Wilson Barros Luiz

Vacinas de administração oral contra diarreia associada
à *Escherichia coli* enteropatogênica baseada em linhagens
geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis*

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

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

São Paulo

2010

RESUMO

LUIZ, W. B. **Vacinas de administração oral contra diarreia associada à *Escherichia coli* enteropatogênica baseada em linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis*.** 2010. 111f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O objetivo deste trabalho foi a construção de linhagens geneticamente modificadas de *B. subtilis* capazes de expressar porções de intimina, principal componente envolvido na capacidade de colonização de linhagens enteropatogênicas de *Escherichia coli* (EPEC), como estratégia vacinal de administração oral contra diarreias infecciosas. As vacinas desenvolvidas empregaram cinco regiões da intimina de EPEC e linhagens de *B. subtilis* capazes de expressar e acumular proteínas recombinantes no citoplasma. Além disso, avaliamos o uso de esporos e células vegetativas como veículos vacinais para a entrega de antígenos recombinantes a partir de sistema de expressão episomal. A eficácia do modelo vacinal foi demonstrada pela: (i) produção de anticorpos sistêmicos (IgG) e secretados (sIgA) contra intimina, (ii) capacidade de neutralização das intiminas expressas por diferentes linhagens de EPEC pelos anticorpos específicos gerados nos animais imunizados; e (iii) proteção a desafio com linhagens de EPEC a partir de modelo experimental que emprega camundongos recém-nascidos. Os resultados representam uma etapa importante na validação de uma nova estratégia vacinal para o controle de patógenos entéricos. Além disto, propomos a utilização de um modelo animal como uma nova ferramenta para se avaliar o potencial protetor de vacinas contra EPEC.

Palavras-chave: Vacina, EPEC, EHEC, *Bacillus subtilis*, Modelo animal, Sistema de expressão, Imunidade de Mucosa.

ABSTRACT

LUIZ, W. B. **Oral vaccines against diarrhea associated with enteropathogenic *Escherichia coli* strains based on genetically modified *Bacillus subtilis* strains.** 2010. 111p. Doctor thesis (Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The objective of this work was the construction of genetically modified strains of *B. subtilis* able to express portions of intimin, the main component involved in colonization by enteropathogenic *Escherichia coli* strains (EPEC) as a strategy of oral vaccination against infectious diarrhea. The vaccines employed five regions of EPEC intimin and *B. subtilis* strains expressing recombinant proteins in the cytoplasm. Furthermore, we evaluated the use of spores and vegetative cells as vaccine vehicles for the delivery of recombinant antigens based on an episomal expression system. The efficacy of the vaccines was demonstrated by: (i) production of systemic (IgG) and mucosal (sIgA) antibody responses to intimin, (ii) neutralizing of intimin expressed by different strains of EPEC by the antibodies generated in immunized animals, and (iii) protection to lethal challenges carried out with EPEC strains using an experimental model based in newborn mice. The results represent an important step in the validation of a new vaccine strategy for the control of enteric pathogens. Moreover, we propose the use of an animal model as a new tool to evaluate the protective potential of vaccines against EPEC.

Keywords: Vaccines, EPEC, EHEC, *Bacillus subtilis*, Animal model, Expression system, Mucosal immunity.

1 INTRODUÇÃO

As diarréicas infecciosas constituem um importante problema de saúde pública nos países em desenvolvimento, um alto risco para viajantes de regiões não endêmicas que visitam estes países e a surtos relacionados à ingestão de alimentos mal preparados, inclusive em países desenvolvidos. Estimativas conservadoras atribuem uma taxa de mais de 1,5 bilhões de pessoas infectas anualmente. Destes em torno de dois milhões são levados a óbito, segundo a Organização Mundial da Saúde (BRYCE et al., 2005). Embora tenha apresentado declínio na última década, a diarréia infecciosa ocupa o terceiro lugar entre todas as causas de mortes por doenças infecciosas no mundo. Apesar dos progressos registrados pela (OMS) nas últimas duas décadas, a diarréia ainda é a segunda causa de morte mais comum entre as crianças com menos de cinco anos, ficando atrás apenas da pneumonia. Em conjunto, as duas doenças são responsáveis por 40% das mortes infantis em todo o mundo, superando a mortalidade por HIV, malária e sarampo juntos. (UNICEF e WHO, 2009; KOSEK; BERN; GUERRANT, 2003).

O tratamento de doenças diarréicas é feito por meio de hidratação oral e ocasionalmente, pelo uso de antibióticos. Contudo, o aumento frequente de bactérias resistentes reduz a eficácia no tratamento com antibióticos (ROWE; WARD; THELFALL, 1997; SUR et al., 2003; KRISHNA; PATIL; CHANDRASEKHAR, 2006; BLACK, 1993; NATARO e KAPER, 1998), ainda, a administração em alguns casos pode agravar o quadro clínico do paciente acometido pela liberação de toxinas bacterianas (SAFDAR et al., 2002). Políticas sanitárias efetivas e melhorias nas condições de higiene e nutrição deveriam ser as principais medidas para o controle da diarréia. Entretanto, o elevado crescimento populacional e a limitação de recursos em muitos países em desenvolvimento tornam essas medidas de difícil viabilização a curto ou médio prazo. Com isto, o desenvolvimento de vacinas eficazes representa uma

alternativa preventiva, promissora e eficaz para a redução da mortalidade e morbidade associadas às doenças diarreicas (WHO, 2002).

Um dos principais obstáculos para o desenvolvimento de vacinas eficazes contra as diarreias infecciosas está relacionado à diversidade e a complexidade antigênica dos agentes etiológicos, que podem ser de natureza viral, bacteriana ou parasitária e, em alguns casos, variantes sorológicos de uma mesma bactéria podem causar diarreias com intensidade, duração e severidade distintas. Essas diferenças refletem em estratégias ou mecanismos de virulência específicos, como a habilidade de colonizar ou invadir o epitélio intestinal ou ainda pela produção de toxinas. Sendo assim, o desenvolvimento de uma única vacina contra diarreias infecciosas não será capaz de controlar todos os agentes causadores de diarreia (COHEN e GIANNELA, 1995; SANSONETTI, 1998), ela deverá prioritariamente induzir resposta imunológica direcionada de acordo com o agente infeccioso.

Em virtude desta dificuldade, a Organização Mundial de Saúde (OMS) vêm apontando ao longo dos anos, cinco alvos prioritários para o desenvolvimento de vacinas anti-diarreicas em função de sua relevância epidemiológica: rotavírus, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Salmonella typhi*. Além disso, a OMS destaca ainda a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), por se tratarem de agentes endêmicos em países em desenvolvimento e como agentes relacionados a surtos esporádicos em países desenvolvidos devido, principalmente, à contaminação em alimentos.

A primeira categoria de *E. coli* a ser reconhecida como causadora de diarreia foi a *E. coli* "enteropatogênica" clássica (BRAY, 1945). Porém, o termo EPEC foi descrito por Neter et al. (1955) para designar determinados sorogrupos de *E. coli* associados à diarreia, distinguindo-os assim dos sorogrupos encontrados em indivíduos saudáveis ou pacientes com processo de infecção extra-intestinal. A classificação em sorogrupos baseia-se no tipo de antígeno O (antígeno somático

correspondente à parte polissacarídica da molécula de lipopolissacarídeo da membrana externa bacteriana). Com base nesse antígeno, as linhagens são classificadas em doze sorogrupos diferentes: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O 158 (WHO, 1987).

