imunizados (quarta dose) pertencentes ao Grupo B, com Stx2 Δ AB administrada com os diferentes adjuvantes foram testados na presença de diferentes concentrações de tiocianato de amônio. Amostras: ●, proteína recombinante Stx2 Δ AB; ■, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LT + IFA; □, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LTK4R + IFA; ▼, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à FliCi + IFA.

4.2.12 Desafio com a toxina Stx2.

Após o término das imunizações, os animais foram submetidos ao desafio. Como descrito em Materiais e Métodos os camundongos estavam divididos em dois grupos para receberem doses diferentes da toxina Stx2, a dose de 8 DL₅₀ é semelhante aos desafios descritos nos ensaios anteriores e em trabalhos publicados pelo grupo (GOMES et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Para uma comparação do comportamento dos animais perante um desafio menos agressivo, os camundongos do grupo B receberam a dose 2 DL₅₀. Os animais de cada grupo foram desafiados trinta dias após a última dose.

Nos animais imunizados apenas com a proteína recombinante (Stx2 Δ AB) a sobrevivência ao desafio com a dose (8 DL₅₀) ficou em 72 horas, entretanto como demonstrado na figura 22, os animais do Grupo A que receberam a combinação da proteína recombinante mais o adjuvante LT (Stx2 Δ AB + LT + IFA) ou seu mutante atóxico (Stx2 Δ AB + LTK4R + IFA) apresentaram sobrevivência de 20% por um período de 30 dias, ou seja apenas 1 animal de cada grupo sobreviveu. O grupo imunizado com a flagelina (Stx2 Δ AB + FliCi + IFA) teve um sobrevida maior que o controle (120 horas) (Fig 22).

Os animais do segundo grupo apresentaram um aumento na sobrevivência, o que não é surpreendente, já que o desafio era menos agressivo, a sobrevivência não ultrapassou 120 horas com a dose 2 DL₅₀ para aqueles que receberam apenas a proteína recombinante. Para os animais que receberam a combinação de adjuvantes a sobrevivência foi de um mês, ficando em 75% para os que receberam a proteína LT, e em 60% para os que receberam o mutante LTK4R e a flagelina FliCi como adjuvante, como demonstrado na figura 23.

Figura 22- Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2 Δ AB.

Os animais foram desafiados um mês após a última dose com toxina Stx2 (dia 71) administrada pela via i.v correspondendo a 53 ng/animal (8 x DL₅₀). A sobrevivência foi monitorada pelo período de 30 dias. Amostras: ●, proteína recombinante Stx2 Δ AB; ■, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LT + IFA; □, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LTK4R + IFA; ▼, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à FliCi + IFA.

Figura 23- Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2 Δ AB.

Os animais foram desafiados um mês após a última dose com toxina Stx2 (dia 71) administrada pela via i.v correspondendo a (2 x DL₅₀). A sobrevivência foi monitorada pelo período de 30 dias. Amostras: ●, proteína recombinante Stx2 Δ AB; ■, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LT + IFA; □, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à LTK4R + IFA; ▼, proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada à FliCi + IFA.

4.3 CAPÍTULO 3

4.3.1 Avaliação do papel da conformação da proteína Stx2ΔAB na proteção.

Com o objetivo de confirmarmos o papel da conformação da proteína na proteção, realizamos ensaios de imunização com a proteína desnaturada na concentração de 25 µg, e também testamos a influência apenas do adjuvante IFA em todas as doses. Como controle usamos proteína recombinante Stx2ΔAB sem adjuvante.

Neste ensaio os títulos obtidos no grupo de animais imunizados com a proteína desnaturada e o adjuvante completo/incompleto de Freund (CFA/IFA) atingiram valores elevados até a quarta dose (1: 26863) e nos animais imunizados com a proteína desnaturada usando apenas do adjuvante incompleto de Freund (IFA) os títulos obtidos foram os maiores entre todos (1: 35776) como demonstrado na figura 24, um único animal teve uma resposta extremamente elevada (1:95076) elevando a média dos outros quatro animais (1:27692), este animal foi retirado da representação da figura (Figura 25). Um mês após a última dose os títulos ainda permanecem elevados, no grupo imunizado apenas com a proteína recombinante Stx2ΔAB os títulos permaneceram baixos (1:528) até a última coleta (dia 70).

Com relação aos animais imunizados com a proteína nativa, a resposta imunológica também foi elevada com o uso do adjuvante de Freund (CFA/IFA), na quarta dose (26093), Os animais imunizados apenas com o adjuvante incompleto de Freund (IFA) em todas as doses ficaram com títulos elevados atingindo o valor de 20795 após a quarta dose. Como demonstrado na figura 24 os títulos se mantiveram elevados até 1 mês após a última dose para todos os grupos imunizados com adjuvante de Freund.

Ensaio adicional de imunização foi realizado utilizando 50 µg da proteína na conformação nativa e desnaturada, tratando-se da relevância do adjuvante completo de Freund, na resposta protetora em relação aos demais, este ensaio foi realizado apenas com este adjuvante. O protocolo vacinal se manteve, utilizando o adjuvante completo

na primeira dose e o incompleto nas subsequentes. A figura 26 compara os títulos obtidos após imunização. Na análise individual obtivemos uma maior homogeneidade da resposta no uso da proteína na conformação nativa (Figura 27).

Figura 24- Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com a proteína recombinante Stx2 Δ AB na conformação nativa e desnaturada.

A proteína Stx2 Δ AB foi administrada a camundongos Balb/C na dose de 25 μ g sozinha na conformação nativa ou misturada com adjuvante de Freund na conformação nativa ou desnaturada, ■ Stx2 Δ AB proteína recombinante nativa, ■ Stx2 Δ AB proteína recombinante nativa misturada com adjuvante de Freund completo (1^a dose) e incompleto nas doses subsequentes (Stx2 Δ AB + CFA/IFA), ▨ Stx2 Δ AB proteína recombinante desnaturada administrada com adjuvante de Freund (Stx2 Δ ABd + CFA/IFA), ▤ Stx2 Δ AB proteína recombinante misturada com adjuvante incompleto de Freund em todas as doses (Stx2 Δ AB + IFA), □ Stx2 Δ AB proteína recombinante desnaturada misturada com IFA em todas as doses (Stx2 Δ ABd + IFA). Os resultados foram feitos a partir de três ELISAs independentes com erro padrão obtidos a partir da média sendo demonstrado.

A análise individual dos soros demonstra novamente a heterogeneidade característica da resposta obtida com o uso do adjuvante de Freund em particular um

animal do grupo imunizado com a proteína desnaturada e adjuvante incompleto de Freund apresentou um título muito elevado cujo valor ficou em 95076 este animal foi retirado da representação na figura 25.

Figura 25- Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).

Os animais foram imunizados com 25 µg da proteína Stx2ΔAB na conformação nativa (StxB) ou a na conformação desnaturada (StxBd) misturada a adjuvante de Freund. Os resultados apresentam as médias de cada grupo em linhas horizontais.

Figura 26 - Avaliação da resposta de anticorpos anti-Stx2 Δ AB (IgG sérico) em camundongos imunizados com 50 μ g da proteína recombinante Stx2 Δ AB.

