MARILUCIA DOS SANTOS LUDOVICO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA TOXINA
ENTEROTÓXICA, CITOTÓXICA E LETAL PRODUZIDA POR
AMOSTRAS DE *Plesiomonas shigelloides* ISOLADAS DE
ÁGUA DE RIO

**Tese apresentada ao instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em
Ciências (Microbiologia).**

São Paulo

2008

MARILUCIA DOS SANTOS LUDOVICO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA TOXINA
ENTEROTÓXICA, CITOTÓXICA E LETAL PRODUZIDA POR
AMOSTRAS DE *Plesiomonas shigelloides* ISOLADAS DE
ÁGUA DE RIO

Tese apresentada ao instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

São Paulo

2008

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

© reprodução total

Ludovico, Marilucia dos Santos.

Purificação e caracterização de uma toxina enterotóxica, citotóxica e letal produzida por amostras de *Plesiomonas shigelloides* isoladas de água de rio / Marilucia dos Santos Ludovico. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Yano Tomomasa.

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

Versão do título para o inglês: Purification and characterization of an enterotoxigenic, cytotoxic and lethal toxin produced by *Plesiomonas shigelloides* isolated from river water.

Descritores: 1. *Plesiomomas shigelloides* 2. Enterotoxinas 3. Citotoxinas 4. Atividade letal 5. Cardiotoxina 6. Purificação I. Tomomasa, Yano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB061/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marilucia dos Santos Ludovico.

Título da Tese: Purificação e caracterização de uma toxina enterotóxica, citotóxica e letal produzida por amostras de *Plesiomonas shigelloides* isoladas de água de rio.

Orientador(a): Yano Tomomasa.

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 **55** nas fls. **3** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Prof. Dr. Tomomaso Yano, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Estudo de atividade enterotóxica in vivo em modelo animal**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Marilucia dos Santos Ludovico e Luciano Moura Martins**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **16.08.2004**.

São Paulo, 21 de setembro de 2004

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Não sei...

Não sei... se a vida é curta ou longa demais para nós,

Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,

Se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:

Colo que acolhe,

Braço que envolve,

Palavras que conforta,

Silêncio que respeita,

Alegria que contagia,

Lágrimas que corre,

Olhar que acaricia,

Desejo que sacia,

Amor que promove.

E isso não é coisa do outro mundo,

É o que dá sentido a vida.

É o que faz com que ela não seja nem curta,

Nem comprida demais, mas que seja intensa,

Verdadeira, pura... enquanto durar.

(Cora Coralina)

AGRADEÇO

A Deus, por todas as oportunidades que me ofereceu, especialmente por está, e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis.

A minha mãe, Selma pelo seu carinho, amor incondicional e pelo exemplo de força, garra e fé na vida.

DEDICO

A minha família:

Minha vida....

Ao meu querido Agostinho, meu porto seguro, sem seu amor, dedicação e imensurável apoio, a vida seria mais difícil e sem a alegria especial que você lhe dá!

Aos meus filhos Charles, Vinícius, Cínthia, Henrique e agora a Cristiane, por todo carinho, amor e apoio.

Ao meu anjo Lara, o mais puro carinho, a mais nova alegria de nossas vidas.

Felicidade é poder ter vocês sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pelo apoio e confiança na realização deste trabalho, pela constante disponibilidade, amizade e incentivo durante todos estes anos.

A professora Dra. Maria Silvia V. Gatti, por seu apoio e valiosos ensinamentos e pela disponibilidade de ajuda principalmente nos experimentos com alça ligada de coelho e com cultura de células.

Aos professores Drs. Áureo T. Yamada, Paulo P. Joazeiro e Domingos da Silva Leite pelo apoio, sugestões e valiosos ensinamentos.

Aos professores e amigos Drs. Terezinha Knöbl, Andréa Micke Moreno, Antônio F. Pestana de Castro, Antônio J. Piantino Ferreira e René Schneider, pela participação no exame de qualificação, pelas inúmeras dicas e correções.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia e Pós Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da USP: Alice e Celso pelo apoio e ajuda.

As bibliotecárias do Instituto de Ciências Biomédicas da USP: Eva e Maria José pela ajuda e correção da tese.

Aos Técnicos da UNICAMP: Ana Lúcia Soledade, Sandra Martins, Erivaldo, Evandro, Paulinho, Érika e Juvane, pela amizade e auxílios prestados.

As Técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNICAMP: Antônia e Adriane, pela atenção e ajuda na realização da técnica e fotos de microscopia eletrônica.

Aos amigos do Laboratório, Silvia Simi, Gleize, Rosabel, Márcia Tomy, Eneida, Márcia Amadulce, Daniela, Ana Rita, Jaqueline, Cláudio Ventura, Daniel, Marcelo, Ana Paula, Mariana, Fábio, Mário, Paulo André, Denise, Theo, Anne, Ana Carolina, Rogério, pela amizade e pela troca de experiências e pelos momentos de alegria e motivação.

Aos amigos da UNICAMP, Alexandre, Danilo, Renata, Thalita, Aline, Cláudia, Monique, Geórgio, Gerson, pela ajuda, pela convivência amiga e pelos momentos de alegria e motivação.

Aos amigos Duduch, Lígia, Neiva, Maria Aparecida e Cláudio, pelos momentos de descontração quando deixamos nossos problemas de lado e vivemos momentos de alegria.

À querida Stella, amiga de todos os momentos, pelo seu carinho, ajuda e incentivo, e especialmente por sua alegria contagiante.

As meninas da República, Fernanda, Helene, Elusa, Elaine, Tatiana, Juliana, pelos tantos momentos divertidos que tornaram o trabalho e as viagens bem menos cansativos.

Aos meus queridos e grandes amigos, meus anjos especiais Taíze, Luciano, Ana Carolina, Cleide, Juares e Fernanda, pela ajuda, pelo apoio, pelo carinho, pelas inúmeras conversas e risadas, fundamentais para que eu chegasse inteira até o final desta jornada.

Aos amigos, José Carlos, Natália, Kátia, Márcio, pela amizade e por sempre reservar minhas passagens nestas tantas viagens de Londrina a Campinas pela Garcia.

A todos os professores e funcionários da USP e UNICAMP que me ajudaram na realização deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À CAPES e a FAPESP, pelos subsídios financeiros aplicados nesta pesquisa.

*“Embora ninguém possa voltar atrás
e fazer um novo começo, qualquer um
pode começar agora e fazer um novo
fim...”*

(Chico Xavier)

RESUMO

Ludovico MS. Purificação e caracterização de uma toxina enterotóxica, citotóxica e letal produzida por amostras de *Plesiomonas shigelloides* isoladas de água de rio. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Plesiomonas shigelloides está presente entre os microrganismos aquáticos reconhecidos como um potencial enteropatógeno humano e animal e encontra-se distribuído em diferentes regiões geográficas. Produção de toxinas como hemolisinas, enterotoxinas e citotoxinas, tem sido relatada como causa de sua patogenicidade. Neste estudo com amostras de *P. shigelloides*, isoladas de água de rio, foi detectada a produção de uma citotoxina denominada ECL (Enterotóxina Citotóxica Letal), ativa em células Vero, CHO, CaCo-2 e HT-29, a qual levou a formação de grande número de vacúolos citoplasmáticos e retração dos núcleos após 15 minutos de sua aplicação, levando à morte, através da sinalização das vias apoptóticas. Esta citotoxina foi purificada através de ultrafiltração e cromatografia de exclusão molecular. O peso molecular do ECL foi estimado em 48 kDa, é termolábil e foi parcialmente neutralizada por antisoro anti-LT-1 (enterotoxina termolábil tipo 1 de *Escherichia coli*) e pelo antisoro anti-Aerolisina de *Aeromonas*, no entanto o antisoro anti-CT (enterotoxina colérica) não neutralizou sua atividade. Em teste “Western blot” para anti-LT-1, não ocorreu reação sorológica. O ECL purificado induziu acúmulo de fluido em intestino de camundongos recém-nascidos e em alças intestinais de coelhos. Além da atividade enterotóxica, o ECL foi letal a camundongos e ratos, levando-os à morte cardíaca súbita quando injetado por via intravenosa. Considerando os resultados obtidos, concluímos que as amostras de *P. shigelloides* isoladas de água de rio, analisadas nesta pesquisa, possuem grande potencial como patogênico para homem e animal.

Palavras-chave: *Plesiomonas shigelloides*; Enterotoxina; Citotóxina; Atividade letal; Cardiotoxina; Purificação.

.ABSTRACT

Ludovico MS. Purification and characterization of an enterotoxic, cytotoxic and lethal toxin produced by *Plesiomonas shigelloides* isolated from river water. [Ph. D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Plesiomonas shigelloides is present among aquatic microorganisms recognized as putative human and animal enteropathogen and is distributed in a great variety of geographical regions. Production of toxins as hemolysins, enterotoxins and cytotoxins has been related to their role in pathogenicity. Studies done within river water isolates of *P. shigelloides* has detected a cytotoxin called by us as ECL (Lethal Citotoxic Enterotoxin) which is active on Vero, CHO, CaCo-2 and HT-29 cells, causing intensive intracellular vacuolation and nuclear condensation leading to cellular death through apoptotic pathways signalling. This toxin was purified through ultrafiltration and molecular exclusion cromatography and displayed a molecular weight of 48 kDa, thermolabile and was partially neutralized by the anti-LT-1 (tipe 1 termolabile enterotoxin of *Escherichia coli*) and by the anti-aerolisin (cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas*), but the anti-CT (*Vibrio cholerae* enterotoxin). The Western blot analysis to anti-LT-1 showed that no serological reaction occurred. The pure ECL induced fluid acumulation in the intestine of newborn mice and also in the rabbit intestinal loop assays conducted. Besides the enterotoxic activity, the ECL has showed lethal activity to mice and rats, leading them to sudden cardiac death when injected intravenously. Considering the results obtained, these river isolates of *P. shigelloides* have shown great potential as human and animal pathogen.

Palavras-chave: *Plesiomonas shigelloides*; Enterotoxin; Cytotoxin; Lethal activity; Cardiotoxin; Purification.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Perfil de eluição obtido em cromatografia de exclusão molecular usando coluna de gel filtração Superdex 75 em FPLC, com tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0. Frações com atividade citotóxica foram encontradas nos tubos 7 e 8 (1 mL por tubo) (seta indica).....	80
FIGURA 2.	Perfil de eluição obtido em cromatografia de exclusão molecular usando a coluna de gel filtração Superdex 75 em FPLC e, tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0. Frações com atividade citotóxica foram encontradas nos tubos 14 a 16. (0,5 mL por tubo). Material proveniente da primeira cromatografia.....	82
FIGURA 3.	Perfil eletroforético das frações cromatográficas durante o processo de purificação em gel de poliacrilamida.....	84
FIGURA 4.	Curva de viabilidade celular obtida através do teste com Vermelho Neutro em células Vero tratadas com diferentes concentrações da proteína ECL ($\mu\text{g mL}^{-1}$), durante período de exposição de 2 h.....	87
FIGURA 5.	Cinética da atividade da enzima LDH, em função do tempo de exposição da cultura celular ao ECL. Os valores foram determinados a partir de experimentos realizados em triplicata.....	88
FIGURA 6.	Aparência morfológica das células CHO e HT-29 coradas com May Grünwald e Giemsa, após tratamento com ECL de <i>P. shigelloides</i> . (1) Controle de células CHO; (5) Controle de células HT-29; (2 e 6) 15 min de tratamento; (3 e 7) 30 min de tratamento; (4 e 8) 60 min de tratamento.....	89
FIGURA 6a.	Aparência morfológica das células Vero e CaCo-2 coradas com May Grünwald e Giemsa, após tratamento com ECL de <i>P. shigelloides</i> . (1) Controle de células Vero;	