As EPECs podem ainda ser subdivididas em duas categorias: típicas e atípicas (KAPER et al., 1996). As típicas compreendem principalmente os sorotipos O55:H6, O86:H34, O111:H2, O127:H6, O119:H6 e O142:H34 e são definidas como amostras que possuem o plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), presença do gene *eaeA* (EPEC *attaching and effacing*), não expressão a toxina de Shiga (Stx) e são capazes de formar a lesão A/E (*Attaching and Effacing*) (MOO et al., 1983). As EPECs típicas não apresentam fatores de virulência adicionais, exceto as amostras do sorotipo O86:H34, produtoras da citotoxina letal distensora (GHILARDI et al., 1999). Os principais sorotipos relacionados às EPECs atípicas são O26:H11, O55:H7, O111:H9, O119:H2, O125:H6, O128:H2 e O127:H40, cujas principais características são a ausência do plasmídeo EAF, a presença do gene *eaeA*, além de fatores adicionais de virulência como a expressão da toxina EAST-1 (*enteroaggregative E. coli heat-stable toxin*) nos sorotipos O26:H11, O55:H7, O128:H2 e O119:H2. O sorotipo O55:H7 pode apresentar ainda a adesina AfaE-1 (KELLER et al., 2002), enquanto que o sorotipo O125:H6 pode apresentar o padrão de adesão agregativa às células epiteliais. Já os sorotipos O26:H11 e O111:H9 podem também produzir enterohemolisina (TRABULSI et al., 2002).

Entre 1945 e 1965, as EPEC típicas eram frequentemente relacionadas a surtos de diarreia nos países desenvolvidos, sobretudo pelo consumo de carnes mal cozidas, e foram consideradas por várias décadas como o principal agente associado a diarreia aguda na infância nos países em desenvolvimento (NATARO e KAPER, 1998). Atualmente são raramente isoladas como agentes de diarreia endêmica, demonstrando uma alteração no perfil de prevalência para os sorotipos de EPEC

atípica (TRABULSI et al., 2002; FERNANDES-FILHO, 2004; GOMES et al., 2004; ROBINS-BROWNE et al., 2004; FRANZOLIN et al., 2005; BUERIS et al., 2007; ARAUJO et al., 2007), posicionando as EPEC atípicas como patógenos emergentes.

A principal característica da patogênese das EPEC, assim como as EHEC, é a formação de uma lesão histopatológica no epitélio intestinal denominada *attaching and effacing* (A/E), resultado da adesão íntima da bactéria ao enterócito. Esta lesão promove a destruição das microvilosidades do epitélio subvertendo a polimerização da actina e o rearranjo das proteínas do citoesqueleto, resultando a formação de estruturas semelhantes a um pedestal na membrana apical do enterócito, sobre o qual a bactéria encontra-se aderida (MOON et al., 1983). As proteínas envolvidas na formação da lesão A/E são codificadas por genes cromossômicos localizados em uma ilha de patogenicidade de 35 Kb, denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE). LEE também está presente em outros patógenos gastrointestinais como *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium*, *Helicobacter pylori*, além de outras linhagens patogênicas de *E. coli* que infectam animais (MCDANIEL e KAPER, 1997; FRANKEL et al., 1998).

Em 1991, Jerse et al. descreveram uma proteína de membrana externa, que seria indispensável para o fenótipo de lesão A/E. Essa proteína de 94kDa corresponde à adesina intimina, codificada pelo gene *eaeA*, responsável pela aderência íntima da bactéria à célula do hospedeiro (DONNENBERG et al., 1993). Além disso, MCDANIEL e KAPER (1997) demonstraram que a região LEE não apenas é necessária para a formação da lesão A/E, como também é suficiente para causá-la, uma vez que a transformação de LEE em uma *E. coli* K-12, não patogênica, foi capaz de conferir o fenótipo A/E a essa amostra. A região LEE de EPEC compreende cinco operons denominados LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 e LEE 5. Os operons LEE 1, LEE 2 e LEE 3 contêm os genes *ler* (*LEE-encoded regulator*), que regula positivamente os genes localizados em LEE além de alguns fora dessa região, e os que codificam componentes do sistema de secreção do tipo III (SST3), responsáveis pela secreção

de proteínas Esp (*E. coli secreted proteins*) (ELLIOTT et al., 2000). Mutantes *ler* apresentam uma grande diminuição na capacidade de causar lesões A/E, bem como ausência de expressão de Tir e intimina além de diminuir a adesão.

LEE 4 codifica as proteínas secretadas EspA, EspB, EspD e EspF, entre outras (ELLIOTT et al., 1998). A proteína EspA forma a subunidade de um filamento que estabelece contato servindo de canal entre a bactéria e a célula hospedeira. Foi demonstrado que EspB, EspD e Tir são translocadas para a célula hospedeira através de EspA e que EspB e EspD formam um poro de translocação na membrana celular e participam da transdução de sinais (KENNY et al., 1997; KNUTTON et al., 1998; HARTLAND et al., 2000; MACNAMARA et al., 2001; CRANE et al., 2001; CLARK et al., 2003).

O óperon LEE 5 codifica, entre outras, as proteínas intimina e tir. Intimina é uma importante proteína de membrana externa com função de adesina. O receptor da intimina é a proteína Tir (*translocated intimin receptor*), sintetizada pela bactéria e translocada para o hospedeiro pelo SST3, formado pelas proteínas Esc e Sep (KENNY et al., 1997), além disso, a participação de receptores eucarióticos na interação intimina/célula hospedeira também são descritos, entre eles, β 1-Integrina e Nucleolina (MUZAMOONS et al., 2003; SINCLAIR e O'BRIEN, 2002).

A intimina apresenta duas regiões funcionais, a porção carboxi e amino-terminal. A porção N-terminal, inserida na membrana externa da bactéria, é responsável por mediar a dimerização da intimina e é extremamente conservada entre os diferentes sorotipos (TOUZE et al., 2004). A porção C-terminal, porção localizada no meio extracelular, responsável pela interação com a célula hospedeira, apresenta elevada variabilidade genética entre os sorotipos, o que levou à definição de diferentes subtipos de intimina e a adoção do alfabeto grego para diferenciá-las (ZHANG et al, 2002; ADU-BOBIE et al.,1998). Os subtipos de intimina mais prevalentes relacionados às EPEC típicas

são α e β intimina, para as EPEC atípicas os subtipos α , β e γ , sendo que este último é encontrado em amostras de EHEC (TRABULSI et al., 2002).

Até o presente momento nenhuma formulação vacinal está licenciada para uso em humanos contra EPEC e ou EHEC. Ensaios *in vitro* envolvendo estudos de metagênese sitio-dirigida na região *eaeA* demonstraram a importância essencial da intimina para a colonização da mucosa e formação da lesão A/E (BATCHELOR et al., 2000; HICKS et al., 1998). Além disto, anticorpos séricos (IgG e IgM) e secretados no leite e colostro (IgA) de indivíduos sadios e acometidos, demonstram reatividade contra diferentes tipos de intimina (PALMEIRA et al., 2009). Ainda, anticorpos reativos contra intimina encontrados no colostro e leite de lactantes humanas demonstraram capacidade de neutralizar a adesão de EPEC em cultura celular (CRAVIOTO et al., 1991; SILVA e GIAMPAGLIA, 1992; COSTA-CARVALHO et al., 1994; CAMARA et al., 1994; DELNERI et al., 1997; CARBONARE et al., 1997; PALMEIRA et al., 2001; LOUREIRO et al., 1998). Justificando a seleção da intimina como um dos antígenos-alvo para uma abordagem vacinal contra EPEC.