A proteína Stx2 Δ AB foi administrada a camundongos Balb/C na dose de 50 μ g sozinha na conformação nativa ou misturada com adjuvante de Freund na conformação nativa ou desnaturada, no mesmo esquema vacinal descrito acima. □ Stx2 Δ AB proteína recombinante nativa, ▨ Stx2 Δ AB proteína recombinante nativa misturada com adjuvante de Freund, ■ Stx2 Δ AB proteína recombinante desnaturada misturada com adjuvante de Freund. Os resultados foram feitos a partir de três ELISAs independentes com erro padrão obtidos a partir da média sendo demonstrado.

Figura 27- Resposta individual dos camundongos BALB/c após a quarta dose (dia 55).

Os animais foram imunizados com 50 µg da proteína Stx2ΔAB na conformação nativa ou desnaturada misturada a adjuvante de Freund (CFA/IFA). Os resultados apresentam as médias de cada grupo em linhas horizontais.

Os animais imunizados com 50 µg da proteína não sobreviveram ao desafio, nem mesmo com a proteína nativa com adjuvante de Freund, as análises de ensaio *ex vivo* e ureia sérica não foram realizadas, devido aos títulos baixos de anticorpos obtidos.

4.3.2 Avaliação das subclasses de anticorpos séricos (IgG) de camundongos imunizados com a proteína Stx2 Δ AB nativa e desnaturada.

Na avaliação das subclasses, notamos o perfil balanceado de resposta, sendo os valores reprodutivos com as imunizações anteriores realizadas com o adjuvante de Freund juntamente com o antígeno Stx2 Δ AB, este padrão de resposta é independente da conformação da proteína, como demonstrado na figura 28.

Figura 28- Resposta sérica das subclasses anti-Stx2 Δ AB obtida em camundongos após a quarta dose (dia 55).

Títulos de IgG1 e IgG2a para cada grupo de imunização está representado.

4.3.3 Determinação da afinidade do anticorpo ao antígeno alvo.

No teste de afinidade do anticorpo notamos que o padrão se mantém o mesmo, como demonstrado anteriormente, o adjuvante de Freund que apresenta um potencial protetor tem menor afinidade ao antígeno em relação aos demais, neste experimento notamos o mesmo resultado, a menor afinidade encontrada foi utilizando a proteína recombinante na conformação nativa juntamente com a formulação (CFA/IFA) como demonstrado na figura 29

Figura 29- Determinação da afinidade dos anticorpos anti-Stx2 Δ AB ao antígeno.

Misturas de soros de camundongos imunizados (quarta dose) com Stx2 Δ AB administrada com os diferentes adjuvantes foram testados na presença de diferentes concentrações de tiocianato de amônio. ● Stx2 Δ AB proteína recombinante, ◆ Stx2 Δ AB nativa misturada a adjuvante de Freund (CFA/IFA), ◇ Stx2 Δ AB desnaturada misturada ao adjuvante de Freund (CFA/IFA), ■ Stx2 Δ AB nativa misturada ao adjuvante incompleto de Freund (IFA), □ Stx2 Δ AB desnaturada misturada ao adjuvante incompleto de Freund.

4.3.4 Desafio com a toxina Stx2.

Um mês após a quarta dose os animais foram submetidos ao desafio da mesma maneira que os ensaios relatados anteriormente, ou seja, a dose usada foi o de 8 DL₅₀. No ensaio de desafio a sobrevivência dos animais imunizados com o adjuvante completo de Freund na primeira dose e incompleto nas subsequentes (Stx2ΔAB + CFA/IFA) ficou em 60% usando a proteína na conformação nativa. O uso do adjuvante incompleto de Freund em todas as doses com a proteína na conformação nativa também apresentou uma sobrevivência de 40% (Stx2ΔAB + IFA).

Nos demais animais imunizados com a proteína na conformação desnaturada não houve proteção em nenhum grupo de adjuvante, não sobrevivendo por um período superior a 96 horas, como demonstrado na figura 30.

Figura 30- Proteção a desafio letal com Stx2 em animais imunizados com Stx2ΔAB.

Os animais foram desafiados um mês após a última dose com toxina Stx2 (dia 71) administrada pela via i.v correspondendo a 53 ng/animal (8 x DL₅₀). A sobrevivência foi monitorada pelo período de 30 dias ● Stx2ΔAB proteína recombinante, ◊ Stx2ΔAB nativa misturada a adjuvante de Freund (CFA/IFA), ○ Stx2ΔAB desnaturada misturada ao adjuvante de Freund (CFA/IFA), ■ Stx2ΔAB nativa misturada ao adjuvante incompleto de Freund (IFA), □ Stx2ΔAB desnaturada misturada ao adjuvante incompleto de Freund.

4.3.5 Ensaios *ex vivo* de neutralização da toxina Stx2.

Neste experimento também houve proteção, sendo que os animais (n=3) tratados com o soro do grupo imunizado com a proteína nativa e o adjuvante de Freund (CFA/IFA) sobreviveram por dez dias e o uso apenas do adjuvante incompleto de Freund (IFA) também prolongou a sobrevivência dos animais. No ensaio usando a proteína desnaturada a sobrevivência não durou mais que 72 horas. (Figura 31).

Figura 31 - Ensaio de neutralização *ex vivo* da Stx2 com anticorpos gerados em animais imunizados com Stx2 Δ AB.

Valores representam a sobrevivência dos animais ao desafio com a Stx2 previamente incubada com a mistura de soros obtidos de animais imunizados com a Stx2 Δ AB e adjuvante completo e incompleto de Freund. As amostras de soro foram testadas na diluição final 1:10. Sobrevivência foi monitorada diariamente. ● Stx2 Δ AB proteína recombinante, ◆ Stx2 Δ AB nativa misturada a adjuvante de Freund (CFA/IFA), ◇ Stx2 Δ AB desnaturada misturada ao adjuvante de Freund (CFA/IFA), ■ Stx2 Δ AB nativa misturada ao adjuvante incompleto de Freund (IFA), □ Stx2 Δ AB desnaturada misturada ao adjuvante incompleto de Freund.

4.3.6 Determinação da concentração sérica de uréia após ensaio ex vivo.

Os valores obtidos nos teste *ex vivo* usando a proteína desnaturada também apresentaram alteração, com os valores após 48 horas de 111 ± 18 e 118 ± 14 para o grupo com adjuvante completo/incompleto (CFA/IFA) e apenas incompleto (IFA) respectivamente. Os animais imunizados com a proteína nativa e adjuvante incompleto apresentaram valores mais baixos 47 ± 3 e 76 ± 16 , para 24 e 48 horas respectivamente. (tabela 4).

Tabela 4 - Níveis de uréia sérica após desafio com Stx2 incubadas com soros dos animais imunizados com a proteína Stx Δ AB e adjuvantes.