	(5) Controle de células CaCo-2; (2 e 6) 15 min de tratamento; (3 e 7) 30 min de tratamento; (4 e 8) 60 min de tratamento.....	90
FIGURA 7.	Efeito da atividade citotóxica da toxina ECL sobre os filamentos de actina de células HeLa. (A) controle de células; (B) formação de fibras de stresse; (C) prolongamento de filamentos; (E) desaparecimento dos filamentos de actina.....	91
FIGURA 8.	Diagrama do teste de apoptose analisado por citometria de fluxo com Annexin V-FITC em cultura de linfócitos humano, em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30 e 60 min) com ECL (5 µg).....	93
FIGURA 9.	Eletromicrografias de células Vero (grupo controle).....	95
FIGURA 9a.	Eletromicrografias de células Vero, após tratamento com ECL de <i>P. shigelloides</i> , visualização por MET.....	96
FIGURA 10.	Adesão de <i>P. shigelloides</i> a células HT-29 e HeLa coradas com May Grünwald e Giemsa. (A) controle de células HeLa; (E) controle de células HT-29; (B e F) bactérias aderidas a 30 min; (C e G) bactérias aderidas a 60 min; (D e H) bactérias aderidas a 90 min.....	98
FIGURA 11.	Teste em alça intestinal ligada de coelho. (1) cultura bacteriana; (2) controle negativo; (3) sobrenadante filtrado da amostra 9P3-1; (4) 5µg do ECL; (5) 3,5 µg do ECL; (6) 1,7 µg do ECL.....	100
FIGURA 12.	Eletrocardiograma e medida da pressão arterial do rato injetado com a toxina ECL. Linha 1, eletrocardiograma; Linha 2, medida da pressão arterial; (A) Rato foi injetado via intravenosa com a toxina ECL no tempo zero; (B) tempo de 2 min após injeção; (C) tempo 3 min; (D) tempo de 4 min; (E) tempo de 5 min; (F) tempo de 6 min após a injeção.....	103
FIGURA 12a.	Eletrocardiograma de camundongos injetados com a toxina ECL. (A) camundongo foi injetado via intravenosa	

	com a toxina ECL no tempo zero; (B) tempo de 36 seg. após injeção; (C) tempo de 60 seg; (D) tempo de 78 seg; (E) tempo de 105 seg; (F) tempo de 120 seg. após a injeção.....	104
FIGURA 13.	Fotomicrografia dos cortes histológicos das alças intestinais de coelhos após tratamento com o ECL de <i>P. shigelloides</i> . (A, D e F) Atrofia fusão e dilatação de alguns vilos; (B e C) desorganização do tecido conectivo; (E) infiltrados de granulócitos na lâmina própria.....	107
FIGURA 14.	Análise ultraestrutural das alças intestinais de coelhos tratados com toxina ECL através de MEV.....	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Amostras bacterianas utilizadas no estudo.....	43
TABELA 2.	Inibidores de proteases.....	45
TABELA 3.	Diâmetros moleculares dos carboidratos.....	49
TABELA 4.	Seqüência de Primer, temperatura de anelamento e tamanho do produto amplificado (pb).....	58
TABELA 5.	Reagentes e concentrações utilizadas nos ensaios de PCR.....	59
TABELA 6.	Produção do ECL por amostras de <i>P. shigelloides</i> em diferentes meios de cultura.....	71
TABELA 7.	Produção da atividade citotóxica ECL, obtidos no cultivo da amostra de <i>P. shigelloides</i> em diferentes condições de cultivo.....	73
TABELA 8.	Produção da atividade citotóxica ECL, na presença de inibidores de proteases.....	75
TABELA 9.	Atividade hemolítica do ECL em tubos e placas.....	77
TABELA 10.	Atividade hemolítica do ECL em diferentes pH.....	77
TABELA 11.	Atividade hemolítica do ECL frente a carboidratos.....	78
TABELA 12.	Seqüência de purificação do ECL.....	83
TABELA 13.	Atividade Letal do ECL em camundongos.....	101
TABELA 14.	Medida de pressão arterial de ratos inoculados via intravenosa com a toxina ECL no tempo de 6 min.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

ATV	Associação tripsina-versene
BHI	Infusão de cérebro e coração
BSA	Albumina de soro bovino
CDT	Toxina Citoletal Distensora
CNF	Fator necrosante citotóxico
EAST	Enterotoxina termo-lábil de <i>E. coli</i> enteroagregativa
EDTA	Etilenodiamina-tetra ácido acético
EGTA	Ethylenobis (oxyethylenetriol) tetra ácido acético
EHly	Enterohemolisina
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
LB	Meio Luria Bertani
LT	Toxina termo-lábil
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NEM	N-ethylmaleimide
PBS	Tampão fosfato salina
PMSF	Phenylmethysulphonyl fluorido
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
ST	Toxina termo-lábil
TLCK	Tosyl-L-lisyna chloromethyketona
TPCK	Tosyl-L-phenylalanina chloromethyketona
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	Caldo tríptico de soja

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 O Gênero <i>Plesiomonas</i>	24
2.2 Taxonomia e Características Bioquímicas.....	25
2.3 Habitat	26
2.4 Sorologia.....	27
2.5 Infecções em Humanos	29
2.6 Infecções em Animais.....	30
2.7 Patogenicidade e Fatores de Virulência.....	31
2.8 Enterotoxinas	32
2.9 Citotoxinas.....	33
2.10 Adesão e Invasão	35
2.11 Hemolisinas	36
2.12 Resistência Antimicrobiana	38
3. OBJETIVOS	39
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Amostras Bacterianas.....	42
4.2 Influência de Diferentes Condições de Cultivo na Produção do Enterotoxina Citotóxica Letal.....	43
4.2.1 Meios de Cultura	43
4.2.2 Variação de pH.....	43
4.2.3 Temperatura Ideal de Cultivo	43
4.2.4 Condições Físicas de Cultivo	43
4.2.5 Melhor Tempo de Incubação.....	44
4.2.6 Cultivo na Presença de Agentes Inibidores de Protease	44
4.3 Detecção de Atividade Citotóxica <i>in vitro</i> em Diferentes Culturas Celulares	45
4.3.1 Linhagens Celulares Utilizadas	45
4.3.2 Preparo das Culturas Celulares	45
4.3.3 Teste de Citotoxicidade.....	46
4.4 Termoestabilidade.....	46
4.5. Detecção da Atividade Hemolítica	46
4.5.1 Padronização das Hemácias.....	46
5.5.2 Determinação da Viabilidade Celular (CD ₅₀)4.5.2 Realização do	
Teste para detecção da Atividade Hemolítica em Placas e Tubos.....	47
4.5.3 Detecção da Atividade Hemolítica do ECL em diferentes pH.....	47
4.5.4 Atividade Hemolítica Após Incubação com Protetores Osmóticos	47

4.6 Purificação do Fator Citotóxico Letal (ECL)	48
4.6.1 Preparo da Toxina Bruta	48
4.6.2 Processo de Concentração	48
4.6.2.1 Processo de Precipitação Utilizando Sulfato de Amônia	48
4.6.2.2 Processo de Precipitação Utilizando Álcool	49
4.6.2.3 Processo de Precipitação Utilizando Acetona	49
4.6.2.4 Fracionamento por Ultrafiltração	49
4.6.3 Processos Cromatográficos	50
4.6.3.1 Cromatografia de Exclusão Molecular	50
4.6.3.2 Cromatografia de Exclusão Molecular II	50
4.7. Determinação da Concentração Protéica	51
4.8 Análise Eletroforética	51
4.8.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Denaturantes (SDS – PAGE)	51
4.8.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Não Denaturantes (PAGE)	52
4.8.3 Coloração dos Géis	52
4.9 Caracterização Físico-Química do ECL	53
4.9.1 Teste de Termoestabilidade	53
4.9.2 Ensaio de Atividade Proteolítica	53
4.9.2.1 Atividade Proteolítica da Caseína Através da Técnica de Difusão em Placa de Ágar-Skimmed Milk	53
4.10 Caracterização Sorológica	54
4.10.1 Obtenção do Antisoro	54
4.10.2 Teste de Soroneutralização com o Antisoro Produzido	54
4.10.3 Inibição da Atividade ECL por Soro	54
4.10.4 <i>Western Blot</i>	55
4.11 Estudos Moleculares	55
4.11.1 Extração do DNA para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	55
4.11.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	56
4.11.3 Eletroforese em Gel de Agarose	58
4.12 Caracterização Biológica do Enterotóxica Citotóxica Letal	58
4.12.1 Realização dos Ensaio <i>in vitro</i>	59
4.12.1.1 Preparo das Culturas Celulares	59
4.12.1.2 Determinação da Viabilidade Celular (CD_{50})	59
4.12.1.3 Estudo da Integridade da Membrana	60
4.12.1.4 Teste de Citotoxicidade em Cultura Celular	61
4.12.1.5 Teste de FAS (<i>Fluorescent Actin Staining</i>)	61
4.12.1.6 Detecção da Indução de Apoptose pelo ECL em Linfócitos	62
4.12.1.6.1 Preparo da Cultura de Linfócitos	62
4.12.1.6.2 Realização do Teste de Apoptose	62
4.12.1.7 Microscopia Eletrônica de transmissão (MET) em Células Vero	63
4.12.1.8 Teste de Adesão em Linhagens Celulares	63
4.12.1.8.1 Cultivo das Linhagens Celulares	63

4.12.1.8.2 Realização do Teste de Adesão.....	63
4.13 Testes de Patogenicidade <i>in vivo</i>	64
4.13.1 Atividade Enterotóxica em Camundongos Recém-Nascidos (CRN) .	64
4.13.2 Atividade Enterotóxica em Alça Ligada Intestinal de Coelhos.....	65
4.13.3 Letalidade em Camundongos.....	65
4.13.4 Demonstração de Cardiotoxicidade	66
4.14 Estudo das Alterações Morfológicas Induzidas pelo ECL em Células Epiteliais Intestinais de Coelhos	66
4.14.1 Microscopia de Luz.....	66
4.14.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	67
5. RESULTADOS	68
5.1 Amostra Bacteriana Seleccionada para Produção do ECL	69
5.2 Influência de Diferentes Condições de Cultivo na Produção do Enterotoxina Citotóxica Letal	70
5.2.1 Diferentes Meios de Cultura, Influência do pH, Cultivo Estático ou com Agitação e Temperatura	70
5.2.2 Melhor Tempo de Incubação para a Produção da Toxina.....	72
5.2.3 Melhor Tempo de Incubação para a Produção da Toxina Utilizando Inibidores de Proteases.....	72
5.3 Detecção da Atividade Citotóxica <i>in vitro</i> em Diferentes Culturas Celulares	73
5.3.1 Teste de Citotoxicidade.....	73
5.3.2 Determinação da Viabilidade Celular (CD ₅₀)	74
5.3.3 Termoestabilidade	74
5.4 Detecção da Atividade Hemolítica	74
5.4.1 Detecção da Atividade Hemolítica do ECL em Diferentes Condições do Teste	74
5.5 Purificação da Toxina ECL	76
5.5.1 Produção da Toxina ECL	76
5.5.1.1 Precipitação com Sulfato de Amônia.....	76
5.5.1.2 Precipitação com Álcool e Acetona	77
5.5.1.3 Fracionamento por Ultrafiltração	77
5.5.2 Processos Cromatográficos	77
5.5.2.1 Cromatografia de Exclusão Molecular.....	77
5.5.2.2 Cromatografia de Exclusão Molecular II.....	79
5.6 Determinação da Concentração Protéica	81
5.7 Análise Eletroforética	81
5.7.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	81
5.8 Caracterização Físico-Química do Enterotóxina Citotóxica Letal ...	83

5.8.1 Termoestabilidade	83
5.8.2 Atividade Proteolítica da Caseína	83
5.9 Caracterização Sorológica	83
5.9.1 Testes de Soroneutralização	83
5.9.2 <i>Western Blot</i>	84
5.10 Estudos Moleculares.....	84
5.10.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	84
5.11 Caracterização Biológica do ECL <i>in vitro</i>	84
5.11.1 Determinação da viabilidade celular (CD ₅₀)	84
5.11.2 Estudo da Integridade da Membrana	85
5.11.3 Ensaios de Citotoxicidade	86
5.11.4 Teste de FAS (<i>Fluorescent Actin Staining</i>).....	89
5.11.5 Detecção da Apoptose (Indução) pelo ECL em Linfócitos	90
5.11.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em células Vero	92
5.11.7 Teste de Adesão em Linhagens Celulares.....	95
5.11.7.1 Teste de Adesão	95
5.12 Teste de Patogenicidade <i>in vivo</i>	97
5.12.1 Atividade Enterotóxica em Camundongos Recém-Nascidos (CRN) ...	97
5.12.2 Atividade Enterotóxica em alça ligada do Intestino de Coelhos	97
5.12.3 Letalidade em Camundongo	98
5.12.4 Demonstração da Cardiotoxicidade	99
5.13 Estudo das Alterações Morfológicas Induzidas pelo ECL em Células Epiteliais de Coelhos.....	103
5.13.1 Microscopia de Luz.....	103
5.13.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	106
6. DISCUSSÃO.....	108
7. CONCLUSÕES.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Plesiomonas shigelloides é um bastonete Gram-negativo, oxidase-positiva, não formador de esporos, móvel com dois a cinco flagelos polares, anaeróbio facultativo. As análises filogenéticas e de perfil antigênico deste microrganismo indicam um claro relacionamento com o gênero *Proteus*, membro da família Enterobacteriaceae, sendo *P. shigelloides* o único membro oxidase-positiva desta família (Ruimy et al., 1994; Schubert e Holz-Bremer, 1999). *P. shigelloides* se move e consegue replicar em temperatura acima de 8 °C, a até 44 °C, o que lhe confere característica de bactéria termofílica (Shubert e Pelz, 1993).