Tir é uma proteína integral de membrana com uma estrutura em grampo, onde as porções carboxi e amino terminais localizam-se dentro da célula hospedeira, e o "loop" extracelular entre os dois domínios transmembrânicos funciona como domínio de ligação a intimina (De GRADO et al., 1999; HARTLAND et al., 1999; KENNY et al., 1999; LUO et al., 2000). Tanto em EPEC como EHEC, a ligação dos dímeros de Tir e intimina forma uma rede de ligação abaixo da bactéria, formando a adesão íntima (CAMPELLONE e LEONG, 2003). As porções N- e C-terminais de Tir interagem com proteínas do citoesqueleto conectando a bactéria, que está no exterior da célula, diretamente com o citoesqueleto da célula hospedeira (GOOSNEY et al., 2001). Essa interação leva à formação de pedestais abaixo da bactéria.

A adesão de EPEC às células epiteliais induz uma variedade de vias de sinalização na célula eucariótica, envolvendo a fosforilação de várias proteínas em

resíduos de serina e tirosina. A interação Intimina/Tir desencadeia uma cascata de eventos que promovem a formação de um pedestal na membrana apical do enterócito. Uma vez introduzida na célula hospedeira, Tir oriundo de EPEC é fosforilada por tirosina-quinases celulares em seu resíduo de tirosina 474, localizado na porção C-terminal, o que permite a ligação à proteína adaptadora Nck. Nck recruta a proteína N-WASP (*neural-Wiskott-Aldrich syndrome protein*), que por sua vez, ativa o complexo protéico Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*), estimulando o rearranjo de proteínas do citoesqueleto, como α -actinina, ezeirina, cortactina, talina, entre outras, levando à polimerização dos filamentos de actina que formam o pedestal (NOUGAYRÈDE et al., 2003).

A ativação da polimerização de actina pode também ocorrer independentemente da ligação à Nck, apenas pela fosforilação dos resíduos de tirosina 454 e 474 (CAMPELLONE e LEONG, 2005). Diferentemente, a proteína Tir de EHEC não apresenta o resíduo de tirosina 474 e, portanto, não é fosforilada. Aparentemente, o recrutamento de N-WASP que dispara a formação do pedestal na infecção por esse patótipo é realizado por uma proteína efetora denominada TccP (*tircytoskeleton coupling protein*), não codificada por LEE, que faz o papel de Nck (CAMPELLONE e LEONG, 2003; LOMMEL et al., 2004). Além de EHEC O157:H7, o gene *tccP* foi detectado em amostras de EPEC típica e atípica e de outros sorotipos de EHEC (GARMENDIA et al., 2005), indicando a presença da via de ativação de actina independente de Nck também em EPEC. De fato, algumas amostras de EPEC, além da via de ativação dependente de Nck, podem utilizar a via TccP/TccP2, resultando no recrutamento direto de N-WASP que leva à polimerização de actina (WHALE et al., 2007). Recentemente, Bai et al. (2007) demonstraram que amostras de EPEC atípica do sorotipo O125:H6 são capazes de causar a lesão A/E em mucosa intestinal, mas não utilizam as vias de ativação da polimerização de actina através de Nck e/ou TccP/TccP2, utilizando uma via alternativa não conhecida.

A adesão das EPEC típicas a células epiteliais, denominada adesão localizada (LA), ocorre em dois estágios. Inicialmente, a bactéria se adere à mucosa intestinal formando microcolônias (*clusters*), provavelmente devido a participação da fímbria BFP e do filamento formado pela proteína EspA. Girón et al. (1991) descreveram que a fímbria BFP era o fator que mediava a adesão localizada apresentada por EPEC. Posteriormente, Cleary et al. (2004) demonstraram que EspA poderia participar dessa adesão inicial. Em seguida, ocorre a adesão íntima da bactéria à célula epitelial mediada pela proteína intimina.

As EPEC atípicas apresentam na maioria dos casos o padrão de adesão localizada-*like* (LAL), no qual não se observa a formação das microcolônias compactas (SCALETSKY et al., 1999). Ao contrário do padrão LA, que pode ser observado após três horas de contato bactéria/célula eucariótica nos ensaios de adesão em células HEp-2, o padrão LAL é observado apenas após seis horas de interação bactéria-célula epitelial. Não é estabelecida a razão deste “retardo” na adesão bacteriana e consequentemente na formação da lesão A/E causada por EPEC atípica. Vários estudos têm demonstrado que amostras de EPEC atípica são capazes de apresentar além do padrão LAL os padrões de adesão agregativo, difuso e localizado (PELAYO et al., 1999; SCALETSKY et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; DULGUER et al., 2003; GOMES et al., 2004; HERNANDES et al., 2008). A incapacidade de EPEC atípica aderir em células epiteliais cultivadas também tem sido relatada em alguns sorotipos. Além disso, a ausência do regulador Per (regulador global presente no plasmídeo EAF) poderia estar retardando a expressão de alguns genes de LEE envolvidos na adesão e formação da lesão A/E.

Knutton et al. (1989), observando que a composição dos pedestais continha uma alta concentração de filamentos de actina polimerizada (F-actina), desenvolveram um teste utilizado na detecção de patógenos causadores da lesão A/E, denominado teste de FAS (*fluorescent-actin staining*). No teste de FAS a faloidina marcada com isotiocianato de fluoresceína ou rodamina se liga especificamente aos

filamentos de actina, destacando a região polimerizada, evidenciando os locais de adesão bacteriana e dos pedestais pelas lesões. Analisando a composição da lesão A/E através de imunofluorescência, determinaram que outras proteínas do citoesqueleto, além da actina, estão envolvidas na constituição da lesão A/E. Ficou demonstrado que proteínas como a α -actinina, uma molécula envolvida na interligação dos filamentos de actina, assim como a talina e a ezerina, envolvidas na ligação dos filamentos de actina à proteínas transmembrânicas, também se localizavam nos locais de adesão bacteriana.