Uréia sérica mg/dL ^a							
Tempo (h)	Soro normal	Toxina Stx2	Stx2 Δ AB	Stx2 Δ AB +CFA/IFA	Stx2 Δ ABd +CFA/IFA	Stx2 Δ AB + IFA	Stx2 Δ ABd +IFA
24	44 $\pm$ 5	72 $\pm$ 11	71 $\pm$ 4	67 $\pm$ 5.	85 $\pm$ 7	47 $\pm$ 3	46 $\pm$ 2
48	40 $\pm$ 3	102 $\pm$ 21	103 $\pm$ 8	70 $\pm$ 4	111 $\pm$ 18	76 $\pm$ 16	118 $\pm$ 14

^a Níveis de uréia sérica foram analisados em camundongos (n= 3) 24 h e 48 h após o desafio com Stx2 previamente incubada com misturas de soros obtidos dos animais imunizados com proteína recombinante Stx2 Δ AB misturada com diferentes adjuvantes. Valores representam a média $\pm$ desvio padrão dos soros testado individualmente em cada grupo de imunização.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho descreve pela primeira vez o uso de uma vacina de DNA em combinação com linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis* para a expressão de formas atóxicas da Stx como veículo vacinal, apesar do regime de “prime-boost” já ter sido descrito, utilizando *Salmonella* recombinante como estímulo e proteína recombinante como reforço (GU et al., 2011), o antígeno utilizado era composto pela subunidade B da Stx e outras proteínas do aparato secretor TTSS fusionadas a ela.

Ao contrário do que esperávamos o regime vacinal do tipo “prime-boost” testado no início do doutorado, demonstrou que apesar da melhora nos níveis de anticorpos, estes não se mostraram protetores e não houve diferença significativa nos ensaios em que usava o vetor pCDNA vazio em relação aos ensaios em que se utilizavam o vetor pStx2 Δ AB como primeiro estímulo e adicionalmente a isto, os maiores níveis de anticorpos foram obtidos a partir da quarta dose quando usamos o vetor vacinal pStx2 Δ AB com a linhagem vegetativa de *B. subtilis* albergando o vetor episomal vazio. O potencial dos esporos de *B. subtilis* em estimular o sistema imunológico já é conhecido (DUC et al., 2003, 2004), mas não há nada descrito em relação ao uso de células vegetativas. O mesmo ocorreu com o uso do vetor pCDNA vazio sendo possível obter bons títulos com células vegetativas e esporos da linhagem LDV4 na quarta e quinta dose respectivamente.

Após o uso de plasmídeos, tanto expressando a Stx2 Δ AB quanto o vazio, só foi possível observar uma diferença a partir da quarta e quinta dose. Portanto apenas duas doses da vacina de DNA, não sejam suficientes para estimular eficientemente o sistema imunológico, principalmente neste ensaio em que a linhagem vacinal de *B. subtilis* apresenta um nível de expressão baixo. Baseado em prévios trabalhos realizados em nosso laboratório (GOMES et al, 2009; ROJAS et al, 2010) e em outros grupos de pesquisa (SU et al., 1992; ACHESON et al., 1996; BUTTERTON et al., 1997) o uso de bactérias recombinantes como estratégia vacinal contra a SHU aparenta ser algo extremamente complicado, pois com os sistemas de expressão

utilizados, como em *B. subtilis* e *S. Typhimurium*, levam ao acúmulo da proteína recombinante no citoplasma, a ausência de efeito protetor frente à toxina nativa pode ser facilmente explicada pela não geração de anticorpos neutralizantes direcionados a epítopos conformacionais localizadas na superfície da toxina nativa.

Nas últimas três décadas muitos surtos e casos esporádicos de infecções por STEC impulsionaram esforços para diretamente minimizar ou eliminar a ameaça deste organismo à saúde pública. Na tentativa de encontrar uma vacina ou imunoterapia para controle da SHU, muitos obstáculos foram encontrados principalmente no combate a toxina Stx2 que sabidamente é mais tóxica e demonstra-se mais desafiadora, como contribuição a busca de uma estratégia de controle destacam-se os trabalhos realizados pelo nosso grupo. Em uma segunda parte do doutorado, damos continuidade a nossa pesquisa na produção de uma vacina segura, quimicamente definida e efetiva no combate a SHU. O antígeno composto pela subunidade B e o peptídeo atóxico A2 (Stx2 Δ AB) foi explorado como proteína purificada ampliando o conhecimento do potencial vacinal previamente caracterizado pelo grupo de diferentes maneiras, como vacina de DNA (BENTANCOR et al., 2009) e bactérias recombinantes (ROJAS et al., 2010). Portanto a maior contribuição de nosso trabalho é representada pela utilização do fragmento Stx2 Δ AB em uma vacina de subunidade em associação, nunca antes caracterizada, ao uso de adjuvantes promissores e a confirmação da relevância do estado conformacional na proteção.

O maior empecilho na utilização da toxina Stx2 como antígeno vacinal recai principalmente na dificuldade de obtenção de toxóides. Vários trabalhos ao longo da década de 90 foram publicados focando na obtenção da toxina de Shiga, tanto a nativa quanto a subunidade B. Muitos problemas relacionados aos processos de purificação eram sanados utilizando várias técnicas para obtenção do toxóide, tornando a produção um processo dispendioso e pouco eficiente (GUNZER e KARCH, 1993, AUSTIN e HOVDE, 1995, ACHESON et al., 1995, DONOHUE-ROLFE et al., 1989, CALDERWOOD et al., 1990, MARCATO et al., 2001). O estabelecimento de um sistema heterólogo de superexpressão do fragmento Stx2 Δ AB pelo nosso grupo transpõe esta barreira, pois foi possível obter em apenas uma etapa quantidades apreciáveis da proteína Stx2 Δ AB com excelente grau de pureza. A proteína

apresentou-se na forma solúvel, facilitando o processo de purificação e a inserção do fragmento A2 não atrapalhou o processo. O bom rendimento e a facilidade de obtenção minimizam os custos na produção do toxóide vacinal, o uso da linhagem BL21(DE3) pLysS é interessante, pois esta possui a capacidade de produção da lisozima, enzima que também atua na RNA polimerase, (SAMBROOK et al., 2001), controlando, dessa forma, a expressão exacerbada de proteínas que mostram-se tóxicas para célula, a escolha da linhagem certa para a obtenção da proteína heteróloga pode ser responsável pela melhora na solubilidade, validando a utilização do antígeno em futuras pesquisas.

A funcionalidade da proteína recombinante foi validada ao verificarmos sua capacidade de ligação a receptores Gb3, após o processo de desnaturação a subunidade B perdeu o potencial de ligação ao receptor, demonstrando que o processo de purificação empregado preserva as características funcionais da proteína. Adicionalmente a comprovação da antigenicidade era fundamental para ratificarmos o imunógeno, portanto confirmamos que os anticorpos obtidos dos animais imunizados foram capazes de reconhecer a subunidade A da holotoxina, juntamente com a subunidade B, este dado é uma indireta evidência da presença da subunidade A na proteína recombinante, e semelhante ao demonstrado com a vacina de DNA descrita previamente (BENTANCOR et al., 2009). A deleção da subunidade tóxica A1 mantém a segurança da nossa vacina e a adição do fragmento A2, juntamente com a subunidade B, justifica-se pelas evidências prévias de uma maior imunogenicidade da subunidade A (BIELASZEWSKA et al., 1997, ISHIKAWA et al., 2003). Da mesma forma, reações protetoras cruzadas contra a Stx1 e variantes como Stx2c podem ser obtidas com a subunidade A (BIELASZEWSKA et al., 1997). Por fim a demonstração de que a sequência A2 engloba os epítomos imunogênicos, como sugerido previamente (BENTANCOR et al., 2009), após análise no programa de predição de epítomos baseados na estrutura da Stx2, apoia a decisão de continuarmos a explorar este imunógeno como uma vacina proteica.