Este microrganismo pertence ao grupo de bactérias reconhecidas como patógenos aquáticos e tem sido encontrado com mais frequência em regiões tropicais e subtropicais. Sua incidência é alta em alguns países da Ásia como Japão e Tailândia; é também encontrada em alguns países da África, na região central da Europa e em lagos da região norte no círculo polar, sugerindo que *P. shigelloides* está globalmente distribuída (Ganzález-Rey et al., 2003).

P. shigelloides está associada a infecções intestinais e, embora raramente reportada, a infecções extra-intestinais, tais como bacteremia, osteomielites, septicemias, celulites e meningites. (Brenden et al., 1988; Clark et al., 1991).

Evidências epidemiológicas indicam *P. shigelloides* como potencial enteropatógeno humano, muitas vezes considerado como agente etiológico de casos esporádicos e surtos de diarreia em muitas partes do mundo (Herrington et al., 1987; Olsvik et al., 1990; Bravo et al., 1998; Shigematsu et al., 2000).

A forma gastrointestinal de infecção por *P. shigelloides* tem sido classificada em três grupos: a gastroenterite secretória; uma doença semelhante à cólera e que clinicamente lembra a infecção por *V. cholera*; e uma forma de diarreia que clinicamente se assemelha aos sintomas de *Shigella* invasiva. Entretanto, os fatores de virulência relacionados a infecções entéricas ainda não estão bem definidos (Herrington et al., 1987; Mondino et al., 1995).

Estudos sobre a produção de enterotoxinas por *P. shigelloides* como um fator de virulência em potencial, geram controvérsias. Manorama et al. (1983)

caracterizaram e purificaram parcialmente duas enterotoxinas, uma termo-lábil (LT) e outra termo-estável (ST), sugerindo que esta toxina de *P. shigelloides* é uma nova classe de toxina termo-estável.

Sanyal et al. (1980) descreveram a enterotoxicidade causada por culturas e sobrenadante filtrado de culturas de *P. shigelloides* em teste de alça ligada de coelho; esta atividade não foi afetada pelo aquecimento do sobrenadante a 121 °C por 10 min. O sobrenadante filtrado causou descolamento em cultura de células CHO (Células Epiteliais do Ovário de Hamster Chinês) e em células adrenal de camundongos. Hostacka et al. (1982) e Pitarangsi et al. (1982), inocularam cultura e sobrenadante filtrado de cultura de *P. shigelloides* em alça ligada de coelho e não observaram acúmulo de fluido. Gardner et al. (1987) descreveram a produção de uma proteína semelhante à enterotoxina termo-lábil colérica, que causou alongação em células CHO, similar às alterações produzidas pela enterotoxina de *Vibrio cholerae* e pela toxina termo-lábil de *Escherichia coli*.

Okawa et al. (2004) descreveram uma citotoxina termo-estável, que causa acúmulo de fluido em intestino de camundongo recém-nascido e é composta por três proteínas ligadas a LPS, sorologicamente relacionadas com a enterotoxina colérica.

Falcón et al. (2003) descreveram atividade de vacuolização intracelular com gradual destruição da monocamada celular em células CHO, Vero (Células Epiteliais do Rim do Macaco Verde Africano), HeLa (Células de Carcinoma de útero Humano), HT-29 (Células Epiteliais de Intestino Humano) e SK6 (Células Epiteliais do Rim de Suínos), causada por sobrenadante de cultura de *P. shigelloides*. Esta atividade citotóxica foi parcialmente neutralizada com anti-soro contra uma aerolisina produzida por *Aeromonas hydrophila* e foi demonstrada atividade enterotóxica e hemolítica em intestino de camundongo recém-nascido.

Theodoropoulos et al. (2001), mostraram adesão e invasão de *P. shigelloides* em cultura de células CaCo-2 (Epitélio Intestinal Humano), e sugeriram que na invasão inicialmente pode ocorrer um processo semelhante à fagocitose. Tsugawa et al. (2005) também demonstraram adesão e invasão de *P. shigelloides* em células CaCo-2 e a capacidade de induzir apoptose, porém não foi encontrado no sobrenadante filtrado nenhum fator que pudesse ser responsável por indução de atividade citotóxica. Sanyal et al. (1980) e Henrrington et al. (1987) não encontraram nenhum potencial de invasão deste microrganismo.

Cepas de *P. shigelloides* isoladas de ambiente aquático geralmente apresentam grande habilidade de adesão quando comparadas com amostras isoladas de outras fontes. Variações nas condições de experimento, diferenças geográficas e sorológicas podem explicar as contradições nos resultados encontrados.

Até o presente momento, poucos relatos são encontrados na literatura a respeito da produção de toxinas por *P. shigelloides*. Recentemente, encontramos uma citotoxina produzida por *P. shigelloides* que causou atividade enterotóxica em teste de alça ligada de coelho e em intestino de camundongo recém-nascido e foi letal para camundongos e ratos. A produção de toxinas que causam doenças entéricas é considerada como importante fator de virulência; entretanto, o papel desempenhado por estas toxinas não está claramente definido, tornando-se assim, importante o estudo aprofundado deste possível fator de virulência como possível indicador da patogenicidade de *P. shigelloides*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Gênero *Plesiomonas*

A primeira descrição sobre *Plesiomonas shigelloides* ocorreu em 1947, quando Ferguson e Henderson isolaram este microrganismo de fezes de pacientes com um histórico clínico desconhecido, e a denominaram de C27. Posteriormente, este isolado despertou o interesse de muitos pesquisadores, por apresentar características que o relacionavam a família Enterobacteriaceae e possuir um antígeno em comum com a bactéria *Shigella sonnei* fase 1. No entanto, este microrganismo apresentava grande número de propriedades distintas daquelas de *S. sonnei*, incluindo motilidade, produção de indol, fermentação tardia de lactose e inabilidade em produzir ácido a partir de D-manitol, e devido a estas características, foi transferido para o grupo anaerogênico *Paracolon* (González-Rey, et al., 2004 e Janda, 2005).

Este microrganismo sofreu ao longo dos anos, várias modificações em sua classificação e nomenclatura do gênero, que ainda não estão totalmente definidas. Bader em 1954 propôs como pertencente ao gênero *Pseudomonas* por apresentarem flagelos polares e espécie *shigelloides* pelas características semelhantes às de *Shigella*; Sakazaki e Namioka em 1959 propuseram nomeá-lo de *michigani* por causa da localização geográfica onde Ferguson e Henderson o isolaram este microrganismo. Por causa de sua atividade oxidase citocromo, metabolismo fermentativo, similaridades morfológicas como flagelos e características bioquímicas, a bactéria foi transferida do gênero *Pseudomonas* e incluída com o gênero *Aeromonas*, espécie *shigelloides* e a família Vibrionaceae (Ewing et al., 1961). Habs e Shubert em 1962 recomendaram a transferência para um novo gênero, chamado de *Plesiomonas* (do Grego “*Plesios*” que significa vizinho e “*monad*” que significa unidade, devido a sua proximidade com *Aeromonas*), assim nomeado de espécie *Plesiomonas shigelloides*. Martinez-Murcia et al. (1992), baseando-se em estudos moleculares relacionaram esta bactéria como pertencente à família Vibrionaceae, porém Huys e Sings (1999), através da técnica de genotipagem AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) para linhagens de

Aeromonas spp, encontraram que *P. shigelloides* está posicionada fora do principal cluster de *Aeromonas* (Garrrity et al., 2001).

Na edição do Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology de 2000, Anon descreve o gênero *Plesiomonas* como pertencente à família das Enterobacteriaceae. De fato, dados filogenéticos, baseados na análise das seqüências de nucleotídeos do rRNA ribossomal 5S e 16S, sugere um claro relacionamento de *P. shigelloides* com as Enterobacteriaceae, mais do que com as Vibrionaceae. Este relacionamento entre o gênero das Enterobacteriaceae com *P. shigelloides* baseando nas análises filogenéticas e de perfil antigênico, indicaram um claro relacionamento com o gênero *Proteus* (MacDonell, et al., 1986; Martinez-Murcia et al., 1992; Ruimy et al., 1994). Além disto, um relacionamento sorológico entre *P. shigelloides* e *Shigella* tem sido reportado (Shimada e Skazaki, 1978).

Incluída na Enterobacteriaceae, *Plesiomonas* requer uma maior revisão das características da família, uma classificação taxonômica própria e segura para um futuro próximo, como sugerem Ruymi et al. (1994), e a criação de uma nova família, Plesiomonadaceae, com uma única espécie, *P. shigelloides*.

2.2 Taxonomia e Características Bioquímicas

P. shigelloides é um bastonete Gram-negativo, que mede de 0,3 a 1,0 µm de diâmetro por 2,0 a 3,0 µm de comprimento, único representante da família Enterobacteriaceae oxidase-positivo (Ruymi et al., 1994), não formador de esporos, móvel com dois a cinco flagelos polares (tanto flagelos peritríquios quanto lofotríquios), anaeróbio facultativo, catalase positivo, capaz de fermentar inositol e glicose, não fermentador de lactose e sacarose, não produtor de gás nem ácido sulfídrico, urease negativa, descarboxila a lisina e a ornitina, dihidrolisa arginina (diferente de todas as espécies de *Aeromonas* e *Vibrio*) e sensível ao agente Vibriostático O/129.

Este microrganismo tem temperatura de crescimento que varia entre 8 e 44 °C, sendo considerada ótima em torno de 37 a 38 °C. Seu pH ótimo de crescimento fica na faixa de 4,0 a 8,0, sendo sensível a baixo pH, mas tolera pH alto e esta tolerância reflete uma importante propriedade ecológica (Jagger, 2000). Tem crescimento lento em concentração de sal de 0 a 5%, mas é bem tolerante às concentrações entre 3,0

a 3,5% de NaCl, e esta tolerância á salinidade aumenta com o tipo de nutriente do meio de crescimento (Miller, et al., 1986; Janda, 2005).

P. shigelloides apresenta reação cruzada com alguns sorotipos somáticos do gênero *Shigella* (Inoue, et al., 1991; Ruimy, et al., 1994; Schubert e Holz-Bremer, 1999; Fariñas, et al., 2005).

A aparência macromorfológica das colônias de *P. shigelloides* depende do ágar utilizado. Elas podem apresentar formas, tamanhos e cores diferentes dependendo do meio utilizado, se seletivo ou diferencial. O melhor meio seletivo encontrado para isolar *P. shigelloides* é o ágar inositol-verde brilhante-sais biliares (IBB) e como meio de enriquecimento, a água peptonada com pH 8,0 (Janda, 2005).

2.3 Habitat

Este microrganismo pertence ao grupo de bactérias reconhecidas como patogênicas aquáticas (Arai et al., 1980; Mondino et al., 1995; Hernandez e Rodriguez, 1997; Krovacek et al., 2000), e está amplamente distribuído na natureza, sendo encontrado em uma ampla variedade de fontes, tais como: águas doces e salgadas (mares, rios, lagos, lagoas e tanques), animais de sangue frio e quente como lagartos, cobras, peixes, mariscos, aves, gato, cachorro, cervos, boi, incluindo o homem (Bravo, et al., 2004; Faiñas et al., 2005).

P. shigelloides se move e consegue replicar quando a temperatura está acima de 8 °C, até 44 °C, o que lhe confere característica de bactéria termofílica que sobrevive a congelamento (Shubert e Pelz, 1993; Krovacek et al., 2000). É provável que esta bactéria faça parte da microbiota de alguns peixes e de alguns outros habitantes de água como répteis e anfíbios (Jagger, 2000), mas não é considerada como parte da microbiota normal humana, apesar de Pitarangsi et al (1982) terem isolado *P. shigelloides* com frequência similar de indivíduos com ou sem sintomas de diarreia, na Tailândia, onde este microrganismo é endêmico.

Infecções por esta bactéria são associadas à ingestão de peixes, frutos do mar, principalmente ostras e mariscos, além de água contaminada por este patógeno (Holmberg e Farmer, 1984; Brenden et al., 1988; Janda, 2005), consumidas por indivíduos que vivem ou viajam para países tropicais e subtropicais. *P. shigelloides* não cresce a 5 °C e todas são destruídas por pasteurização (60 °C por 30 min),

sugerindo que inadequado cozimento e refrigeração podem contribuir para a contaminação por este microrganismo (Miller et al., 1986).