Um dos obstáculos enfrentados no desenvolvimento de vacinas para humanos é a falta de modelos animais para se avaliar a eficiência vacinal. Os modelos experimentais descritos até o presente momento para EPEC estão restritos a modelos que buscam mimetizar a infecção de EPEC em humanos, utilizando EPEC de coelhos (REPEC) em coelhos ou de *Citrobacter rodentium* em camundongos. Além de uma admirável dificuldade de se obter animais sadios para os experimentos em coelho, há limitações para o uso deste modelo, como a escassez de recursos genéticos e imunológicos (ABE et al., 1998). A escassez de modelos com animais de pequeno porte para estudar EPEC ou EHEC de origem humana fez com que fossem iniciados estudos com outros patógenos, como *Citrobacter rodentium* que colonizam e são capazes de formar lesão A/E em camundongos (GHAEM-MAGHAMI et al., 2001; WILES et al., 2005). No entanto, apesar das similaridades genéticas entre EPEC e de *C. rodentium*, há importantes diferenças fisiopatológicas entre estes dois organismos (DENG et al., 2001). Por exemplo, ao contrário de EPEC, *C. rodentium* parece possuir uma adesina primária, em vez de depender de uma formação de lesão A/E para mediar a ligação da célula hospedeira (JOHNSON e BARTHOLD, 1979). Além disso, camundongos infectados desenvolvem hiperplasia da mucosa, o que não é visto em EPEC (LUPERCHIO e SCHAUER, 2001). Em 2004, Savkovic et al. descreveram um modelo de EPEC isolada de humanos utilizando camundongo C57bl/6 adulto, neste modelo foram observadas alterações fisiológicas e histológicas, inclusive para a

formação de lesão A/E. No entanto, os animais não apresentaram diarreia ou letalidade e a idade destes animais parece estar relacionada com as alterações observadas.

No que concerne à segurança, os Estados Unidos e muitos países da União Européia não aceitam a utilização de linhagens vacinais atenuadas, por uma preocupação crescente do uso de organismos vivos em indivíduos que não tenham seu sistema imunológico totalmente formado (crianças e recém-nascidos) ou imunocomprometidos. Além do risco de reversão, podemos destacar o risco de reação cruzada no diagnóstico e uma possível virulência residual. A utilização de uma cepa bacteriana não patogênica recombinante, capaz de expressar antígenos específicos seria uma alternativa aos problemas acarretados pelo uso de bactérias patogênicas atenuadas.

O emprego de bactérias gram-positivas não patogênicas como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, e *Streptococcus*, tem sido investigado como alternativa, em contraposição do uso de linhagens atenuadas de bactérias gram-negativas (Nouaille et al., 2003). Linhagens de *Bacillus subtilis* mostram-se particularmente interessantes como veículos para a expressão de antígenos heterólogos. Em primeiro lugar, *B. subtilis* é considerado uma espécie segura e possui o status GRAS (*generally regarded as safe*) conferida por agências governamentais como a FDA americana. Possuem ainda grande capacidade de multiplicação, genética bem conhecida, transformação natural e capacidade de produzir esporos, conferindo facilidade na sua estocagem e logística. Linhagens de *B. subtilis* possuem uma longa história de uso industrial, pois são empregados para a obtenção de enzimas, para a fabricação de detergentes e outros produtos de grande valor comercial. Além disto, linhagens de *B. subtilis* não possuem periplasma e proteínas secretadas acumulam-se no meio extracelular de onde podem ser purificadas a baixo custo (FERREIRA e SCHUMANN, 2005; HARWOOD, 1992).

Uma das maiores limitações para a expressão de proteínas heterólogas por linhagens recombinantes de *B. subtilis* estaria relacionada com a instabilidade plasmidial observada entre as gerações durante o cultivo, que até então, eram baseados em vetores plasmidiais com replicação do tipo círculo-rolante, ou utilizando como alternativa o sistema integrativo, que por sua vez compensa a quantidade reduzida de proteína heteróloga expressa pela elevada estabilidade do sistema.

O isolamento de um plasmídeo com replicação do tipo teta (θ) em linhagens selvagens de *B. subtilis* na Bielorrússia (TITOK et al., 2003), permitiu que uma nova série de vetores de expressão fossem desenvolvidos, foram avaliados diferentes promotores e genes heterólogos expressos, assim como o endereçamento para diferentes compartimentos celulares da proteína expressa (PACCEZ et al., 2006, 2007). Ainda, possibilitou o desenvolvimento de sistemas de expressão e purificação de proteínas heterólogas semelhante aos sistemas empregados em *E. coli*, incorporando ao sistema a facilidade de secretar, promovendo a purificação de proteínas heterólogas diretamente do meio extracelular (SCHUMANN, 2007; NGUYEN et al., 2007). Nosso grupo foi o pioneiro no uso de vetores de expressão epissomais estáveis para fins vacinais, um dos primeiros antígenos avaliados foram a subunidade estrutural CfaB (componente da fimbria CFA/I) (LUIZ et al., 2008) e a subunidade B da toxina termo-lábil, ambos de ETEC (PACCEZ et al, 2006, 2007), onde foi demonstrada a capacidade de estimular o sistema imune humoral e sobre tudo uma resposta efetiva e protetora. Portanto, neste trabalho utilizamos linhagens de *B. subtilis* recombinantes capazes de expressar diferentes porções de intimina de EPEC, como estratégia vacinal para o controle de EPEC e EHEC.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Baseando-se nos resultados obtidos durante a realização da tese chegamos as seguintes conclusões:

- Linhagens de *B. subtilis* transformadas com o vetor episomal pHCM03 foram capazes de expressar porções de intimina de EPEC como antígeno heterólogo após indução por choque térmico.
- A concentração de proteína heteróloga expressa pelas linhagens vacinais de *B. subtilis* foi estável com concentrações variando de 200 a 230 µg de proteína em 10^{10} ufc/dose.
- Camundongos DBA/2 submetidos ao regime vacinal com formulações baseadas em células vegetativas e esporos pela via oral, demonstraram que o sistema baseado no vetor episomal é funcional para a imunização com as duas formas celulares.
- A imunização com esporos de linhagens que produzem o antígeno sob controle do promotor *PgsiB* indicam que esse promotor é ativado *in vivo*;
- Títulos mais elevados de anticorpos sistêmicos (IgG) foram obtidos após imunização com a formulação baseada em células vegetativas, assim como os títulos mais elevados secretados na mucosa intestinal e no leite (sIgA) foram obtidos em animais que receberam esporos das linhagens vacinais.
- As linhagens BS415, BS280 e BS190 foram mais imunogênicas pela presença de regiões imunodominantes nas sequencias expressas.
- A análise das subclasses de IgG induzidas em animais imunizados com *B. subtilis* indicam a predominância da subclasse IgG2a, consequentemente direcionado para um padrão Th-1.

- O aumento na concentração de IgA total no leite de fêmeas imunizadas com linhagens vacinais ou não de *B. subtilis* recombinante demonstram a capacidade imunomoduladora da espécie.
- A letalidade observada em camundongos recém-nascidos desafiados com linhagens de EPEC EHEC propõe o uso deste modelo como ferramenta de avaliação da eficácia de estratégias vacinais.
- Não houve diferença no reconhecimento de proteínas nativas ou desnaturadas pelos soros obtidos de camundongos imunizados com as linhagens vacinais de *B. subtilis*.
- Os soros anti-BS415, BS315, BS280 e BS190 foram capazes de inibir a adesão e a lesão A/E em células Hep-2 por EPEC expressando intimina β .
- Somente os soros obtidos de animais que receberam linhagens vacinais de *B. subtilis* expressando porções próximas à região C-terminal foram capazes de inibir a letalidade de camundongos recém-nascidos desafiados com a linhagem atípica de EPEC O111:H9.
- Em ensaio de proteção passiva, fêmeas imunizadas conferiram proteção parcial a filhotes desafiados com a EPEC atípica O111:H9 e, maior sobrevivência quando desafiados com a linhagem de EPEC típica O111:H2.
- A pré-exposição do veículo vacinal ao sistema imunológico acarreta em declínio dos títulos de anticorpos em indivíduos sensibilizados com células vegetativas, mas, aumento dos títulos específicos de anticorpos quando sensibilizados com esporos.