A próxima etapa do trabalho foi quantificar a resposta de anticorpos obtidos e qualificá-los quanto ao seu potencial neutralizante. O aumento na resposta de anticorpos foi mais expressivo com o uso do adjuvante de Freund, atingindo pico na

terceira dose e se mantendo elevada até um mês após a última dose, ficando evidente pelos elevados índices de IgG totais obtidos. Sabe-se que o principal mecanismo de ação do adjuvante de Freund é a formação de depósito no local da inoculação, promovendo a liberação gradativa do antígeno e estimulando as células produtoras de anticorpos. Entretanto forte reação local é observada com a formação de granulomas, restringindo seu uso em humanos (GUPTA e SIBER, 1995). Tal reação pode ser um fator diferencial em favor da neutralização observada em relação aos demais adjuvantes testados em nosso ensaio, a resposta inflamatória local, neste caso, pode contribuir positivamente.

A persistência da resposta foi fundamental para a proteção, pois os níveis de anticorpos circulantes nos grupos protegidos mantiveram-se elevados no momento do desafio. Outro fator interessante foi verificar que os títulos de anticorpos obtidos correlacionaram com os títulos neutralizantes em ensaios de desafio. A observação dos animais mortos após desafio no grupo imunizado com adjuvante de Freund demonstra que, nesses animais os anticorpos circulantes atingiram baixos índices em relação aos demais, ficando abaixo de limiar de neutralização, níveis semelhantes aos animais imunizados com os demais adjuvantes. Portanto os animais que apresentaram os maiores índices de anticorpos circulantes e persistentes foram capazes de neutralizar a toxina Stx2 e consequentemente sobreviver por mais tempo. A proteção parcial obtida apenas com o uso do adjuvante incompleto de Freund demonstra que a formulação oleosa já possui potencial protetor, isto é relevante para contrapor aos efeitos indesejáveis do uso da formulação com adjuvante completo e promissor. Adicionalmente uma resposta balanceada aprimora níveis protetores obtidos, pois ao analisarmos as subclasses, notamos que os títulos de IgG1 e IgG2a também foram elevados, esta resposta balanceada coincide com trabalho anterior usando o mesmo adjuvante (GUPTA et al., 2011), contribuindo no diferencial protetor obtido com o uso do adjuvante de Freund em relação aos demais. Apesar da combinação do IFA com outros adjuvantes, não superar o adjuvante completo de Freund, serviu para melhorar a resposta protetora dos adjuvantes Flagelina e LT, que sem a presença do IFA não conferiram proteção.

Os elevados títulos obtidos com a proteína fervida, demonstram que o aquecimento não interferiu na produção de anticorpos pelos linfócitos B, no entanto, o dado importante obtido neste estudo foi a demonstração que a correta conformação da proteína é necessária para obtenção de anticorpos neutralizantes. Até o momento poucos trabalhos na literatura relataram este fato, sendo eles conflitantes, pode-se supor as diferenças metodológicas sejam a causa. Entretanto no presente trabalho mostramos que a desnaturação da proteína não só afeta seu potencial de ligação ao receptor Gb3 como também altera negativamente seu potencial protetor. De fato trabalhos anteriores realizados com a toxina de Shiga produzida por *Shigella* usando peptídeos sintéticos abrangendo as porções de maior hidrofobicidade tanto na região N e C terminal demonstraram proteção frente à holotoxina (HARARI et al., 1988,1990). Em outro trabalho, também utilizando peptídeos sintéticos lineares cobrindo toda a sequência da Stx1, sugeriu-se que os epítomos determinantes para a proteção são conformacionais, adicionalmente, neste mesmo trabalho, a natureza do epítopo reconhecido pelo anticorpo monoclonal MAb 13C4, específico para a subunidade B da Stx e Stx1, foi identificada, concluindo que a montagem adequada da subunidade B é fundamental para neutralização por este anticorpo (BOYD et al., 1991, SMITH et al., 2006). Portanto nossos resultados contribuem para caracterizar o potencial protetor da subunidade B pentamérica da toxina Stx2, destacando a relevância da correta montagem para a proteção, contribuindo para futuros estudos voltados para uma vacina contra um antígeno multimérico como a subunidade B da toxina Stx.

O alúmen também promove a formação de depósito do antígeno no local, porém seu papel na adjuvanticidade ainda não está bem esclarecido (DE GREGORIO, et al., 2008). Apesar de quase um século de uso, resultados para explicar sua função ainda são conflitantes e muitas variáveis devem ser consideradas, como adsorção, via de administração, o antígeno utilizado e concentração ótima do adjuvante. Esta última é dependente da formação do agregado alúmen-antígeno que, para alguns antígenos como diftérico e tetânico, é fundamental para a geração da resposta imunológica (GUPTA e SIBER, 1995). Porém, no caso da toxina Stx2 Δ AB a quantidade utilizada ou a formação do agregado pode não ter sido ótima, refletindo nos baixos níveis de anticorpos obtidos e conseqüentemente a falta de proteção.

A sobrevivência nos ensaios *ex vivo* caracteriza o potencial terapêutico da vacina. A incubação prévia da toxina Stx2 com os soros de maiores títulos levou sobrevivência mais duradoura dos camundongos não imunizados. Esse resultado ilustra o fato que, após uma infecção, faz-se necessária a administração de soros hiperimunogênicos para conter o agravamento da doença. Devem ser destacadas as diferenças desse ensaio em relação ao teste de desafio em animais imunizados, pois fica evidente que conforme os títulos são menores a duração da proteção também diminui no ensaio *ex vivo*. Com animais imunizados e com uma resposta montada a reação protetora mostra-se mais eficiente em comparação ao ensaio *ex vivo*. Ao compararmos os valores dos níveis séricos de uréia, obtivemos um resultado adicional de preservação da funcionalidade dos rins, principal alvo da Stx, cujos valores permaneceram próximos aos normais (SAUTER et al., 2008, BRANDO et al., 2008). A diferença de proteção nos resultados encontrados *in vitro*, em que não foi possível observar neutralização também foi demonstrada em trabalho anterior (LUDWIG et al., 2002). Isto pode ser explicado pela maior sensibilidade das células Vero aos efeitos citotóxicos da toxina de Shiga.