Embora *Plesiomonas shigelloides* seja mais frequentemente encontrado em regiões tropicais e subtropicais, existem relatos de seu isolamento em região de clima frio (Krovacek, et al., 2000; Ganzález-Rey, et al., 2003). Sua incidência é alta em alguns países da Ásia, como Japão e Tailândia (Echeverria, et al., 1985; Taylor, et al., 1985); é também encontrada em alguns países da África (Albert, et al., 1999; Issa, et al., 1999), na região central da Europa e em lagos da região norte no círculo polar, reforçando a sugestão de que *P. shigelloides* está globalmente distribuída (Krovacek et al., 2000; Ganzález-Rey et al., 2003).

No Brasil, são poucos os relatos de isolamento de *P. shigelloides* de casos clínicos, embora existam relatos da presença deste patógeno em diferentes tipos de água, especialmente água limpa e de ambiente não poluído (Mondino et al., 1995), potencialmente utilizado para consumo ou lazer humano. Estudos realizados na região norte do Paraná, em amostra de água do rio Cambé, demonstraram a incidência de *Aeromonas spp*, *Vibrio cholerae* e *P. shigelloides* (Gibotti et al., 2000).

2.4 Sorologia

O gênero *Plesiomonas* inclui uma única espécie com múltiplos sorotipos e a sorotipagem é o principal meio para diferenciação entre cepas de *P. shigelloides* (Bravo et al., 2000). Os dois maiores esquemas baseados nos antígenos somáticos (AgO) e antígenos flagelares (AgH) foram primeiro desenvolvidos por Aldova e Geizer (1968) que identificaram 13 antígenos O e 15 antígenos H; Shimada e Sakazaki (1978) caracterizaram outros antígenos e propuseram um esquema composto por 40 sorotipos. A partir daí Aldova (1995) e Aldova e Shubert (1996) descreveram novos sorotipos. Alguns antígenos estão relacionados com uma região geográfica específica e/ou com a fonte da qual o microrganismo foi isolado; basicamente são originários de isolados humano e de animais homeotérmicos. Estes esquemas foram unificados por Shimada e Aldova (2000), formando um único esquema internacional composto por 102 antígenos somáticos (AgO) e 51 antígenos flagelares (AgH) reconhecidos. Devido ao caráter ubíquo deste microrganismo, os diferentes sorotipos podem ser encontrados distribuídos amplamente por diversas regiões geográficas (Gonzalez-Rey, et al., 2004; Bravo, et al., 2004).

Como *P. shigelloides* é um microrganismo que tem como habitat principal a água, um terceiro esquema composto por 23 antígenos somáticos (O) e 5 antígenos flagelares (H) foi criado com cepas de *P. shigelloides* originárias exclusivamente de água e/ou animais aquáticos. Este esquema é muito útil na tipagem de amostras ambientais e tem ainda que ser incorporado ao esquema de sorotipos internacional (Shubert e Pelz, 1993; Aldova e Shubert, 1996).

Alguns sorotipos de *P. shigelloides* têm antígeno somático em comum com *Shigella sonnei* (Aldova, 1985) e este fato pode levar a identificação errônea de *P. shigelloides* como *Shigella* (Abbott, 2003). A sorovariedade 17 de *P. shigelloides*, que é encontrada em amostras isoladas de material clínico, possui reação cruzada com o anti-soro de *Shigella* grupo D e é idêntica ao antígeno O de *S. sonnei* (fase 1 antígeno-O) (Abbott et al., 1991). Baseando-se nestes dados, Sayeed et al. (1992) utilizaram com sucesso uma cepa de *P. shigelloides* sorotipo O:17 para proteger coelhos que foram inoculados por via oral com doses de *Shigella sonnei*, sugerindo como uma cepa potencial em vacina para shigelloses em humanos. Uma região do DNA contendo o cluster gênico requerido para a expressão do O:17 tem sido clonada com sucesso em *E. coli*, com possíveis implicações para futuro desenvolvimento de vacina (Chida et al., 2000).

Shimada et al. (1994) descreveram reações cruzadas também entre a sorovariedade O:11 de *P. shigelloides* e *S. dysenteriae* 8, sorovariedade O:2 e *S. dysenteriae* 7, sorovariedade O:23 e *S. boydii* 13, sorovariedade O:54 e *S. boydii* 2 e sorovariedade O:57 e *S. boydii* 9. Albert et al. (1993) encontraram algumas *P. shigelloides* que compartilham antígeno tipo-específico com *S. flexneri* 6 e um antígeno grupo1 de *S. dysenteriae* 1.

2.5 Infecções em Humanos

Apesar de *P. shigelloides* não ser reportada na literatura especializada com tanta frequência como outros patógenos entéricos, é evidente que o número de casos relacionados a esta bactéria reportados nos últimos anos tem aumentado (Clark, et al., 1991). Este microrganismo não é considerado parte da microbiota intestinal humana, apesar de Pitarangi et al. (1982) tê-la isolado de amostras de fezes de indivíduos com ou sem sintomas de diarreia na Tailândia.

As infecções entéricas causadas por esta bactéria podem ser divididas em três grupos, dependendo dos diferentes tipos de diarreia: a gastroenterite secretória que é a forma mais comumente reportada, e pode durar de 3 a 4 semanas, com sintomas caracterizados por numerosas evacuações por dia (mais de 30 vezes), com fezes aquosas; uma doença semelhante à cólera, que clinicamente lembra a infecção causada por *V. cholera* O:1, com dores abdominais, dores de cabeça, náuseas e frio; e uma forma de diarreia mais rara, que clinicamente se assemelha aos sintomas da *Shigella* invasiva, caracterizada por dores abdominais intensas, febre, vômito, sangue e muco com leucócitos polimorfonucleares nas fezes como principal sintoma, que pode durar de 2 semanas a 3 meses (Olsvik et al, 1990; Clark e Janda, 1991; Ahmad et al., 1998).

Uma outra forma de diarreia, causada por *P. shigelloides* foi relatada por Van Loon et al. (1989), em Bangladesh. O paciente apresentava diarreia sanguinolenta persistente associada à colite pseudomembranosa. O tecido do cólon do intestino do paciente apresentava-se compatível com os de colite pseudomembranosa.

Poucos são os surtos reportados na literatura causados por *P. shigelloides*, mas em pelo menos dois grandes surtos de doenças diarreicas transmitidas através da água no Japão, envolvendo cerca de 1.000 pessoas, este foi o microrganismo causador (Tsukamoto et al., 1978). Em um dos surtos o sorotipo responsável foi o O17:H2 e no outro, o sorotipo O24:H5. Esses sorotipos foram isolados dos pacientes e de água de torneira de diferentes localidades onde ocorreram os surtos. Um terceiro surto, que não foi muito bem documentado, estava ligado ao consumo de ostras contaminadas (Rutala et al., 1982). Nos Estados Unidos da América quatro surtos ocorreram e foram descritos por Rutala et al. (1982), Miller e Koburger (1985) e Levy et al. (1998); um surto ocorreu em Cuba, reportado por Bravo et al. (2000); um na Holanda reportado por Medema e Schets (1993). Uma série de casos é

reportada de outros países, em diferentes áreas geográficas, sobre infecções gastrointestinais causadas por *P. shigelloides*, como na Suíça (Claesson et al., 1984), em Connecticut – USA (Ingram et al., 1987), Alemanha (Fischer et al., 1988), New York – USA (Nolte et al., 1988), no Peru (Olsvik, et al., 1990), Bangladesh (Albert et al., 1999), Malásia (Issa et al., 1999), Cuba (Bravo et al., 1999), Hong Kong (Wong et al., 2000), Espanha (Parejo, et al., 2002; Ruiz, et al., 1995) e no sul da Índia (Obi et al., 1997).

Nas ocorrências de infecções extraintestinais por *P. shigelloides*, a mais freqüente é a septicemia, sendo relatados pelo menos 20 casos por Janda (2005). Bacteremia está especialmente relacionada a pessoas com saúde debilitada, incluindo idosos, neonatos e pessoas com doenças no fígado (Clark e Janda, 1991). Meningite acompanhada por septicemia é geralmente reportada em recém-nascidos (Billiet et al., 1989), apesar de Henderson et al, (2001) relatarem um caso interessante de septicemia associada com celulite na mão de uma pessoa que manuseava peixes ao norte da Noruega. Casos de septicemia associada a outras infecções são muito graves, podendo levar à morte.

2.6 Infecções em Animais

Não existem muitos relatos sobre a associação de *P. shigelloides* com infecções e diarreia em animais. Se a água é o primeiro reservatório de *P. shigelloides*, organismos aquáticos como mariscos, ostras, peixes, répteis, anfíbios e mesmo aves podem ser o segundo reservatório deste microrganismo. *Plesiomonas shigelloides* foi isolada de várias espécies animais, porém seu papel na patogenicidade em medicina veterinária é mais controverso do que em medicina humana, por falta de relatos clínicos (Bardon, 1999; Jagger, 2000).

Esta bactéria é isolada com freqüência de diarreia em gatos, e encontrada com maior freqüência nesta espécie do que em outros mamíferos. Existem relatos também de isolados de outros animais doentes como do pulmão de lontras com pneumonia, cachorros com enterite, fígado de patos, gado, ursos, pingüins com diarreia sanguinolenta, macacos, chipanzés, e cobras que morrem e o exame pós-morte revelaram a presença de *P. shigelloides* (Jagger, 2000).

Foram descritos na literatura somente dois surtos de diarreia em peixes (Vladik e Vitovec, 1974; Cruz et al., 1986); os dois trabalhos reportavam alta mortalidade em

trutas. No primeiro artigo, não foram isolados somente *P. shigelloides*, mas também *Flavobacterium* sp. e *Aeromonas hydrophila*. No segundo artigo, Cruz et al. (1986) isolaram somente *P. shigelloides*.

No Japão, durante o período de 1974 a 1978, numa tentativa de determinar a distribuição de *P. shigelloides* em outras fontes, foi realizado um estudo com cavalos, boi, porcos, cachorros, gatos e frutos do mar (Arai et al., 1980). Pesquisadores isolaram amostras de *P. shigelloides* de 37 cachorros e 40 gatos, e muitos destes animais eram assintomáticos. Interessantemente, muitas das cepas isoladas de cachorros e gatos tinham sorovars idênticos aos de alguns pacientes com sintomas de diarreia, e eles sugeriram que estas duas espécies animais tinham papel importante em infecções humanas (Arai et al., 1980).

2.7 Patogenicidade e Fatores de Virulência

P. shigelloides é muitas vezes considerado como agente etiológico em casos esporádicos de infecções gastrointestinais e surtos de diarreia, em diversas partes do mundo (Herrington, et al, 1987; Olsvik et al., 1990; Bravo et al., 1998; Shigematsu et al. 2000). Certos patógenos entéricos assim como *V. cholerae* e *E. coli* caracterizam-se por produzir enterotoxinas que aumentam os níveis de AMP cíclico pela atividade adenilato ciclase. O aumento nos níveis de AMP cíclico resulta em diarreia por aumento de secreção de fluidos para o intestino delgado (Gardner, et al., 1987). Estas enterotoxinas também causam alongação em células CHO, característica comumente usada como método *in vitro* para indicar a produção de enterotoxina (Guerrant, et al., 1974).

Os fatores de virulência relacionados a infecções entéricas causadas por *P. shigelloides*, ainda não estão bem definidos (Herrington et al., 1987; Mondino et al. 1995), apesar da existência de diversos relatos da produção de toxinas, como enterotoxinas, citotoxinas, hemolisinas e toxinas vacuolizantes (Saraswathi, et al., 1983; Gardner et al., 1987 e 1990; Amin, et al., 1992; Janda e Abbott, 1993; Santos, et al., 1999; Baratela, et al., 2001; Falcon, et al., 2003; Okawa, et al., 2004).

Estudos estão sendo realizados para determinar os mecanismos de patogenicidade de *P. shigelloides*, porém os resultados contraditórios e conflitantes sobre a presença de um fator de virulência potencial e a falta de um modelo animal atrapalham o progresso das pesquisas (Henrrington et al., 1987; Olsvik et al., 1990;

Bravo et al., 1998). Vitocec et al, 2001, estudando infecções com *P. shigelloides* e outros microrganismos, sugeriram que camundongo neonatal BALB/c pode ser um modelo experimental válido para estudos de doenças gastrintestinais causadas por bactérias e protozoários.

2.8 Enterotoxinas

A produção de enterotoxinas por *P. shigelloides* como um potencial fator de virulência, embora estudada por vários pesquisadores, gera controvérsias. Manorama et al. (1983) caracterizaram e purificaram parcialmente duas enterotoxinas, uma termolábil (LT) e outra termoestável (ST), sugerindo que esta toxina de *P. shigelloides* é uma nova classe de toxina termoestável.