REFERÊNCIAS*

- ABE A, HECZKO U, HEGELE RG, BRETT FINLAY B. Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. **J Exp Med.** v.10, p.1907-16, 1998.
- ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONÇALVES, A.G.; TRABULSI, L.R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 662-668, 1998.
- ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 81, p. 741-746, 1961. ARAUJO et al., 2007.
- ARAUJO, J.M.; TABARELLI, G.F.; ARANDA, K.R.S.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C.M.F.; SCALETSKY, I.C.A. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, p. 3396-3399, 2007.
- BAI, L.; SCHÜLLER, S.; WHALE, A.; MOUSNIER, A.; MARCHES, O.; WANG, L.; OOKA, T.; HEUSCHKEL, R.; TORRENTE, F.; KAPER, J.B.; GOMES, TAT; XU, J.; PHILLIPS, A.D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli* O125:H6 triggers attaching and effacing lesions on human intestinal biopsy specimens independently of Nck and TccP/TccP2. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 361-368, 2007.
- BARROS HC, RAMOS SR, TRABULSI LR, SILVA ML. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HeLa cells by serum of infants with diarrhea and by cord serum. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 1, p.83-7, 1995.

*De acordo com:

ASSOCIACAO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS: **NBR 6023:**

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

BATCHELOR, M.; PRASANNAN, S.; DANIELL, S.; REECE, S.; CONNERTON, I.; BLOOMBERG, G.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. AND MATTHEWS, S.. Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. **EMBO J.** v. 19, n. 11, p. :2452-64, 2000.

BLACK, R.E. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. **Vaccine**, v. 11, p. 100-106, 1993.

BLANCO M, SCHUMACHER S, TASARA T. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2). **BMC Microbiol.** v. 9, p.5:23, 2005.

BLATTNER FR, PLUNKETT G 3RD, BLOCH CA, PERNA NT, BURLAND V, RILEY M, COLLADO-VIDES J, GLASNER JD, RODE CK, MAYHEW GF, GREGOR J, DAVIS NW, KIRKPATRICK HA, GOEDEN MA, ROSE DJ, MAU B, SHAO Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**. v. 5331, p. 1453-62, 1997.

BRAY, J. Isolation of antigenically homogenous strains of Bact. Coli Neapolitanum from summer diarrhea of infants. **J. Pathol.**, v. 57, p. 239-247, 1945.

BRYCE J, BOSCHI-PINTO C, SHIBUYA K, BLACK RE; WHO CHILD HEALTH EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP. WHO estimates of the causes of death in children. WHO, Geneva, Switzerland. **Lancet**. v. 9465, p. 1114-6, 2005.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

CAMARA, L.M.; CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L. AND CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by

human colostrum: detection of specific sIgA related to EPEC outer-membrane proteins. **Int. Arch. Allergy. Immunol.** v. 3, p. 307-10, 1994.

CAMPELLONE KG, LEONG JM. Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic *Escherichia coli* Tir. **Mol. Microbiol.** v. 2, p. 416-32, 2005.

CAMPELLONE, K.G.; LEONG, J.M. Tails of two Tirs, p. actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. **Current Opinion Microbiol.**, v. 6, p. 82–90, 2003.

CAMPOS, L.C.; WHITTAM, T.S.; GOMES, T.A.T., ANDRADE, J.R.C.; TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282-3288, 1994.

CARBONARE SB, SILVA ML, TRABULSI LR, CARNEIRO-SAMPAIO MM. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence to HEP-2 cells by bovine colostrum and milk. **Allergol. Immunopathol.** v. 6, p. 229-37, 2001

CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.; PALMEIRA, P. AND CARNEIRO-SAMPAIO MM.. Human colostrum IgA antibodies reacting to enteropathogenic *Escherichia coli* antigens and their persistence in the faeces of a breastfed infant. **J. Diarrhoeal. Dis. Res.** v. 2, p. 53-8, 1997

CASULA, G.; CUTTING, S.M. *Bacillus* probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 2344-2352, 2002.

CLARK B, MCKENDRICK M. A review of viral gastroenteritis. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v. 5, p. 461-9, 2003.

CLEARY, J.; LAI, L.C.; SHAW, R.K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M.S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to

intestinal epithelial cells, p. role of undeleforming pili (BFP), EspA filaments and intimin.

Microbiology, v. 150, p. 527-538, 2004.

COHEN, M. B. & GIANNELLA, R. A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* In: Blaser, M. J.; Smith, P. D.; Ravdin, J. I.; Greenberg, H. B.; Guerrant, R. L. (eds.). **Infection. of Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, p.691-707, 1995.

COSTA-CARVALHO, B.T.; BERTIPAGLIA, A.; SOLE, D.; NASPITZ, C.K. AND SCALETISKY, I.C.. Detection of immunoglobulin (IgG and IgA) anti-outer-membrane proteins of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in saliva, colostrum, breast milk, serum, cord blood and amniotic fluid. Study of inhibition of localized adherence of EPEC to HeLa cells. **Acta. Paediatr.** v. 8,p. 870-3, 1994

CRANE, J.K.; MCNAMARA, B.P. AND DONNENBERG, M.S. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.** v.4, p.197-211, 2001

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

CRAVIOTO. A.; TELLO, A.; VILLAFAN, H.; RUIZ, J.; DEL VEDOVO, S. AND NEESER, J.R.. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. **J Infect Dis**.v. 6, p. 1247-55, 1991.

CUTTING SM, HONG HA, BACCIGALUPI L, RICCA E. Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics. **Int. Rev. Immunol.** v. 6, p. 487-505. Review, 2009.

DeGRADO, M.; ABE, A.; GAUTHIER, A.; STEELE-MORTIMER, O.; DeVINNEY, R. Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell. Microbiol.**, v. 1, p. 7-17, 1999.

DELNERI, M.T.; CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.; PALMEIRA, P. AND CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates. **Eur J Pediatr**. v. 6, p. 493-8, 1997.

DENG W, LI Y, VALLANCE BA, FINLAY BB. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. **Infect. Immun.** v. 10, p. 6323-35, 2001.

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

DUC LE H, HONG HA, CUTTING SM. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. **Vaccine**, v. 21, p. 4215-4224, 2003.

DUC, L.H.; HONG, H.A.; ATKINS, H.S.; FLICK-SMITH, H.C.; DURRANI, Z.; RIJPKEMA, S.; TITBALL, R.W; CUTTING,S.M. Immunization against anthrax using *Bacillus subtilis* spores expressing the anthrax protective antigen. **Vaccine**, v. 25, p. 346-355, 2007.

DUC, L.H.; HONG, H.A.; FAIRWEATHER, N.; RICCA, E.; CUTTING, S.M. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2810-2818, 2003.

DUC, L.H.; HONG, H.A.; UYEN, N.Q.; CUTTING, S;M. Intracellular fate and immunogenicity of *B. subtilis* spores. **Vaccine**, v. 22, p. 1873-1885, 2004.

DULGUER, M.V.; FABBRICOTTI, S.H.; BANDO, S.Y.; MOREIRA-FILHO, C.A.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I.C.A. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains, p. phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. **J. Infect. Dis.**, v. 188, p. 1685-1694, 2003.