Quando comparamos os títulos de IgG anti-Stx2 Δ AB com os títulos neutralizantes, notamos que uma menor fração dos anticorpos obtidos efetivamente se liga e inativa a toxina nativa, fato que explica a necessidade de utilizarmos diluições muito baixas para obtermos neutralização, aspecto já observado anteriormente (HARARI et al., 1988; BENTANCOR et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Da mesma forma, estudo anterior comparando os soros obtidos após a imunização da toxina Stx1B e Stx2B, a diluição do anticorpo empregada no teste neutralização em um ensaio *ex vivo* foi menor para Stx2 em relação a Stx1, sendo que os títulos de IgG totais eram semelhantes (GAO et al., 2009). Esses dados revelam a dificuldade em se obter anticorpos com potencial neutralizante para Stx2 em comparação com a Stx1. Interessantemente GU e colaboradores (2009), obtiveram resultado de proteção diferente após desafio com a toxina Stx2, apesar de os animais apresentarem os mesmos títulos.

A dificuldade na obtenção de uma vacina eficaz para o controle da SHU enfatiza a relevância pela busca de novos adjuvantes vacinais, principalmente contra a toxina

Stx2, dado seu papel no agravamento da doença (BIELASZEWSKA et al., 1997, TESH et al., 1993, FRIEDRICH et al., 2002, WADOLKOWSKI et al., 1990, EKLUND et al., 2002; BYUN et al., 2001, MARCATO et al., 2001, 2005, GAO et al., 2009). Considerando a importância que os adjuvantes apresentam em formulações vacinais, principalmente de derivados proteicos que normalmente são pouco imunogênicos, demonstramos a importância de testarmos novos adjuvantes. Após os resultados obtidos com o uso do adjuvante de Freund, optamos por explorar outros adjuvantes bem caracterizados em nosso laboratório, toxina LT (LASARO et al., 2009) e flagelina FliCi. Esses adjuvantes induziram títulos de anticorpos séricos anti-Stx inferiores aos obtidos com o uso de Freund, refletindo na ausência de proteção. Existem relatos do uso dos adjuvantes LT e CT para a indução e anticorpos neutralizantes para a toxina de Shiga (Stx2 e Stx1) (IMAI et al., 2001, BYUN et al., 2001, TSUJI et al., 2008). No entanto, nossos resultados contrapõem aos obtidos anteriormente, a via de administração escolhida em nosso trabalho pode ter influenciado a resposta imunológica, pois a toxina LT é caracterizadamente um excelente adjuvante de mucosa (O'HAGAN et al., 2001, FREYTAG e CLEMENTS, 2005), o que poderia refletir no potencial neutralizante dos anticorpos obtidos.

Resultados conflitantes descritos na literatura atrapalham a comparação do papel adjuvante da LT para Stx. Tsuji e colaboradores (2008) detectaram anticorpos protetores em animais imunizados pela via nasal utilizando um mutante da toxina termo-lábel como adjuvante. Neste mesmo ensaio, anticorpos anti-Stx2B apresentaram neutralização cruzada contra Stx1. Entretanto em um ensaio comparativo, realizado por outro grupo, os resultados obtidos pela via nasal com a subunidade B da Stx1 se mostraram promissores, porém foram decepcionantes com relação aos anticorpos séricos e de mucosa utilizando a subunidade B de Stx2, mesmo alternando para a via subcutânea (BYUN et al., 2001). Sabe-se que a escolha da via correta é fundamental para obtenção de bons resultados e, como comentado, a escolha da via subcutânea para uso da LT como adjuvante demonstra não ser promissora, especialmente para a toxina Stx2. Adicionalmente os elevados níveis de anticorpos IgG2a obtidos, característicos de uma resposta Th1, tipicamente celular, não são os mais adequados para combater um imunógeno derivado de uma toxina que circula livremente na

corrente sanguínea, uma resposta tipo Th2 é a mais recomendada, esse fato compromete o uso da LT em futuros trabalhos no combate a SHU.

Outro adjuvante de escolha foi a flagelina, seu potencial adjuvante fora caracterizado em nosso laboratório apresentando bons resultados (BARGIERI et al., 2008, 2010, BRAGA et al., 2009). Porém, em nossos ensaios, o grupo de camundongos imunizados com a flagelina FliCi recombinante apresentou pequeno aumento em comparação ao uso apenas da proteína recombinante Stx2 Δ AB. Os primeiros experimentos testando o potencial adjuvante da flagelina para Stx foram realizados em nosso laboratório usando linhagens atenuadas de *S. Typhimurium* expressando intracelularmente o mesmo fragmento, como veículo oral. Apesar da via de administração ser diferente, o presente resultado corrobora resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo, no qual linhagens não flageladas apresentaram o mesmo efeito adjuvante de linhagens flageladas (ROJAS et al., 2010). Portanto fica evidente que a flagelina falhou em potencializar a resposta imunológica para a Stx2 Δ AB. Apesar de nossos resultados não serem promissores, representam as primeiras tentativas em testar o papel da flagelina como adjuvante vacinal contra a toxina de Shiga, ampliando o conhecimento sobre os efeitos adjuvantes da flagelina associada com a Stx.

A afinidade ao antígeno dos anticorpos obtidos após uso do adjuvante de Freund foi menor que aqueles gerados em animais imunizados com outros adjuvantes. Os resultados indicam que não há relação entre a afinidade dos anticorpos ao antígeno e efeito neutralizante contra Stx. Essa conclusão foi suportada pelo comportamento do soro anti-Stx gerado em coelho imunizado com a holotoxina e com alto potencial neutralizante. Em trabalhos anteriores o papel da afinidade com a funcionalidade dos anticorpos havia sido mencionada como possível causa para melhora na proteção (BENTANCOR et al., 2009). Os resultados demonstrados em nossa pesquisa demonstram claramente que a afinidade dos anticorpos à toxina não tem relação com a atividade neutralizante. Títulos elevados obtidos juntamente com a longevidade da resposta que ainda mantinha-se alta no dia anterior ao desafio, característica apenas observada com o uso do adjuvante de Freund foram determinantes para obtenção da proteção, portanto a neutralização está diretamente relacionada com títulos elevados de anticorpos circulantes.

Nesse trabalho, testamos diferentes adjuvantes combinados à Stx2ΔAB na tentativa de gerar anticorpos neutralizantes capazes de conferir proteção aos efeitos letais da toxina. Nossos resultados obtidos com adjuvante de Freund mostraram-se bastante promissores, pois valida o antígeno para utilização em futuras pesquisas em formulações vacinais no combate a SHU e enfatiza a necessidade de apropriada montagem para a neutralização. Nossa construção gerou proteção validando seu potencial imunoterápico e seu futuro uso como vacina de subunidade. Demonstramos que três doses são suficientes para se atingir valores máximos de proteção mediada por anticorpos. A proteção mostrou estar relacionada aos títulos elevados de anticorpos circulantes, mas não com a afinidade. A vacina de DNA assim como a utilização de *S. Typhimurium* recombinante apesar de serem promissoras, não superaram os atuais índices e duração de proteção obtida quanto aos descritos neste presente trabalho. Nossos resultados contribuem, portanto, para a validação do modelo e complementa os trabalhos anteriores descritos pelo grupo. Obter uma resposta protetora e duradoura contra a subunidade B da toxina Stx, apesar de desafiante, foi alcançada em nosso trabalho abrindo perspectivas para novas formulações vacinais tais como, combinação de adjuvantes mais adequados para o uso em humanos.