Pesquisadores têm demonstrado a produção de enterotoxinas *in vivo* usando principalmente dois modelos: alça intestinal ligada de coelho e teste em camundongo neonato recém alimentado com leite. Os efeitos citotóxicos causados por *P. shigelloides* são mostrados através de estudos com várias linhagens celulares e os resultados obtidos por estes pesquisadores são variados.

Sanyal et al. (1980) descreveram a enterotoxicidade causada por culturas e sobrenadante filtrado de culturas de *P. shigelloides* em teste de alça ligada de coelho; esta atividade não foi afetada pelo aquecimento do sobrenadante a 121 °C por 10 min. O sobrenadante filtrado causou descolamento da monocamada em cultura de células CHO (Ovário de Hamster Chinês) e em células Y1 (célula Adrenal de Camundongo). Hostacka et al, (1982) e Pitarangsi et al, (1982), testaram cultura e sobrenadante filtrado de cultura de *P. shigelloides* em alça ligada de coelho e não observaram acúmulo de fluido.

Manorama et al. (1983) purificaram parcialmente e caracterizaram ambas enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). A toxina LT foi biologicamente ativa em modelo de alça ligada de coelho e a ST nos modelos de alça ligada de coelho e intestino de camundongo recém-nascido e, sugeriram que esta toxina de *P. shigelloides* representa um novo tipo de toxina termoestável.

Matthews, et al. (1988) descreveram a produção de uma enterotoxina termo estável (ST) por cepas de *P. shigelloides* em alça ligada de coelho, que parece ser uma nova enterotoxina, sem nenhuma homologia com os genes das enterotoxinas de *E. coli* e *Vibrio cholerae*, e que continua ativa quando o filtrado da cultura é

aquecido. Porém, a atividade enterotóxica só foi encontrada no sobrenadante de cultura após passagens seriadas das amostras *in vivo*, em intestino de coelhos, e foi perdida quando realizado subcultivo *in vitro*, sugerindo que a indução *in vivo* pode contribuir para a expressão da toxina.

2.9 Citotoxinas

A produção de citolisinas é um importante fator de virulência para patógenos entéricos Gram-negativos potencialmente funcionais, por promover a colonização ou invasão de células epiteliais via destruição ou inibição da microbiota residente ou destruição de tecidos.

Gardner et al. (1987) descreveram a atividade de uma citolisina produzida por *P. shigelloides* em células de linhagens CHO. Esta citotoxina é semelhante à enterotoxina termo-lábil (LT) colérica, e causou alongação em cultura de células CHO, similar às alterações produzidas pela enterotoxina de *Vibrio cholerae* e pela toxina termolábil de *Escherichia coli*; sua ação foi neutralizada com a antitoxina colérica, sugerindo que *P. shigelloides* expressa uma toxina semelhante à toxina colérica. Uma completa inibição do fator de alongação sobre células CHO foi conseguida por Gardner et al. (1990) com o crescimento de *P. shigelloides* em meio contendo ferro; estes pesquisadores assim sugerem que *P. shigelloides* requer incubação em um meio com baixa concentração deste metal. A alongação em células CHO, causada por enterotoxinas produzidas por vários enteropatógenos diferentes, é própria da atividade adenilato ciclase, e esta atividade não é afetada pela concentração de ferro.

About et al. (1991) detectaram uma citotoxina extracelular produzida por cepas de *P. shigelloides*, em baixo nível de expressão, causando arredondamento em linhagens epiteliais Y1 (Células Tumorais do Córtex Adreno-Cortical de Camundongo) e HEp-2 (Células Epiteliais de Carcinoma de Laringe Humana), e levando à alongação e morte de células CHO. Esta atividade não foi perdida após aquecimento da toxina por 10 min a 100 °C. Esta mesma citotoxina extracelular também causou alteração morfológica em células Vero após incubação por 48 horas, de modo similar ao que ocorreu com as amostras de Hostacka et al., 1982, citados por About et al. (1991). Amostras de *P. shigelloides* foram isoladas por

Monge et al., (1998), de vegetais na Costa Rica. Estas amostras produziram atividade citotóxica em células HeLa.

Outras bactérias como *Vibrio*, *Helicobacter*, *Escherichia coli* e *Campylobacter* produzem toxinas vacuolizantes (Bernard et al., 1995; Cover et al., 1996; Leunk et al., 1988; Mitra et al., 200; Salvadori et al., 2001; Martins et al., 2002). Falcón, et al. (2003) descreveram a atividade de vacuolização intracelular com gradual destruição da monocamada celular em células CHO, Vero, HeLa, HT-29 e SK6, causada por sobrenadante de cultura de *P. shigelloides* isolada de água. Esta atividade citotóxica foi parcialmente neutralizada com anti-soro contra uma aerolisina produzida por *Aeromonas hydrophila* e foi demonstrada atividade enterotóxica e hemolítica em intestino de camundongo recém-nascido. Este resultado difere da enterotoxina termolábil de *E. coli*, mas lembra a citotoxina termolábil de *Aeromonas hydrophila*, que induz efeitos hemolíticos em células de mamíferos.

P. shigelloides possui muitas características semelhantes às de *Aeromonas hydrophila* (Tsukamoto, 1978), um agente etiológico de doenças entéricas, que possui várias propriedades associadas a mecanismos de virulência (Freitas et al., 1993). O principal fator de virulência de *Aeromonas hydrophila* é aerolisina ou enterotoxina citotóxica (Buckley e Howard, 1999), uma toxina termolábil que possui atividade hemolítica, enterotóxica e citotóxica. Assim, é possível que infecções gastrointestinais causadas por algumas cepas de *Plesiomonas* estejam associadas à produção destes fatores de virulência.

Okawa et al. (2004) descreveram uma citotoxina (ACRP-LPS) termoestável (60 e 100 °C por 10 e 30 min.), com atividade citotóxica em 4 linhagens celulares, as intestinais CaCo-2 e 407 (Células Epiteliais Intestinal Humana), macrófagos U-937 e CHO, sendo os macrófagos mais sensíveis. Esta proteína é composta por três moléculas protéicas (32, 40 e 48 kDa) complexadas com LPS (lipopolissacarídeo) com atividade citotóxica, e a atividade de duas moléculas (40 e 48 kDa) foi neutralizada com antissoro anti-CT (toxina colérica). Esta proteína é também responsável por acúmulo de fluido em intestinos de camundongos recém-nascidos.

2.10 Adesão e Invasão

A adesão nas células do hospedeiro é um passo fundamental na infecção bacteriana, e muitos enteropatógenos possuem estruturas superficiais assim como fímbrias, flagelos, ou glicocálice, que facilitam a aderência à superfície das células epiteliais do hospedeiro (Sansonetti, 1993).

Shubert e Holz-Bremer (1999) mostraram que cepas de *P. shigelloides* isoladas de material clínico aderiram e invadiram células de linhagens HeLa e HEp-2, justificando as formas disenterica da doença, porém as amostras isoladas de água aderiram somente na lamínula e não invadiram. Theodoropoulos et al. (2001), mostraram adesão e invasão de *P. shigelloides* em cultura de células CaCo-2 nos tempos de 2, 4, 8, 16 e 24 h. A invasão começou no tempo de 2 h e inicialmente ocorreu um processo semelhante à fagocitose, pois observaram extensões citoplasmáticas semelhantes a pseudopodos, e vacúolos com bactérias, resultantes da membrana citoplasmática; Estes pesquisadores lembraram também que *in vivo*, células entéricas não são fagocíticas. A presença de bactérias intactas morfolologicamente e em processo de divisão celular dentro dos vacúolos sugere que elas são capazes de resistir à ação de enzimas lisosomais.

Tsugawa et al. (2005) também demonstraram adesão (10 min) e invasão (60 min) de *P. shigelloides* em células CaCo-2 e a capacidade de induzir apoptose, porém não foi encontrado no sobrenadante filtrado nenhum fator que pudesse ser responsável pela indução de atividade citotóxica.

Alguns estudos mostram a habilidade de *P. shigelloides* em invadir células hospedeiras (Binns et al., 1984; Olsvik et al., 1990), porém outros não encontraram os mesmos resultados. Sanyal et al. (1980) e Henrrington et al. (1987) não encontraram nenhum potencial de invasão deste microrganismo. Consequentemente, não encontraram nenhuma evidência conclusiva para a interação patogênica de *P. shigelloides* com as células hospedeiras. Para observar a invasividade *in vivo* é realizado o teste de Sereny (ceratoconjuntivite em olhos de cobaio ou coelho), porém este teste tem produzido resultados negativos com cepas de *P. shigelloides* (Pitarangsi, et al., 1982; Holmberg, et al., 1986).

Muitas amostras de *P. shigelloides* possuem um plasmídeo de aproximadamente 120 MDa. Um grande plasmídeo de 140 MDa encontrado mas espécie *Shigella* e *E. coli* está associado à colonização e invasão no trato

gastrointestinal (Herrington et al., 1987; Abboutt et al., 1991). Holmberg et al. (1986) estudando amostras de *P. shigelloides* isoladas de pacientes, observaram que estes pacientes apresentavam sintomas típicos de infecções produzidas por microrganismo entérico invasor. Das 27 amostras isoladas dos pacientes, 23 continham plasmídeos. Em 12 amostras foi encontrado apenas um plasmídeo de alto peso molecular (>150 MDa, ~230 Kb), porém diferente dos plasmídeos encontrados em *Shigella* spp. e *E. coli* enteroinvasora. Em amostras de pacientes com colite associada a *P. shigelloides* também foram encontrados plasmídeos de alto peso molecular. É provável que um plasmídeo de virulência esteja relacionado à patogenicidade de *P. shigelloides* (Kirov, 2001).

Cepas de *P. shigelloides* isoladas de ambiente aquático geralmente apresentam grande habilidade de adesão quando comparadas com amostras isoladas de outras fontes. Variações nas condições de experimento, diferenças geográficas e sorológicas podem explicar as contradições nos resultados encontrados (Shubert e Holz-Bremer, 1999).

2.11 Hemolisinas

Pitarangsi et al. (1982) afirmaram que a atividade hemolítica não poderia ser detectada em ágar sangue de coelho, carneiro e bovino, mas β -hemolisina pode ser detectada em ágar sangue de bovino e carneiro (Aldova, et al., 1966; Krovacek, et al., 2000) e α -hemolisina em ágar sangue de cavalo (Janda, et al., 1993). Gibotti et al. (2000) seguindo as técnicas descritas por Janda e Abbout (1993), descreveram reação β -hemolítica em hemácias de várias espécies animais, reação α -hemólise em ágar sangue de carneiro e expressão de atividade hemolítica variável em experimentos em microplaca. A α , β e zona dupla de hemólise foi detectada por vários pesquisadores em placas de ágar sangue de carneiro e bovino (Gibotti et al., 2000; Baratéla et al., 2001).

A síntese de hemolisina por *P. shigelloides* parece ser parcialmente regulada por íons de ferro, pois a máxima produção ocorre sob condições de limitação de ferro (Daskaleros et al., 1991; Janda e Abbout, 1993; Santos et al., 1999). Um sistema de captação de ferro está presente em uma grande variedade de bactérias patogênicas (Payne, 1998). Baratéla et al. (2001) reportaram que a produção de uma β -hemolisina, comum a muitas amostras patogênicas de *P. shigelloides*,

depende da composição do meio de cultura, é regulada por ferro e dependente de cálcio. A produção desta hemolisina ocorre em temperaturas de 25 a 35 °C e parece desempenhar papel importante na captura de ferro *in vivo*.

A atividade hemolítica de *P. shigelloides* parece estar ligada ao tipo e às condições de expressão da hemolisina. Daskaleros et al. (1991), não observaram atividade hemolítica em colônias crescidas em placas de ágar sangue, mas a produção de hemolisina foi detectada quando as bactérias foram crescidas em meio líquido ou semi-sólido. Isto sugere que condições como tensão de oxigênio, composição atmosférica e viscosidade podem influenciar na expressão da atividade hemolítica. Estas condições descritas para a expressão de hemolisina por *P. shigelloides*, também são aplicadas a outras bactérias como *E. coli* produtoras de verocitotoxinas (Daskaleros et al., 1991; Janda e Abbott, 1993; Chart et al, 1998).