EHRlich, S.D. Replication and expression from *Staphylococcus aureus* in *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, p. 1680–1682, 1977.

ELLIOTT, S. J.; SPERANDIO, V.; GIRON, J. A.; SHIN, S.; MELLIES, J. L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S. W.; MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.

ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y. K.; LAI, L. C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1998.

FERNANDES-FILHO, A. **Doença diarreica aguda em João Pessoa**: prevalência de enteropatógenos e importância dos potenciais fatores de risco e proteção. Tese (Doutor em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FERREIRA PC, CAMPOS IB, ABE CM, TRABULSI LR, ELIAS WP, HO PL, OLIVEIRA ML. Immunization of mice with *Lactobacillus casei* expressing intimin fragments produces antibodies able to inhibit the adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to cultivated epithelial cells. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 2, p. 245-54, 2008.

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

FISCHETTI, V.A.; MEDAGLINI, D.; POZZI, G. Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 659-666, 1996.

FRANKEL, G.; PHILIPS, A.D.; NOVAKOVA, M.; BATCHELOR, M.; HICKS, S. AND DOUGAN, G.. Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. **Mol Microbiol.** v. 2, p. 559-70, 1998.

FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.B.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 359-363, 2005.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V.F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2573-2385, 2005.

GAT O, INBAR I, ALONI-GRINSTEIN R, ZAHAVY E, KRONMAN C, MENDELSON I, COHEN S, VELAN B, SHAFFERMAN A. Use of a promoter trap system in *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis* for the development of recombinant protective antigen-based vaccines. **Infect. Immun.** v. 2, p. 801-13, 2003.

GHAEM-MAGHAMI M, SIMMONS CP, DANIELL S, PIZZA M, LEWIS D, FRANKEL G, DOUGAN G. Intimin-specific immune responses prevent bacterial colonization by the attaching-effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. **Infect. Immun.** v. 9, p. 5597-605, 2001.

GHILARDI, A.C.; GOMES, T.A. AND TRABULSI, L.R. Production of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of *Escherichia coli* strains of serogroup O86. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 5, p. 703-8, 2001.

GHILARDI, A.C.R. **Características de virulência e análise clonal de amostras de *Escherichia coli* dos sorogrupos O142, O127 e O86.** Tese (Doutor em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

GIRON, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 710-713, 1991.

GOMES, T.A.; IRINO, K.; GIRÃO, D.M.; GIRÃO, V.B.; GUTH, B.E.; VAZ, T.M.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1851-1855, 2004.

GONÇALVES NS, GHAEEM-MAGHAMI M, MONTELEONE G, FRANKEL G, DOUGAN G, LEWIS DJ, SIMMONS CP, MACDONALD TT. Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of lumenal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. **Infect. Immun.** v. 11, p. 6651-9, 2001.

GOOSNEY, D. L.; DEVINNEY, R.; FINLAY, B.B. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3315–3322, 2001.

GRYCZAN, T.J.; DUBNAU, D. Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 75, p. 1428–1432, 1978.

GUEROUT-FLEURY, A.M.; FRANDSEN, N.; STRAGIER, P. Plasmids for ectopic integration in *Bacillus subtilis*. **Gene**, v. 180, p. 57-61, 1996.

HÄRTL, B.; WEHRL, W.; WIEGERT, T.; HOMUTH, G.; SCHUMANN, W. Development of a new integration site within the *Bacillus subtilis* chromosome and construction of compatible expression cassettes. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2696-2699, 2001.

HARTLAND, E.L.; BATCHELOR, M.; DELAHAY, R.M.; HALE, C.; MATTHEUS, S.; DOUGAN, G.; KNUTTON, S.; CONNERTON, I.; FRANKEL, G. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. **Mol. Microbiol.**, v. 32, p. 151-158, 1999.

HARWOOD, CR. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. **Trends Biotechnol**, v. 10, p. 247-256, 1992.

HERNANDES, R.T.; SILVA, R.M.; CARNEIRO, S.M.; SALVADOR, F.A.; FERNANDES, M.C.D.C.; PADOVAN, A.C.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R.A.; ELIAS, W.P.; BRIONES M.R.S.; GOMES T.A.T. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell. Microbiol.**, v. 10, p. 415-425, 2008.

HICKS, S.; FRANKEL, G.; KAPER, J.B.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1570-1578, 1998.

HOA, N.T.; BACCIGALUPI, L.; HUXHAM, A.; SMERTENKO, A.; VAN, P.H.; AMMENDOLA, S.; RICCA, E.; CUTTING, A.S. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. **Appl. Env. Microbiol**, v. 66, p. 5241-5247, 2000.

HOA, T.T.; DUC, L.H.; ISTICATO, R.; BACCIGALUP, L.; RICCA, E.; VAN, P.H.; CUTTING, S.M. Fate and Dissemination of *Bacillus subtilis* Spores in a Murine Model. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 3819-3823, 2001.

Hong HA, Baccigalupi L, Ricca E. Cutting SM,. Oral vaccine delivery by recombinant spore probiotics. **Int Rev Immunol**. v. 6, p. 487-505. Review, 2009

HONG, H.A.; DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers as probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 813-835, 2005.

HUANG JM, HONG HA, VAN TONG H, HOANG TH, BRISSON A, CUTTING SM. Mucosal delivery of antigens using adsorption to bacterial spores. **Vaccine**. v 4, p. 1021-30, 2010

ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; TRAN, H.T.; CIABATTINI, A.; MEDAGLINI, D; OGGIONI, M.R.; DE FELICE, M.; POZZI, G.; RICCA, E. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 6294-6301, 2001.

ITO K, IIDA M, YAMAZAKI M, MORIYA K, MOROISHI S, YATSUYANAGI J, KURAZONO T, HIRUTA N, RATCHTRACHENCHAI OA. Intimin types determined by heteroduplex mobility assay of intimin gene (eae)-positive *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** v. 3, p. 1038-41, 2007.

JERSE, A.E.; KAPER, J.B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-Kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4302-4309, 1991.

JOHNSON E, BARTHOLD SW. The ultrastructure of transmissible murine colonic hyperplasia. **Am. J. Pathol.** v. 2, p. 291-313, 1979.

KAPER, J.B. Defining EPEC. Proceedings of the International Symposium on Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 130–133, 1996.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KENNY, B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 1229-1241, 1999.

KENNY, B.; DeVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D.J.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfer its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, p. 511-520, 1997.

KENNY, B.; ELLIS, S.; LEARD, A.D.; WARAWA, J.; MELLOR, H.; JEPSON, M.A. Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional

enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 1095–1107, 2002.

KENNY, B.; FINLAY, B. B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 92, n. 17, p. 7991-7995, 1995.

KNUTTON S, ADU-BOBIE J, BAIN C, PHILLIPS AD, DOUGAN G, FRANKEL G. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. **Infect. Immun.** v. 5, p.1644-52, 1997.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P. H.; MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. and Imm.** v. 57, n. 4, p. 1290-1298, 1989.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLAN, M.J.; NISAN, I.; NEVES, B.C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO J.**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KOSEK M, BERN C, GUERRANT RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.** v. 81, p. 197-204, 2003

KRISHNA BV, PATIL AB, CHANDRASEKHAR MR. Fluoroquinolone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v3:224-6., 2006.