6 CONCLUSÃO

As conclusões obtidas neste trabalho são:

- I) O protocolo do regime vacinal “prime-boost” não apresentou o efeito desejado em potencializar as respostas já obtidas com a vacina de DNA ou *B. subtilis* separadamente.
- II) Foi possível obter a proteína Stx2ΔAB com características funcionais e imunológicas preservadas.
- III) A imunidade protetora foi obtida após imunização com adjuvante de Freund correlacionando com os títulos de anticorpos anti- Stx2ΔAB.
- IV) A substituição do componente tóxico do CFA por outros adjuvantes mostraram imunidade protetora para desafios menos restritivos.
- V) A imunidade protetora conferida pelos anticorpos é dependente da conformação correta da Stx.

6.1 Conclusões gerais

A proteína Stx2ΔAB representa uma alternativa promissora para o desenvolvimento de estratégias vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica.

7 PERSPECTIVAS

Novas formulações podem ser testadas a partir do antígeno Stx2ΔAB, alterações na dose e no uso de novos adjuvantes combinados ao IFA podem ser explorados, assim como, combinações de estratégias vacinais, tipo “prime-boost”. Os resultados obtidos abrem perspectivas interessantes para o desenvolvimento de novos procedimentos profiláticos e terapêuticos frente aos sintomas associados à SHU.

8 REFERÊNCIAS

ACHESON, D. W. K. et al. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. **Infect. Immun.**, v 63, p. 301-308, 1995.

AUSTIN, P. R. e HOVDE, C. J. Purification of recombinant Shiga-like toxin type I B subunit. **Protein Expr. Purif.** v. 6, p. 771-779, 1995.

BANATVALA N., GRIFFIN P.M., GREENE K.D. et al. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: Microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. **J. Infect. Dis.** v. 183, p. 1063–1070, 2001.

BARGIERI, D. Y. et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagelin. **Vaccine**, v. 26. p. 6132-6142, 2008.

BARGIERI, D. Y. et al. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella Typhimurium. **Vaccine**, v. 16. p. 2818-2826, 2010

BAST, D. J. et al. Toxicity and immunogenicity of a verotoxin 1 mutant with reduced globotriaosylceramide receptor binding in rabbits. **Infect. Immun.**, v 65(6), p. 2019-2028, 1997.

BAUWENS, A. et al. Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. **Thromb. Haemost.**, v. 105(3), p. 515-528, 2011.

BENTANCOR, L. V. et al. DNA vector encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Shiga-like toxin 2 (Stx2) A₂ and B subunits confers enhanced immunogenicity and protective immunity to Stx challenge in the murine model. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 16, p. 712-718, 2009.

BIELASZEWSKA, M. et al. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2509-2516, 1997.

BOYD , B., RICHARDSON, S., GARIÉPY, J. Serological response to the B subunit of Shiga-Like Toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter the action of the toxin. **Infect. Immun.** v. 59, p. 750-757, 1991.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRAGA, C. J. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagelin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1700-1707, 2009.

BRANDO, R. J. F. et al. Renal damage and death in weaned mice after oral infection with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* strains. **Clin. Exp. Immunol.** v. 153, p. 297–306. 2008.

BUTTERTON, J.R. et al. Coexpression of the B Subunit of Shiga toxin 1 and EaeA from enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Vibrio cholerae* vaccine strain. **Infect Immun.**, v. 65, p. 2127-2135, 1997.

BYUN, Y. et al. Nasal immunization with *E. coli* Verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 19, p.2061-2070, 2001.

CALDERWOOD, S. B. et al. A system for production and rapid purification os large amouts os Shiga toxin/Shiga like toxin 1B subunit. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 2977-2982, 1990.

CAI, K. et al. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Vaccine**, v. 29, p. 946-952, 2011.

CAPOZZO, A. et al. Development of DNA vaccines against Hemolytic Uremic Syndrome in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3971-3978, 2003

CAPRIOLI, A. et al., Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.** v. 36, p. 289-311, 2005.

DE GREGORIO, E., TRITTO, E., RAPPUOLI, R. Alumen adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. **Eur. J. Immunol.** v. 38, p. 2068-2071, 2008.

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

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

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

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

EKLUND, M., LEINO, K., SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. **J. Clinical Microbiol.** v. 40, p. 4585-4593, 2002.

EXENI R. Síndrome Urémico Hemolítico. **Arch. Latin. Nefr. Ped.** v. 1, p. 35-56. 2001.

FRANKEL, G. et al. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta (1) integrins. **J Biol Chem.** v. 271, p. 20359–20364, 1996.

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

FREYTAG, L. C. e CLEMENTS, J. D. Mucosal adjuvants. **Vaccine.** v. 23, p. 1804-13, 2005.

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

GAO, X. et al. Immunogenicity of a novel Stx2B-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Vaccine.** v. 27, p. 2070-2076, 2009.

GASSER, C., GAUTIER, E., EHECK, A. Hemolytisch-uramische syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen Anamien. **Schweiz Med Wochenschr** v. 85, p. 905-909, 1955.

GIANANTONIO, C. A. et al. The hemolytic—uremic syndrome. **J. Pediatr.** v. 54, p. 478-491. 1964.

GOMES, P. A. D. P. et al, Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Brazilian Journal Microbiol.** v.40, p. 332-337, 2009.

GU, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalente recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. **Microbes Infect.** v.11, p. 835-841, 2009.

GU, J. et al. Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. **Vaccine.** v. 29, p. 7395-7403, 2011.

GUPTA, R. K. e SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13(14), p. 1263-1276, 1995.

GUPTA, R.K. et al. Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**. v. 11, p. 293-306, 1993.

GUPTA, P. et al. Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. **Vaccine**. v. 29, p. 8094-8100, 2011.

GUNZER, F. e KARCH, H. Expression ao A and B subunits of shiga-like toxin II as fusion with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology. **J. Clin. Microbiol.** v. 31 (10), p. 2604-2610, 1993.

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

HARARI, I. e ARNON, R.; Carboxi-terminal peptides from the B subunit of Shiga toxin induce a local and parenteral protective effect. **Mol. Immunol.**, v. 27(7), p. 613-21, 1990.

HUSSEIN, H.S.Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. **J. Anim. Sci.** v. 85, p. 63-72. 2007.

HACKER, J. et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.** v. 23, p. 1089–1097, 1997.

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

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

JEONG, K., TZIPORI, S., SHEORAN, A. S. Stx2- but not Stx1-specific human monoclonal antibody protects piglets challenged with enterohemorrhagic *Escherichia coli* producing Stx1 and Stx2. **J. Infect. Dis.** v. 201(7), p. 1081–1083. 2010.

JOHANNES, L. e ROMER, W. Shiga toxin – from cell biology to biomedical applications. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 8, p. 105-116, 2010.

KAPLAN, B. S., CHESNEY, R. W. , DRUMMOND, K. N. Hemolytic uremic syndrome in families. **N. Engl. J. Med.** v. 292, p. 1090–1093. 1975.