Os resultados encontrados por Janda e Abbott (1993) são semelhantes aos de Daskaleros et al. (1991). As cepas testadas por estes pesquisadores produziram atividade β -hemolítica em placas de ágar sangue de porcos, carneiros, coelhos e boi, e esta proteína aparenta estar associada à célula e não é liberada extracelularmente em quantidade necessária para produzir hemólise. A hemolisina tem características de proteína, sendo inativada por proteases e alta temperatura; gentamicina (um aminoglicosídeo) também inibe sua atividade, sugerindo que funções celulares ou viabilidade são requeridas para continuar a atividade enzimática.

González-Rodríguez, et al. (2004), não observaram atividade hemolítica em nenhum de seus isolados, mas sugeriram que a atividade α , β e zona dupla de hemólise encontrada por vários pesquisadores poderiam estar relacionadas à expressão de um ou mais fatores extracelulares independente de ferro ou a lise de células bacterianas na placa de meio poderia liberar hemolisina livre da célula no meio envolvendo as colônias de bactérias.

Devido ao grande número de estudos que avaliaram a atividade hemolítica de *P. shigelloides*, existem evidências de que muitos isolados de diferentes áreas geográficas têm a habilidade de causar atividade citolítica contra eritrócitos, uma propriedade que pode definir um papel na patogênese da doença.

2. 12 Resistências Antimicrobianas

Muitas cepas de *P. shigelloides* são naturalmente resistentes à penicilina incluindo ampicilina, piperacilina, ticarcilina, meziocilina e carbenicilina. Isto ocorre talvez pelo fato de que muitas cepas produzem β -lactamases e a produção de β -lactamases, ativa em isolados *in vivo*, é correlacionada com a relativa resistência a ampicilinas (Reinhardt, et al., 1985; Brenden et al., 1988; Clark et al., 1990).

Estudos indicam que a resistência a aminoglicosídeos é bastante variável. Kain e Kelly (1989) mostraram que a resistência a gentamicina, tobramicina e amikacina é bastante comum, entretanto esses microrganismos são geralmente sensíveis á antibióticos de segunda e terceira geração como cefalosporina, nitrofurantoin, ácido nalidíxico, co-trimoxazole, cloramfenicol e quinolonas (Holmberg, et al., 1986; Kain e Kelly, 1989).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Purificação e caracterização físico-química, biológica (atividades intracelulares) e sorológica de uma toxina enterotóxica, citotóxica, cardiotóxica e letal (ECL) produzida por *Plesiomonas shigelloides* visando esclarecer o papel desta toxina nos processos patológicos associados a esta bactéria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar as melhores condições de produção e expressão da proteína ECL;

Purificar a proteína ECL;

Caracterizar físico-química e sorologicamente;

Analisar a atividade biológica da proteína ECL em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*;

Verificar a enterotoxicidade da proteína ECL;

Estudar as alterações histopatológicas induzidas pela proteína ECL;

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras Bacterianas

Foram utilizadas neste estudo 7 amostras de *Plesiomonas shigelloides*, isoladas de água do rio Cambé na região de Londrina – PR, no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (Gibotti et al., 2000), relacionadas na Tabela 1.

Como controles positivos nos ensaios biológicos foram usados para a produção de enterotoxinas e citotoxinas as amostras de *Aeromonas hydrophila* e de *Aeromonas sobria* e como controle negativo as amostras de *Plesiomonas shigelloides* de origem humana e de *Escherichia coli* K12.

Tabela 1. Amostras bacterianas utilizadas no estudo.

Amostras	Sorogrupo
8P1-4	O52:H2
8P6-5	O34:H1
1P3-16	O44:H1
1P2-13	O35:H2
9P3-1	O4:H3
9P7-5	O56:H2
9P1-1	O41:H1
1P9-75 ^a	ND
AH191 ^b	<i>Aeromonas hydrophila</i>
AS36 ^c	<i>Aeromonas sóbria</i>
K12/711 ^d	<i>Escherichia coli</i>

^a Controle negativo (origem humana)

^b Controle positivo (Falcón et al., 2001).

^c Controle positivo (Martins et al., 2002)

^d Controle negativo.

4.2 Influência de Diferentes Condições de Cultivo na Produção da Enterotoxina Citotóxica Letal

Para estabelecer as melhores condições de cultivo para expressão do ECL foram realizados ensaios como:

4.2.1 Meios de Cultura

A produção do ECL foi avaliada em diferentes meios de cultivo: LB (Luria Bertani) (Miller, 1972), TSB (Tryptic Soy Broth) (Difco Lab., Detroit, MI, USA), SMG (meio mínimo com sais e 1% de glicose), idealizado por Davis & Minglioli (1950), MH (Mueller-Hinton) e BHI (Brain Heart Infusion).

4.2.2 Variação de pH

A influência do pH na produção do ECL foi analisada, utilizando as seguintes variações de seus valores 3,0; 3,5; 4,0; 5,0; 6,0; 6,6; 7,0; 8,0; 9,0 e 10, nos diferentes meios de cultura.

4.2.3 Temperatura ideal de Cultivo

Para avaliar a influência da temperatura na produção do ECL, utilizamos as seguintes variações de temperatura no cultivo: 4, 10, 18, 23, 30, 37, 40, 50, 60, 70 e 80 °C.

4.2.4 Condições Físicas de Cultivo

As bactérias foram cultivadas em cultura estática em estufa bacteriológica, sob agitação a 150 rpm em estufa com agitador horizontal (New Brunswick Scientific Co.) e em anaerobiose, com a utilização de jarra de anaerobiose Anaero GenTM (Gaspack anaerobiosis system, Oxoid, Hampshire, England).

4.2.5 Melhor Tempo de Incubação

A produção do ECL foi avaliada de acordo com o tempo de incubação da bactéria, realizando uma curva de crescimento. As análises iniciaram nos tempos de 0 hora, 15 min, 30 min, 1 hora e após de 1 em 1 hora até 72 horas de crescimento.

4.2.6 Cultivo na Presença de Agentes Inibidores de Proteases

Foi estudada a influência de proteases na produção do ECL com o acréscimo de inibidores de proteases no meio de cultura e avaliada a atividade do ECL através de uma curva de crescimento com início de 0 hora até 18 horas (Tab. 2).

Tabela 2. Inibidores de proteases.

Inibidor	Função	Concentração
TLCK	Serina protease	1 mM/mL
TPCK	Serina protease	1 mM/mL
Leupeptina	Triol Protease	1 mM/mL
PMSF	Serina protease	1 mM/mL
EDTA	Metalo Protease	1 mM/mL
EGTA	(quelante de ferro) Metalo Protease (Quelante de Ca)	1 mM/mL
Iodo Acetamida		1 mM/mL
Aprotinina	Serina Protease	5 mg/mL
NEM	Sulfidril Protease	2 mM
Soy Bean Trypsin Like	Serina Protease	0,3 mg/mL
Benzamidina	Serina Protease	1 mM
Pepstatina A	Ácido	1 mM

4.3 Detecção de Atividade Citotóxica *in vitro* em Diferentes Culturas Celulares

4.3.1 Linhagens Celulares Utilizadas

As linhagens celulares utilizadas foram: HeLa, Vero, HEp-2, CHO, CaCo-2 e HT-29, obtidas da coleção americana de culturas celulares – American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD.),

4.3.2 Preparo das Culturas Celulares

As células que estavam mantidas em nitrogênio líquido foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37 °C e em seguida transferidas para garrafas de cultura de células (CORNING-USA), contendo meio MEM (meio mínimo essencial de Eagle) (Nutricell), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), e 1% da solução de antibióticos (penicilina 1000 U/mL e estreptomicina 250µg/mL) (Sigma Chemical Co.). As garrafas de cultura foram então incubadas em estufa (Jouan Instruments Co. France) a 37 °C e atmosfera de 5 % de CO₂ por 48 horas. Após a formação de uma monocamada celular confluenta (tapete celular), o meio foi removido e as células foram lavadas com salina tamponada fosfatada (PBS 0,01M) e descoladas das garrafas com 0,5 mL de uma solução de ATV (associação tripsina versene). As células foram então ressuspensas em meio MEM, acrescido de 10% de SFB e 1% de antibióticos, em um número estimado de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Volumes de 0,1 mL da suspensão celular foram distribuídos em placas de 96 cavidades (COSTAR, CORNING, USA). As placas foram incubadas em estufa (Jouan Instruments Co. France) a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

4.3.3 Teste de Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade foi realizado segundo a metodologia descrita por Konowalchuck et al. (1977). Após a formação da monocamada celular, o meio foi substituído por 0,1 mL de meio MEM contendo 2% de SFB e gentamicina (50 µg/mL). Alíquotas de 0,1 mL do ECL foram adicionadas em duplicata, e para titulação foram diluídos na razão 2, iniciando-se em 1:4. Como controle negativo, foram utilizados *E. coli* K12/711 ou somente meio LB, e como controle positivo, *Aeromonas sobria* (AS 35).

As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Leituras foram realizadas com 10, 30, 60 min até completar 72 horas. As alterações morfológicas das monocamadas celulares foram observadas em microscópio invertido (Nikon).

4.4 Termoestabilidade

Para determinar a termoestabilidade, alíquotas do ECL foram avaliadas após permanência em diferentes condições de temperatura. As alíquotas foram aquecidas em banho-maria controlado por termostato a 50 °C por 5 minutos, 55 °C por 5 minutos e 30 minutos e, a 60, 70 e 100 °C por 15 minutos. Foram também mantidas a -70, -20, 4 °C por 12 horas. As análises para a detecção da atividade citotóxica foram realizadas em cultura de células Vero e o efeito citotóxico observado por 72 horas em microscópio invertido (Nikon).

4.5 Detecção da Atividade Hemolítica

4.5.1 Padronização das Hemácias

A padronização foi realizada conforme Bohach et al (1988), utilizando hemácias de carneiro, cavalo, boi, galinha, coelho e cobaia, lavadas três vezes com PBS 0,05M (Solução Salina Fosfato Tamponada) pH 7,2 numa concentração aproximada de 1% (v/v). Uma alíquota de 500µL da suspensão a 1% foi adicionada a 3,5 mL de água para lisar os eritrócitos, e a absorbância do ECL foi medida a 540 nm (A₅₄₀), em espectrofotômetro (Beckman DU-65). Quando necessário, foram feitos

ajustes no volume da suspensão, de tal maneira que, após a lise, a medida de absorbância em A_{540} fosse de $0,30 \pm 0,02$.

4.5.2 Realização do Teste para Detecção da Atividade Hemolítica em Placas e Tubos

A atividade hemolítica do ECL foi verificada em placas de 96 cavidades e em tubos. Foram utilizados 300 μ L do ECL, diluídos serialmente em razão dois, em PBS, e misturados com igual volume de suspensão a 1% de hemácias padronizadas de carneiro, cavalo, boi, galinha, coelho e cobaia. Os tubos foram incubados a 37 °C por 1 hora, em seguida a suspensão foi centrifugada a 5000 xg por 1 minuto, e examinada a atividade hemolítica pela leitura da absorbância a 540 nm. As placas foram incubadas em banho-maria por 1 hora, e após este tempo levadas à geladeira (4 °C) por 12 horas.

4.5.3 Detecção da Atividade Hemolítica do ECL em Diferentes pH

O ECL foi incubado com salina 0,15 M com pH ajustado em 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5, seguido da incubação por 1 hora a 37 °C. O teste foi realizado de acordo com o item 4.5.2.

4.5.4 Atividade Hemolítica após Incubação com Protetores Osmóticos

Este experimento foi realizado segundo a metodologia descrita por Bhakdi et al. (1986) e Han et al. (2002). O ECL foi incubado em NaCl 0,15 M contendo 30 mM dos seguintes carboidratos: adonitol, arabinose, frutose, galactose, glicose, maltose, manose, sacarose e sorbitol. A atividade hemolítica foi determinada após acréscimo de suspensão a 1% de eritrócitos de cavalo e cobaia, seguindo incubação a 37 °C por 1 hora. Os diâmetros moleculares de cada carboidrato são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Diâmetros moleculares dos carboidratos.

Carboidratos	Diâmetro molecular (nm)
Adonitol	0,63
Arabinose	0,62
Frutose	0,72
Galactose	0,72
D-Glicose	0,72
Maltose	0,96
D-Manose	0,72
Sacarose	0,9
Sorbitol	0,8

4.6 Purificação do Fator Citotóxico Letal (ECL)

4.6.1 Preparo da Toxina Bruta

A amostra Bacteriana 9P3-1 de *Plesiomonas shigelloides* foi cultivada em meio LB (Luria Bertani) a 37 °C por 12 horas, sob agitação (150 rpm) (Estufa Controlled Environment Incubator Shaker). A suspensão bacteriana foi centrifugada a 12000 x g por 30 minutos a 4 °C (centrífuga Beckman – modelo J2-21) e o sobrenadante coletado.