LACHER,D.W., STEINSLAND,H. AND WHITTAM,T.S. A revised system of nomenclature for allelic variants of intimin (eae). Unpublished. **GenBank:** FJ609802.1, 2009.

LACHER,D.W., STEINSLAND,H. AND WHITTAM,T.S. Allelic subtyping of the intimin locus (eae) of pathogenic *Escherichia coli* by fluorescent RFLP. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 1, p. 80-87,2006.

LASARO, M.O.; LUIZ, W.B.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E. AND FERREIRA, L.C. (. Prime-boost vaccine regimen confers protective immunity to human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Vaccine.** v. 19, p. 2430-8, 2005.

LASARO, M.O.; LUIZ, W.B.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; NISHIMURA, L.S.; GUTH, B.E. AND FERREIRA, L.C. Combined vaccine regimen based on parenteral priming with a DNA vaccine and administration of an oral booster consisting of a recombinant *Salmonella enterica serovar* Typhimurium vaccine strain for immunization against infection with human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.** v. 11, p. 6480-91, 2004

LI L, HU X, WU Z, XIONG S, ZHOU Z, WANG X, XU J, LU F, YU X. Immunogenicity of self-adjuvanticity oral vaccine candidate based on use of *Bacillus subtilis* spore displaying *Schistosoma japonicum* 26 KDa GST protein. **Parasitol. Res.**, v. 6, p. 1643-51, 2009.

LOMMEL, S.; BENESCH, S.; ROHDE, M.; WEHLAND, J.; ROTTNER, K. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. **Cell. Microbiol.**, v. 6, p. 243-254, 2004.

LOUREIRO, I.; FRANKEL, G.; ADU-BOBIE, J.; DOUGAN, G.; TRABULSI, L.R. AND CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: intimin, BfpA, EspA, and EspB. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.** v.2, p. 166-71, 1998.

LUIZ WB, CAVALCANTE RC, PACCEZ JD, SOUZA RD, SBROGIO-ALMEIDA ME, FERREIRA RC, FERREIRA LC. Boosting systemic and secreted antibody responses in mice orally immunized with recombinant *Bacillus subtilis* strains following parenteral priming with a DNA vaccine encoding the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) CFA/I fimbriae B subunit. **Vaccine**. v. 32, p. 3998-4005, 2008.

LUO, Y.; FREY, E.A.; PFUETZNER, R.A.; CREAGH, A.L.; KNOECHEL, D.G.; HAYNES, C.A.; FINLAY, B.B.; STRYNADKA, N.C. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, p. 1073–1077, 2000.

LUPERCHIO SA, SCHAUER DB. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. **Microbes Infect**. v. 4, p. 333-40. Review, 2001.

MAURIELLO, E.M.; DUC, LE H.; ISTICATO, R.; CANGIANO, G.; HONG, H.A.; DE FELICE, M.; RICCA, E. AND CUTTING, S.M.. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. **Vaccine**. v. 22, p. 1177-87, 2004.

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

McNAMARA, B.P.; KOUTSOURIS, A.; O'CONNELL, C.B.; NOUGAYREDE, J.P.; DONNENBERG, M.S.; HECHT, G. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. **J. Clin. Investig.**, v. 107, p. 621–629, 2001.

MOGK A, HAYWARD R, SCHUMANN W. Integrative vectors for constructing single-copy transcriptional fusions between *Bacillus subtilis* promoters and various reporter genes encoding heat-stable enzymes. **Gene**. v. 182, p. 33-6, 1996

MOON, H.W.; WHIPP S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340- 1351, 1983.

MUZAMOONS, M.M.; KOUTSOURIS, A.; HECHT, G. Disruption of cell polarity by Enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 7069-7078, 2003.

NAKAZATO G, GYLES C, ZIEBELL K. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet. Microbiol.** v. 101, p. 269—277, 2004.

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

NETER, E. Symposium on Enterobacteriaceae of medical significance: isolation, identification, and pathogenic potentialities. In: **Fifty-sixth General Meeting of the Society of American Bacteriologists**, Houston, Texas, 1955.

NGUYEN HD, PHAN TT, SCHUMANN W.Expression vectors for the rapid purification of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Curr. Microbiol.** v.2, p. 89-93, 2007.

NGUYEN, H.D.; NGUYEN, Q.A.; FERREIRA, R.C.; FERREIRA, L.C.S.; TRAN, L.T.; SCHUMANN, W. Construction of plasmid-based expression vectors for *Bacillus subtilis* exhibiting full structural stability. **Plasmid**, v. 54, p. 241-248, 2005.

NOUGAYREDE, J.P.; FERNANDES, P.J.; DONNENBERG, M.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. **Cell. Microbiol.**, v. 5, p. 359–372. 2003.

NUNES EB, SARIDAKIS HO, IRINO K & PELAYO JS. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **J. Med. Microbiol.** v. 52, p. 499-504, 2003.

OGGIONI, M.R.; CIABATTINI, A.; CUPPONE, A.M.; POZZI, G. *Bacillus* spores for vaccine delivery. **Vaccine**, v. 31, p. 96-101, 2003.

PACCEZ JD, LUIZ WB, SBROGIO-ALMEIDA ME, FERREIRA RC, SCHUMANN W, FERREIRA LC. Stable episomal expression system under control of a stress inducible promoter enhances the immunogenicity of *Bacillus subtilis* as a vector for antigen delivery. **Vaccine**. v. 15, p.2935-43, 2006.

PACCEZ JD, NGUYEN HD, LUIZ WB, FERREIRA RC, SBROGIO-ALMEIDA ME, SCHUMAN W, FERREIRA LC. Evaluation of different promoter sequences and antigen sorting signals on the immunogenicity of *Bacillus subtilis* vaccine vehicles. **Vaccine**.v. 24, p. 4671-80, 2007.

PALMEIRA P, COSTA-CARVALHO BT, ARSLANIAN C, PONTES GN, NAGAO AT, CARNEIRO-SAMPAIO MM. Transfer of antibodies across the placenta and in breast milk from mothers on intravenous immunoglobulin. **Pediatr. Allergy Immunol.** v.6, p. 528-35, 2009.

PELAYO, J.S.; SCALETSKY, I.C.; PEDROSO, M.Z.; SPERANDIO, V.; GIRON, J.A.; FRANKEL, G.; TRABULSI, L.R. Virulence properties of atypical EPEC strains. **Med. Microbiol.**, v. 48, p. 41-49, 1999.

Penteado AS, UGRINOVICH LA, Blanco J. Serobiotypes e genes de virulência *Escherichia coli* cepas isoladas de coelhos diarreicas e saudáveis no Brasil. **Vet. Microbiol.** 89: 41—51, 2002.

PERNA NT, PLUNKETT G 3RD, BURLAND V, MAU B, GLASNER JD, ROSE DJ, MAYHEW GF, EVANS PS, GREGOR J, KIRKPATRICK HA, PÓSFAL G, HACKETT J, KLINK S, BOUTIN A, SHAO Y, MILLER L, GROTEBECK EJ, DAVIS NW, LIM A, DIMALANTA ET, POTAMOUSIS KD, APODACA J, ANANTHARAMAN TS, LIN J, YEN G, SCHWARTZ DC, WELCH RA, BLATTNER FR. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**. v. 6819, p. 529-33, 2001.