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

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

KARMALI, M. A. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 2, p. 15-38. 1989.

KARMALI, M. A. Prospects for Preventing Serious Systemic Toxic Complications of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* using Shiga toxin Receptor Analogues. **J. Infectious Diseases**. v. 189, p. 355-359, 2004.

KIMURA, T. et al. Development of humanized monoclonal antibody TMA-15 which neutralizes Shiga toxin 2. **Hybrid Hybridomics**. v. 21(3), 161-168, 2002.

KING, A. J. Acute inflammation in the pathogenesis of hemolytic-uremic syndrome. **Kidney International**. v. 61, p. 1553-1564. 2002.

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

LASARO, M. A. et al. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 55(1), p. 93-9. 2009.

LÓPEZ, E. L. et al. Safety and pharmacokinetics of Urtoxazumab, a Humanized Monoclonal Antibody, against Shiga-Like Toxin 2 in Healthy Adults and in Pediatric Patients Infected with Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 54(1), p. 239-243. 2010.

LOUISE, C. B.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated Hemolytic Uremic Syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, Interleukin-1 β , and Tumor Necrosis Factor Alpha on human vascular endothelial cells *in vitro*. **Infect. Immun.** v. 59, p. 4173-4179, 1991.

LOUISE, C. B.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated Hemolytic Uremic Syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin and Lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells *in vitro*. **Infect. Immun.** v. 60, p. 1536-1543, 1992.

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

LUKYANENKO, V. et al. Enterohemorrhagic infection stimulates Shiga toxin 1 macropinocytosis and transcytosis across intestinal epithelial cells. **Am. J. Physiol Cell Physiol.** v. 301, p. 1140-1149. 2011.

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

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

MATUSSEK, A. et al. Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cell. **Blood.** v. 102(4), p. 1323-1332, 2003.

MATISE, I. et al. Intervention with Shiga Toxin (Stx) Antibody after Infection by Stx-Producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** v.183, p. 347–350, 2001.

MCNEILLY, T. N. et al. Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. **Vaccine.** v. 28, p. 1422–1428, 2010.

MOXLEY, R. A. et al. *Escherichia coli* O157:H7 Vaccine Dose–Effect in Feedlot Cattle. **Foodborne Pathog. Dis.** v. 6,(7), p. 879-884, 2009.

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

O'BRIEN, A.D. et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colits in the United States produce a *Shigella dysenteriae* I (SHIGA) like cytotoxin. **Lancet.** v.1, p. 702, 1983.

O'BRIEN, A.D. e HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-Like Toxins. **Microbial Rev.** v. 51, p. 206-220, 1987,

OBRIG, T. G. *Escherichia coli* Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease. **Toxin.** v.2, p. 2769-2794, 2010.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.** v. 127(1-2), p. 139-146. 2008.

O'HAGAN, D. T., MACKICHAN, M. L., SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomol. Eng.** v. 18, p. 69-85, 2001

ORTH, D. et al. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin *in vitro* correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 59(3), p. 235-242. 2007.

PATON, J. C e PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11(3), p. 450-479. 1998.

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(3), p. 265-270. 2000.

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

PETERSON, R. E. et al. Efficacy of Dose Regimen and Observation of Herd Immunity from a Vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 for Feedlot Cattle. **J. Food Prot.** v. 70 (11), p. 2561–2567, 2007

PETRUZZIELO-PELEGRINI, T. N. e MARSDEN, P. A. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome: advances in pathogenesis and therapeutics. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** v 21 (4), p. 433-440, 2012.

RILEY, L. W. et al. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.** v. 308, p. 681–685. 1983.

ROBINSON, C. M. et al. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. **PNAS.** v. 20, p. 9667-9672. 2006.

ROJAS, R. L. G. et al, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains expressing a nontoxic Shiga-Like toxin 2 derivative induce partial protective immunity to the toxin expressed by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 17(4), p. 529-536, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* using Calcium Chloride. In:-----**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. v.1, p. 1.116

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Expression of Cloned Genes in *E. coli* Using the Bacteriophage T7 Promoter. In:-----**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. v.3, p. 15.20

SAUTER, K. A. D. et al. Mouse model of hemolytic-uremic syndrome caused by endotoxin-free shiga toxin 2 (Stx2) and protection from lethal outcome by anti-Stx2 antibody. v. 76 (10), p. 4469-4478, 2008.

SCOTLAND, S. M., SMITH, H. R., ROWE B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, v. 8460, p. 885-886, 1985.

SHEORAN, A. S. et al. Stx2-Specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing Stx2 variants. **Infect. Immun.** v. 71 (6) p. 3125-3130. 2003.

SHEORAN, A. S. et al. Human antibody against Shiga Toxin 2 administered to piglets after the onset of diarrhea due to *Escherichia coli* O157:H7 prevents fatal systemic complications. **Infect. Immun.** v.73 (8), p. 4607- 4613, 2005.

SIMON, M. et al. Shiga toxin 1 elicits diverse biologic response in mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 54, p. 1117-1127, 1998.

SINCLAIR, J. F. e 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. 279(32), p. 33751-33758, 2004.

SMITH H. R. e SCOTLAND, S. M. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.** v.. 26, p. 77-85, 1988.

SMITH, M. J. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against shiga toxin types 1 and 2. **Vaccine.** v. 24, p. 4122-4129, 2006.

SMITH, D. R. et al. A Two-Dose Regimen of a Vaccine Against Type III Secreted Proteins Reduced *Escherichia coli* O157:H7 Colonization of the Terminal Rectum in Beef Cattle in Commercial Feedlots. **Foodborne Pathog. Dis.** v. 6(2),p. 155-161, 2009.

STROCKBINE, et al. 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. et al. Construction of stable LamB-Shiga toxin B subunit Hybrids: Analysis of expression in *Salmonella typhimurium aroA* strain and stimulation of B subunit-specific mucosal and serum antibody responses. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 3345-3359, 1992.

TARR, P.I., GORDON, C.A., CHANDLER, W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **Lancet.** v. 365, p. 1073-1086. 2005.

TESH, V. L. et al. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3392-3402, 1993.

TIMM, C. D. et al. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Lett Appl Microbiol.** v. 44(4), p. 419-425. 2007.

TSUJI, T. et al., A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against shiga toxin types 1 and 2. **Vaccine**. v. 26, p. 2092-2099, 2008a.

TSUJI, T. et al. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxicemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. **Vaccine**. v. 26, p. 469-476, 2008b.

TZIPORI S. et al. Antibody therapy in the management of Shiga toxin induced hemolytic uremic syndrome. **Clin. Microbiol. Rev.** v.17 (4), p. 926-941, 2004.

VAN DE KAR, N. C. et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: Implications for the pathogenesis of the Hemolytic Uremic Syndrome. **Blood**, v. 80, p. 2755-2764, 1992.

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

VAN DONKERSGOED, J et al. *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. **Can Vet J.** v. 46, p. 724–728, 2005.