4.6.2 Processo de Concentração

Diversos processos de precipitação e ou de concentração de proteínas foram utilizados visando encontrar a melhor forma para este fim. A seguir, estão relacionados os diferentes processos utilizados.

4.6.2.1 Processo de Precipitação Utilizando Sulfato de Amônia

O sobrenadante da cultura de *P. shigelloides* foi fracionado em 20% de saturação com sulfato de amônia (Merck), mantido sob agitação a 4 °C por 2 horas e centrifugado a 12.000 xg por 25 min a 4 °C. Ao sobrenadante resultante, foi adicionado sulfato de amônio para 40% de saturação. O mesmo processo foi

repetido para 60% e 80% de saturação. Os precipitados obtidos nestes fracionamentos foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 0,02M, pH 7,2, dialisados contra o mesmo tampão diversas vezes a 4 °C e avaliados quanto à atividade citotóxica em células Vero.

4.6.2.2 Processo de Precipitação Utilizando Álcool

Ao sobrenadante de cultura de *P. shigelloides* foi adicionado álcool etílico (dosagem GL 98,9) (Merk) para 90% de saturação, mantido sob agitação a 4 °C por 2 horas e a fração solúvel em álcool etílico foi seca em evaporador rotatório (Fisatom). O resíduo obtido foi suspenso em tampão Tris-HCl 0,02M, pH 7,4, e avaliado quanto à atividade citotóxica em células Vero.

4.6.2.3 Processo de Precipitação Utilizando Acetona

O processo de precipitação do sobrenadante de cultura com acetona (dosagem 99,5%) (Merk), seguiu o mesmo protocolo utilizado para precipitação com álcool etílico, como indicado no item 4.6.2.2.

4.6.2.4 Fracionamento por Ultrafiltração

O processo de fracionamento por ultrafiltração do sobrenadante da cultura de *P. shigelloides* foi realizado segundo técnica descrita por Klipsten e Engert (1976), com algumas modificações. O sobrenadante de cultura foi coletado através de centrifugação (12.000 xg, 25 min, 4 °C) e submetido à ultrafiltração em sistema Amicon (Millipore), em membrana XM-300 (peso molecular > 300 kDa), sendo excluídas as proteínas maiores que 300 kDa, e após, em membrana XM-50 (Peso molecular > 50 kDa), sendo excluídas as proteínas menores que 50 kDa. Este material foi concentrado até o volume de 10 mL e avaliado quanto à atividade citotóxica em células Vero e realizada a dosagem protéica.

4.6.3 Processos Cromatográficos

Diversos processos de cromatografia foram testados, visando encontrar a melhor seqüência de purificação para o fator enterotóxico citotóxico letal. O fator de maior dificuldade encontrado foi à capacidade da toxina em agregar-se a sais e, conseqüentemente dificuldade em torná-la solúvel.

4.6.3.1 Cromatografia de Exclusão Molecular

O sobrenadante concentrado através da ultrafiltração em sistema Amicon em membrana XM-50, foi centrifugado em filtros 5000 MWCO (Amicon Ultra – 15 – Centrifugal Filter Devices – Millipore) a 5000 xg por 15 min (centrifuga Hitachi – modelo himac CF 15D2) reduzindo o volume de 10 mL para 3 mL (1000 vezes do volume inicial de 3 L). Este material foi processado pelo sistema de cromatografia líquida de rápida performace (FPLC) (sistema AKTA – Amersham Biosciences), a temperatura ambiente com coluna em resina de gel filtração Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia). A coluna foi equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0 (Sigma), e alíquotas de 300µL da amostra foram aplicadas por cromatografia. O material aplicado foi eluído com tampão Tris-HCl 0,02 M, pH 8,0, sendo coletadas frações de 1 mL/tubo, num fluxo de 0,1 mL por minuto.

As frações com atividade citotóxica foram concentradas por centrifugação a 5000 xg por 20 min (centrifuga Hitachi – modelo Himac CF 15D2), utilizando filtros para centrifugação 5.000 MWCO (Amicon Ultra – 15 – Centrifugal Filter Devices – Millipore), em um volume de 3 mL e o material armazenado a –20 °C até ensaios posteriores.

4.6.3.2 Cromatografia de Exclusão Molecular II

A fração com atividade citotóxica da cromatografia em gel filtração concentrada, foi aplicada na mesma coluna de gel filtração Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia) em sistema AKTA FPLC (Amersham Biosciences), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8.0. Foram aplicadas alíquotas de 300 µL por

cromatografia e o material foi eluído com tampão Tris-HCl 0,02 M pH 8,0, em fluxo de 0,05 mL/min, em 1 volume de coluna. Foram coletadas frações de 0,5 mL.

As frações com atividade citotóxica foram concentradas por centrifugação seguindo a mesma técnica descrita no item 4.6.3.1. em um volume de 3 mL e foi o material armazenado a -20°C , até ensaios posteriores.

4.7 Determinação da Concentração Protéica

A determinação da concentração protéica foi realizada por absorbância segundo a fórmula: Proteína (mg/mL) = $1,55 A_{280\text{nm}} - 0,76 A_{260\text{nm}}$ (Baines, 2001) e segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando kit de reagentes da empresa Bio-Rad, contendo a solução de Bradford concentrada (Coomassie Brilliant Blue G-250, 25% de metanol e 50% de ácido fosfórico). Para determinar a curva padrão, foi utilizado Soro-Albumina Bovina (BSA) (Bio-Rad), variando a concentração entre 0,2 e 0,9 mg/mL. Os ensaios foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8 Análise Eletroforética

4.8.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Denaturantes (SDS-PAGE)

As corridas em gel SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio) foram realizadas como descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados, gel de separação a 10% de acrilamida e gel de concentração a 8% de acrilamida sob condição denaturante (0,1% de SDS). O tampão de corrida utilizado continha Tris-HCl 0,025M, pH 8,3; glicina 0,192M e SDS 0,1%. Para a estimativa do peso molecular do ECL foram utilizados padrões de peso molecular conhecidos contendo 15 proteínas com pesos moleculares variando entre 10 e 220 kDa (Pharmacia). Aliquotas de 20 μL das amostras e os marcadores de peso molecular foram misturados (v/v) com solução tamponante de amostra (Tris-HCl 0,125M pH6,8, SDS 4%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 10% e Azul de Bromofenol 0,02%). Para garantir as condições não redutoras foi usada a mesma solução

tamponante sem β -mercaptoetanol. Em ambos os casos as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min. Nas corridas eletroforéticas em cuba de mini-gel (Amersham Biosciences) realizadas em temperatura ambiente, foi utilizada amperagem constante de 15 mA. Na primeira etapa, foi aplicada uma corrente de 80 Volts, até a penetração das amostras no gel de resolução, durante 1 hora e na segunda etapa a corrente foi de 100 Volts por aproximadamente 3 horas, até que o indicador (azul de bromofenol) atingisse o final do gel de resolução.

4.8.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Não Denaturantes (PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida nativo-PAGE foram realizadas como descrito por Davis (1964), utilizando um sistema de eletroforese vertical Mini-Protein II (Bio-Rad). O gel de resolução foi preparado a 10% de acrilamida, o gel de concentração a 8% de acrilamida e o tampão de corrida contendo Tris 0,025 M; glicina 0,192 M pH 8,3. As amostras foram misturadas com o tampão de amostra (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,025%), aplicadas no gel e submetidas a uma corrente de 50 V até o corante atingir o gel de resolução e a 80 V até o corante atingir a extremidade inferior do gel.

4.8.3 Coloração dos Géis

Para a coloração dos géis, foi utilizada a metodologia descrita por Blum et al. (1987). Após a corrida eletroforética, os géis foram imersos por 60 min em uma solução fixadora (50% de etanol, Merck; 12% de ácido acético glacial, Merck; e 0,5 mL/L de formaldeído) e, posteriormente, lavados em solução de etanol 50% por 3 vezes sob agitação, em ciclos de 20 min. A seguir os géis foram imersos em uma solução de pré-tratamento, tiosulfato de sódio a 0,02% ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) por 1 min, e lavados três vezes com água destilada. A impregnação com prata foi realizada usando uma solução de prata (AgNO_3 0,2% e formaldeído 0,075%), com agitação por 20 min, e lavados três vezes com água destilada. A seguir foi utilizada uma solução reveladora (Carbonato de Sódio 6%, tiosulfato de Sódio 0,4% e formaldeído 0,05%), até o surgimento das bandas protéicas. A reação foi interrompida com uma solução de Etanol 50% e ácido acético glacial 12%. Após 10

minutos nesta solução, os géis foram mantidos em uma solução de 5% de ácido acético até a secagem.

4.9 Caracterização Físico-Química do ECL

Para a caracterização físico-química, foi utilizado o ECL em concentração de 20µg/mL em tampão Tris-HCl 0,02M pH8,0, com título de 1:64. Os testes foram realizados em placas de 96 cavidades com células Vero, Caco-2, HT-29 e HEp-2, utilizando alíquotas de 50µL de solução de toxina em diluições seriadas na razão 2.

4.9.1 Teste de Termoestabilidade

A termo-estabilidade foi avaliada pela manutenção da toxina ECL em diferentes temperaturas. A toxina foi mantida a -70, -20 e 4 °C por 12 horas e aquecida a 50 °C por 5 min, 55 °C por 5 e 30 min, e a 60 °C e 100 °C por 15 min. As análises para detecção da atividade citotóxica foram realizadas através de ensaio de atividade citotóxica em células Vero, Caco-2, HT-29 e HEp-2.

4.9.2 Ensaio de Atividade Proteolítica

4.9.2.1. Atividade Proteolítica da Caseína Através da Técnica de Difusão em Placa de Ágar – Skimmed Milk

Este ensaio foi realizado segundo metodologia descrita por Song et al (2004). Foram preparadas placas de petri com 1% de ágar, contendo 1,5% de *skimmed milk*. Várias concentrações do ECL foram aplicadas em pequenos orifícios feitos em diferentes pontos do ágar, e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A formação de halo foi o indicativo da presença de atividade proteolítica da caseína. Como controles negativos foram utilizados PBS 0,005 M e sobrenadante de cultura da amostra AS 36.

4.10 Caracterização Sorológica do ECL

4.10.1 Obtenção do Antisoro

Inicialmente, para a produção do antisoro, dois coelhos albinos da raça New Zeland pesando em torno de 1.800 a 2.000 g cada um, foram inoculados por via intramuscular, com doses de 100 µg da toxina ECL, segundo metodologia descrita por Stroeher et al. (1993), emulsionada em adjuvante completo de Freud. Após 15, 30 e 45 dias os coelhos foram reinoculados por via intradérmica com a mesma concentração de toxina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund. Após 15 dias de cada inoculação feitas com adjuvantes incompletos, foram realizadas sangrias para os testes de soroneutralização.

4.10.2 Teste de Soroneutralização com o Antisoro Produzido

Para os testes de neutralização, os soros obtidos bem como os soros pré-imunes dos coelhos foram descomplementados através de aquecimento a 56 °C por 30 minutos.

Alíquotas de 50µL dos diferentes soros a serem testados foram diluídos na razão 2, sucessivamente, em meio MEM. O mesmo volume da toxina ECL foi adicionado em cada orifício das placas de 96 cavidades. As placas foram submetidas a dois tempos de incubação diferentes: a 37 °C por 1 hora, seguido de incubação a 4 °C por 18 horas. A atividade citotóxica foi testada pela transferência das soluções (soro mais toxina) para placas de cultura de células Vero, CHO, HeLa, HEP-2, HT-29 e CaCo -2., que posteriormente foram incubadas por 24 horas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Foi considerado como título da soroneutralização a maior diluição do soro necessária para a completa neutralização da atividade citotóxica.

4.10.3 Inibição da Atividade ECL por Soro

No teste de inibição da atividade ECL foram utilizados antisoro anti-LT-I, anti-CT (produzidos em Laboratório de Pesquisa do ICB-USP), anti-Aerolisina (Falcón et

al, 2003), o antisoro Hly AS36 (Martins et al. (2007), que foram diluídos serialmente em PBS na razão dois (até 1/1024) e adicionada à toxina ECL (2 x CD₅₀). Após incubação por 60 min a 37 °C, 0.1 mL da mistura foi transferida para placas de 96 poços contendo células Vero e HT-29. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 h e examinadas para análise morfológica.

4.10.4 Western Blot

Inicialmente foi realizada eletroforese do ECL e análise em gel a 10% SDS-PAGE em condições redutoras. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare Biosciences, São Paulo-SP, Brasil) segundo método de Towbin et al. (1979). A transferência foi conduzida a uma voltagem de 12 V durante 90 min.