RAMACHANDRAN V, BRETT K, HORNITZKY MA, DOWTON M, BETTELHEIM KA, WALKER MJ; DJORDJEVIC SP. Distribuição dos subtipos entre intimina *Escherichia coli* isolados a partir de fontes de ruminantes e humanos. **J. Clin. Microbiol.** v. 41, p. 5022-5032, 2003.

RICCA, E.; CUTTING, S.M. Emerging applications of bacterial spores in nanobiotechnology. **J. Nanotechnol.**, v. 1, p. 6-15, 2003.

ROBINS-BROWNE, R.M.; BORDUN, A.M.; TAUSCHEK, M.; BENNETTWOOD, V.R.; RUSSEL, J.; OPPEDISANO F.; LISTER N.A.; BETTELHEIM, K.A.; FAIRLEY C.K.; SINCLAIR, M.I.; HELLARD, M.E. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1797-1805, 2004.

ROWE B, WARD LR, THRELFALL EJ. Multidrug-resistant *Salmonella typhi*: a worldwide epidemic. **Clin. Infect. Dis.** v. 1:S106-9, 1997.

SAFDAR N, SAID A, GANGNON RE, MAKI DG. Risk of hemolytic uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis: a meta-analysis. **JAMA**. v.28; p.996-1001, 2002.

Saito H, SHIBATA T, ANDO T. Mapping of genes determining nonpermissiveness and host-specific restriction to bacteriophages in *Bacillus subtilis* Marburg. **Mol. Gen. Genet.** v. 2, p. 117-22, 1979.

SAMBROOK, J., V. MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**; 3rd edition, New York, 2001.

SANSONETTI, P.J.. Slaying the Hydra all at once or head by head? **Nat. Med.** v. 4, p. 499-500, 1998.

SAVKOVIC, S.D., VILLANUEVA, J., TURNER, J.R., MATKOWSKYJ, K.A., HECHT, G.. Mouse model of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Infect. Immun.** v. 73, p. 1161-1170, 2004.

SCALETISKY IC, Fabbriotti SH, ARANDA KR, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO U. Comparison of DNA hybridization and PCR assays for detection of putative pathogenic enteroadherent *Escherichia coli*. **J. of Clinical Microb.** v.40, p. 1254-1258, 2002.

SCALETISKY IC, SILVA ML, TRABULSI LR.. Distinctive Patterns of Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa Cells. **Infect. and Immun.**, v. 45, p. 534-536, 1984.

SCALETISKY, I.C.A.; PEDROSO, M.Z.; OLIVA, C.A.G.; CARVALHO, R.L.B.; MORAIS, M.B.; FAGUNDES-NETO, U. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 3410–3415, 1999.

SCHUMANN W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. **Adv. Appl. Microbiol.** v.62, p. 137-89, 2007.

SHIMOTSU, H.; HENNER, D.J. Construction of a single-copy integration vector and its use in analysis of regulation of the *trp* operon of *Bacillus subtilis*. **Gene**, v. 43, p. 85-94, 1986.

SILVA ML, GIAMPAGLIA CM. Colostrum and human milk inhibit localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Acta Paediatr.** v. 3, p. 266-7, 1992.

SINCLAIR, J.F.; O'BRIEN, A.D. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 2876–2885, 2002.

SPINOSA, M.R.; BRACCINI, T.; RICCA, E.; DE FELICE, M.; MORELLI, L.; POZZI, G.; OGGIONI, M.R. On the fate of ingested *Bacillus* spores. **Res. Microbiol.**, v. 151, p. 361-368, 2000.

SUR D, NIYOGI SK, SUR S, DATTA KK, TAKEDA Y, NAIR GB, BHATTACHARYA SK. Multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* type 1: forerunners of a new epidemic strain in eastern India? **Emerg Infect Dis.** v. 3, p. 404-5, 2003.

TAM, N.K.; UYEN, N.Q.; HONG, H.A.; DUC, L.H.; HOA, T.T.; SERRA, C.R.; HENRIQUES, A.O.; CUTTING, S.M. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 2692-2700, 2006.

TITOK, M.A. ; CHAPUIS, J. ; SELEZNEVA, Y.V. ; LAGODICH, A.V. ; PROKULEVICH, V.A. ; EHRLICH, S.D. ; JANNIERE, L. *Bacillus subtilis* soil isolates: plasmid replicon analysis and construction of a new theta-replicating vector. **Plasmid**, v. 49, p. 53-62, 2003.

TOUZE, T.; HAYWARD, R.D.; ESWARAN, J.; LEONG, J.M.; KORONAKIS, V. Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain, p. a role in clustering of the Tir receptor. **Mol. Microbiol.**, v. 51, p. 73–87, 2004.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets, p. procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4, 1979.

TRABULSI, L.R., V. KELLER, R., V. GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Emerging Infect. Dis.**, v. 5, p. 508-513, 2002.

TSUKAMOTO T, KIMOTO T, MAGALHAES M, TAKEDA Y. Enteroadherent *Escherichia coli* exhibiting localized pattern of adherence among infants with diarrhoea in Brazil-- incidence and prevalence of serotypes. **Kansenshogaku Zasshi**. v.11, p. 1538-42, 1992.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. **WHO Report.**, 2009.

UNITED NATIONS. The Millennium Development Goals Report, **United Nations**, 2005.

UYEN, N.Q.; HONG, H.A.; CUTTING, S.M. Enhanced immunization and expression strategies using bacterial spores as heat-stable vaccine delivery vehicles. **Vaccine**, v. 25, p. 356-365, 2007.

VIEIRA MA, SALVADOR FA, SILVA RM, IRINO K, VAZ TM, ROCKSTROH AC, GUTH BE, GOMES TA. Prevalence and characteristics of the Pathogenicity Island (PAI) O122 in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** In Press, 2010.

VIEIRA, M.A.; ANDRADE, J.R.; TRABULSI, L.R.; ROSA, A.C.; DIAS, A.M.; RAMOS, S.R.; FRANKEL, G.; GOMES, T.A. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequences. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 762-72, 2001.

WHALE, A.D.; HERNANDES, R.T.; OOKA, T.; BEUTIN, L.; SCHÜLLER, S.; GARMENDIA, J.; CROWTHER, L.; VIEIRA, M.A.; OGURA, Y.; KRAUSE, G.; PHILLIPS, A.D.; GOMES, T.A.; HAYASHI, T.; FRANKEL, G. TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a

distinct evolutionary lineage of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology.**, v. 153, p. 1743-55, 2007.

WILES S, DOUGAN G, FRANKEL G. Emergence of a 'hyperinfectious' bacterial state after passage of *Citrobacter rodentium* through the host gastrointestinal tract. **Cell Microbiol.** v. 8, p. 1163-72, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Improving diarrhoea estimates. Child and Adolescent Health and Development, **WHO Report.**, Geneva, Switzerland, 2002.

YU LH, CUTTING SM. The effect of anti-spore antibody responses on the use of spores for vaccine delivery. *Vaccine.* v. 34, p. 4576-84, 2009.

ZHANG, W.L.; KOHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S. AND SCHMIDT, H.. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.** v. 12, p. 4486-92, 2002.