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

WEN, S. X. et al. Genetics toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. **Vaccine**. v. 24(8), p. 1142-1148, 2006.

WU, T. et al. Live attenuated *Shigella dysenteriae* type 1 vaccine strains overexpressing shiga toxin B subunit. **Infect. Immun.**,v.79(12), p. 4912-4922, 2011. _

www.cdc.gov.

ZHU, C. et al. Protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin B subunit. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15. p. 359-366, 2008.

ZUMBRUN, S. D. et al. Human Intestinal Tissue and Cultured Colonic Cells Contain Globotriaosylceramide Synthase mRNA and the Alternate Shiga Toxin Receptor Globotetraosylceramide. **Infect. Immun.**,v. 78, p. 4488–4499. 2010.

9 APÊNDICE A

Súmula curricular

1. Formação

Doutoramento

Pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo (USP). (2008 até presente data).

Mestrado

Pós-graduação do Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo (USP). (2005 até 2008).

Graduação

Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista (UNESP). (2001 até 2004).

Iniciação Científica

Laboratório de Microbiologia e Bioquímica, UNESP. Início: 2002 - Término: 2004. Apoio financeiro: FAPESP.

Título do projeto: "Seleção de linhagens fúngicas e bacterianas com propriedades antibióticas contra *Lactobacillus fermentum*." Orientador: Dr. Pedro de Oliva Neto.

2. Produção Científica

Artigos Publicados

GOMES, P. A D. P.; FERREIRA, R. C. C.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S. A Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) e a busca de uma estratégia de controle para a doença. **Microbiologia *in foco***, v. 12, p. 47-47, 2011.

ROJAS, R. L. G.; **GOMES, P. A D. P.;** BENTACOR, L. V.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E., COSTA, S. O. P.; MASSIS, L. M; FERREIRA, R. C. C.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C.

S. Salmonella Typhimurium vaccine strains encoding a non-toxing Stx2 induce partial protective immunity to the toxin expressed by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). **Clin. Vaccine Immunol.** 17(4) p. 529-36. 2010

GOMES, P. A. D. P. BENTACOR, L. V., PACCEZ, J. D., SBROGIO-ALMEIDA, M. E., PALERMO, M. S, FERREIRA, R. C. C.; FERREIRA, L. C. S. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Brazilian Journal Microbiol.** v.40, p. 333-338, 2009.

Artigo em Preparação

GOMES, P. A D. P.; BENTACOR, L. V.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Immunoprophylactic potential of Stx2B subunit vaccines and role of different adjuvants in Stx2 neutralization.

3. Participações em Congressos:

GOMES, P. A D. P.; BENTACOR, L. V.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Immunoprophylactic Potential of a recombinant Shiga Toxin (Stx2A2B) in combination with different adjuvants. I *E. coli* and the Mucosal Immune System. ECMIS. Ghent. Bélgica. Pôster. 2011.

GOMES, P. A D. P.; BENTACOR, L. V.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Potencial imunoprotetor da subunidade B da toxina Shiga-like em combinação com diferentes adjuvantes. 2º Encontro de Paulistano sobre *Escherichia coli* patogênicas “Luis Rachid Trabulsi” Universidade Federal de São Paulo. Apresentação oral. 2010.

GOMES, P. A D. P.; BENTACOR, L. V.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica

(EHEC). 1º Workshop em vacinas e Fisiologia Bacteriana de São Paulo, São Sebastião. Apresentação oral. 2010.

GOMES, P. A D. P.; BENTACOR, L. V.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Immunoprophylactic potential of Stx2B subunit vaccines and role of different adjuvants in Stx2 neutralization. “110th General Meeting of American Society for Microbiology”, San Diego, CA, Estados Unidos. Pôster. 2010.

GUIRRO, M.; SOUZA, R. L.; PIAZZA, R. **GOMES, P. A D. P.**; FERREIRA, L. C. S.; GUTH, B. E. Presence of antibodies against Shiga toxin B subunit and intimin γ in sera of children from São Paulo, Brazil “7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections”, Buenos Aires, Argentina. Pôster. 2009.

ROJAS, R. L. G.; BENTACOR, L. V.; **GOMES, P. A. D. P.**; SBROGIO-ALMEIDA, M. E., MASSIS, L. M.; FERREIRA, R. C. C.; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S. Immunogenicity and protective effects of recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains encoding a non toxic Stx2 (Stx2 Δ AB) form. “7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections”, Buenos Aires, Argentina. Pôster. 2009.

GOMES, P. A D. P.; BENTACOR, L. V.; ROJAS, R. L. G.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E. ; PALERMO, M. S.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing a non toxic stx2 (Stx2 Δ AB) form produced by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. “7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* infections”, Buenos Aires, Argentina. Pôster. 2009.

GOMES, P. A. D. P.; BENTANCOR, L. V.; CAVALCANTE, R. C. M.; BIANCHIN, L. D.; MASSIS, L. M.; PALERMO, M. S; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Otimização da expressão e purificação da subunidade B da toxina Stx2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica em linhagens recombinantes de *Escherichia coli*. 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Brasília. Pôster. 2007.

GOMES, P. A. D. P.; PACCEZ, J. D.; BENTANCOR, L. V.; SBROGIO-ALMEIDA, M. E.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. Expression of Shiga like toxin B subunit recombinant *Bacillus subtilis* vaccine strain. 53º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia. Pôster. 2007.

4. Experiência Acadêmica

Aulas teóricas e Práticas de Microbiologia – Agentes Químicos e Físicos – Curso de Especialização em Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia (SBM). 2012.

Participação ministrando aulas teóricas e práticas no curso: “Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantess”. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, período 19 a 30 de julho de 2010.

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, 2º Semestre, junto a disciplina BMM - 0160 - Microbiologia Básica, ministrada pelo Departamento de Microbiologia, curso Ciências Farmacêuticas, ICB-USP, São Paulo. Supervisão: Prof. Dr. Gabriel Padilla Maldonado. 2009.

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, 1º Semestre, junto a disciplina BMM - 0271 - Microbiologia Básica, ministrada pelo Departamento de Microbiologia, curso Odontologia, ICB-USP, São Paulo. Supervisão: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira. 2009.

Aulas de Biologia Molecular, Genética e Microbiologia - Instituto de Pós- Graduação Médica do Rio de Janeiro, Curso de Especialização em Genética e Biologia Molecular, 2º Semestre. Supervisão: Rita de Cássia Café Ferreira. 2008.

Professora Convidada: Aula para o curso de Graduação em Ciências Farmacêuticas intitulada Produção de Vacinas. Faculdade de Medicina do ABC. (FMABC). 2008.

Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino – PAE, 1º Semestre, junto a disciplina BMM - 0271 - Microbiologia Básica, ministrada pelo Departamento de Microbiologia, curso Odontologia ICB-USP, São Paulo. Supervisão: Profa. Dra. Beatriz Lieblich Fernandes. 2006.

5. Participação em Cursos

"Production of recombinant proteins in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*."- 2006.
Ministrante: Prof. Dr. Wolfgang Schumann. Local: Departamento de biotecnologia.
Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas -Brasil – São Paulo.