Após a transferência, todas as etapas de lavagem e incubação foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação suave. A membrana foi bloqueada em tampão TBS-T (10 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20, pH 7.5) com 5% de leite desnatado por 2 h em temperatura ambiente e posteriormente incubada com o tampão e 1% de leite desnatado contendo um antisoro policlonal de camundongo da enterotoxina anti-LT-I (Anti-LT-I 1:500) por 2 h a 37 °C. Após esse tempo, a membrana foi lavada quatro vezes (10 min cada) com TBS-T, e finalmente incubada com um anticorpo secundário (anticorpo Ig anti-camundongo peroxidase-conjugada) (Sigma) (1:1000) em tampão TBS-T com 1% de leite desnatado por 90 min a 37 °C. Após incubação, a membrana foi lavada quatro vezes com tampão TBS-T. A atividade peroxidase foi revelada usando um substrato quimioluminescente (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). A toxina LT-I da cepa H10-407 foi usada como controle positivo.

4.11 Estudos Moleculares

4.11.1 Extração do DNA para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As 6 amostras de *P. shigelloides* foram cultivadas em meio BHI, a 37 °C por 18 horas. Após o crescimento, foram semeadas em ágar TSA a 37 °C por 24 horas. Um raspado de cada amostra foi ressuspenso em 100 µL de água deionizada

estéril. A suspensão bacteriana foi fervida por 1 min e centrifugada a 10.000 rpm por 2 min. Os sobrenadantes destes materiais foram utilizados para a reação de PCR (Blanco et al., 1997).

4.11.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para cada um dos genes já descritos na literatura: *stx1* e *stx2* (Shiga-like toxinas ou verotoxinas), *stx2v* (Shiga-like toxina variante), *eltIA* e *eltIIA* (toxinas termolábeis de *E.coli*), *stlA* e *st1B* (toxinas termoestáveis de *E.coli*), *cdtB* (toxina citoletal distensora), *cnfs* (fator necrosante citotóxico) e *HlyA* (proteína estrutural hemolítica), *Enhly* (enterohemolisina).

A seqüência dos iniciadores, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos amplificados estão especificados na Tabela 4.

Os reagentes utilizados para as reações de PCR com cada um dos genes mencionados estão indicados na Tabela 5.

Tabela 4. Sequência de Primer, temperatura de anelamento e tamanho do produto amplificado (pb).

Gene	Sequência de oligonucleotídeos (5' → 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)	(ng/μL)	Temp. de anelamento °C	Referência
Stx1	1: AAG TTG CAG CTC	364	90	53	1
	TCT TTG AAT A				
	2: TGC AAA CAA ATT ATC				
	CCC TGA G				
Stx2	1: GGG CAG TTA TTT	386	60	53	1
	TGC TGT GGA				
	2: GTA TCT GCC TGA				
	AGC GTA A				
EltIA	1: GGC GAC AGA TTA	696	300	47	2
	TAC CGT GC				
	2: CCG AAT TCT GTT ATA				
	TAT GTC				
EltIIA	1: AGA TAT AAT GAT GGA	300	300	48	2
	TAT GTA TC				
	2: TAA CCC TCG AAA TAA				
	ATC TC				
EstI	1:TCC GTC AAA CAA CAT	244	60	50	3
	GAC GC				
	2: ATA ACA TCC AGC				
	ACA GGC AG				
EstII	1:GCC TAT GCA TCT ACA	278	150	50	1
	CAA TC				
	2:TGA GAA ATG GAC AAT				
	GTC CG				
HlyA	1: AAC AAG GAT AAG	1177	60	63	4
	CAC TGT TCT GGC T				
	2: ACC ATA TAA GCG				
	GTC ATT CCC GTC A				
Enhly	1: AAT GAG CCA AGC	534	90	50	5
	TGG TTA AGC T				
	2: GCA TCA TCA AGC				
	GTA CGT TCC				

- 1 . Paton e Paton, 1998;
2. Swedlow et al., 1992;
3. Takeda et al., 1991;
4. Yamamoto et al., 1995;
5. Sears e Kaper, 1996.

Tabela 5. Reagentes e concentrações utilizadas nos ensaios de PCR.

Reagentes	Volume (µL)	Concentração final
10 x “PCR buffer” (Biotools)	3	1x
10 mM “dNTP” (Biotools)	0,6	0,2 mM de cada dNTP
Iniciador 1	-	Tabela 1
Iniciador 2	-	Tabela 1
50 Mm MgCl ₂	1,2	2,0
DNA extraído	7	-
Taq-DNA polimerase (5U) (Biotools)	0,2	1,0 U
Água deionizada q.s.p 30 µL	-	-
Total	30	-

Reações: 30 ciclos;

Denaturação inicial: 94 °C por 5 min;

Denaturação: 94 °C por 1 min;

Anelamento: temperatura variável para cada primer (2 min);

Extensão: 72 °C por 2 min.

4.11.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Para a leitura do resultado das amplificações, 5 µL do tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xilenocianol; 25% de ficol) foi misturado ao produto da reação. Foram aplicados 10 µL da mistura no poço preparado em gel de agarose 2% (Amersham Pharmacia Biotech/Suécia), em tampão Tris 2M, ácido acético 0,04M, EDTA 0,01M pH8 (T.A.E). A identificação da banda foi realizada mediante coloração com solução de brometo de etídeo (1,5 µg/mL) por 15 minutos e visualizada em transluminador de luz UV.

4.12 Caracterização Biológica do Fator Fitotóxico Letal.

Para os ensaios de caracterização biológica, utilizamos o ECL e como controles negativos a amostra 1P9-75 de *P. shigelloides* (não produtora de toxinas) e a amostra de *E. coli* K12/711 e como controle positivo de atividade citotóxica, a amostra *A. hydrophila* AH191 e a *A. sobria* (AS 35).

4.12.1 Realização dos Ensaios *in vitro*

4.12.1.1 Preparo das Culturas Celulares

Foram utilizadas células Vero, CHO, HeLa, HEp-2, HT-29 e CACO-2.

As células foram cultivadas como descrito no item 3.2. Em seguida foram transferidas para placas de 24 orifícios contendo lamínulas de vidro. As placas foram incubadas a 37 °C sob atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas para as células VERO, CHO, HeLa, HEp-2 e por 72 horas para as células CACO-2 e HT-29.

4.12.1.2 Determinação da Viabilidade Celular (CD₅₀)

O teste de viabilidade celular por coloração com Vermelho Neutro foi realizado com células Vero, segundo metodologia descrita previamente por Borenfreund e Puerner (1984).

A toxina ECL foi aplicada sobre o tapete celular em concentrações que iniciaram com 5, 4, 3, 2, 1, 0,7, 0,5, 0,3, 0,1 e 0,001 µL. Após intervalos de tempo de 15, 30 min., 1, 2, 3 horas, até 24 horas de aplicação das diferentes concentrações do ECL, o meio foi removido e a cultura lavada com salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4. Para cada cavidade, foram adicionados 0,2 mL de solução de meio MEM contendo 50 µg/mL do corante Vermelho Neutro e a placa foi novamente incubada por 3 horas a 37 °C, para incorporação do corante pelos lisossomos das células viáveis. Após a incubação, o meio contendo o corante foi desprezado e as cavidades foram lavadas rapidamente com solução de cloreto de cálcio e formol (na proporção 4/1) para retirada do corante não incorporado pelas células. Finalmente, 0,2 mL de solução de ácido acético-etanol (1% de ácido acético glacial em etanol 50%) foram adicionados em cada cavidade, sendo a placa mantida por 15 min em temperatura ambiente para remoção do corante das células viáveis.

A medida da absorção e posterior liberação do corante foi verificada em leitor de ELISA (Labsystem Multiskan Bichromatic) utilizando filtro de 540 nm. Dois orifícios da placa na primeira coluna receberam meio sem o corante Vermelho Neutro para servir como branco. Como controle, alguns orifícios não receberam o ECL. A viabilidade celular foi determinada por comparação dos valores de

absorbância obtidos nos orifícios controle (sem o ECL), os quais foram considerados como 100% de viabilidade celular. Ensaio realizado em quadruplicatas.

4.12.1.3 Estudo da Integridade da Membrana

Para a realização do estudo da integridade da membrana celular foi realizado o teste de LDH. A medida da liberação de enzimas citoplasmáticas em culturas celulares após exposição a agentes tóxicos, representa um método para se determinar citotoxicidade e danos na membrana celular. Sendo o LDH um dos tipos de enzimas mais comumente encontrados nas células, a sua liberação pode ser medida e usada como um indicador de células danificadas em todos os tipos de culturas celulares.

O ensaio do LDH foi realizado segundo metodologia descrita por Mitchell et al. (1980). As células de cultura foram cultivadas em monocamada como descrito no item 3.2, lavadas com PBS e, em seguida, adicionado meio de cultura MEM sem SFB, contendo diluições seriadas da toxina ECL (iniciando com 1:4). Após 2 horas de incubação a 37 °C, o meio de cultura foi coletado separadamente em tubos, mantidos em banho de gelo e foram centrifugados a 1.500 rpm por 5 minutos. A reação catalisada pela LDH foi acompanhada em cubetas descartáveis, pela adição de alíquotas de 80 µL do meio de tratamento, com volume final de 2,5 mL de tampão fosfato [KH_2PO_4 (2,18g/L) + Na_2HPO_4 (22,47g/L) 0,1 M, pH 7,4 contendo NADH (25 mg/mL) e piruvato de sódio (1 mg/mL)]. A reação foi medida em espectrofotômetro (DW 2000), acompanhando a catálise da redução de piruvato a lactato, através da medida do desaparecimento de NADH. O consumo de NADH foi acompanhado pela sua absorção específica em comprimento de onda de 340 nm, em intervalos de 30 segundos, durante 3 min.

O cálculo da variação média da absorbância foi realizado subtraindo-se os valores de absorbância entre 2 intervalos de tempo de 60 segundos, p. ex. $-A_{90s}$; determinando-se assim, a média (M) dos 4 intervalos de leitura. A atividade da LDH foi então determinada pela fórmula: Unidades LDH/mL = M (abs.) x D x F, onde D= fator de diluição (10.000); F= fator de temperatura a 30 °C, 1.16.

4.12.1.4 Teste de Citotoxicidade em Cultura de Células

Estes ensaios foram realizados segundo técnica descrita por Konowalchuck et al. (1977) com algumas modificações. As células foram cultivadas em placas de 24 orifícios, contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. Após a formação da monocamada celular, o meio foi substituído por 950 µL de meio MEM contendo 1% de Ciprofloxacina e 50 µL da toxina ECL. Como controles negativos foram utilizados o meio LB e as amostras 1P9-75 e *E. coli* K12/711 e como controle positivo *A. hydrophila* AH191 e *A. sobria* (AS 36). As placas permaneceram incubadas em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C por 15, 30, 60, 90 e 120 min. Após estes períodos, o meio de cultura com o ECL foi removido e as células lavadas seis vezes com PBS, fixadas com Metanol PA por 30 min e coradas por 10 minutos com solução May-Grünwald diluído 1:2 (v/v) em tampão Sørensen num volume suficiente para cobrir toda a camada celular. Em seguida, a solução de May-Grünwald foi retirada e substituída pelo corante Giemsa diluído 1:3 (v/v) em tampão Sørensen durante 20 min. Após este período, as lamínulas foram lavadas em água corrente, retiradas dos orifícios e após secarem foram montadas sobre lâminas de microscopia, visualizadas em microscopia óptica com objetivas de imersão e posteriormente fotografadas.

4.12.1.5 Teste de FAS (*Fluorescent Actin Staining*)

O teste de FAS foi realizado seguindo a metodologia descrita por Knutton et al. (1989). Inicialmente, as células Hep-2 e HeLa foram cultivadas em placas de 24 orifícios, contendo lamínulas de 13 mm de diâmetro. Após a formação da monocamada celular, o meio de cultura foi descartado e os tapetes celulares foram lavados três vezes com PBS 0,01 M (pH 7,4). Em seguida foi adicionado 1 mL de meio MEM suplementado com 2% de Soro Fetal Bovino (SFB). A cada orifício foram adicionados 50 µL da toxina ECL. Após a preparação em duplicata, as placas foram incubadas nos tempos de 30, 60, 90, 120 min. Depois da incubação, as monocamadas foram lavadas com PBS 0,01 M (pH 7,4) por seis vezes e em seguida fixadas com Metanol e Ácido Acético (3:1) por 15 min. Logo após, os orifícios foram novamente lavados com PBS para a remoção do fixador e, em seguida, os tapetes

celulares foram lavados com uma solução de 0,1% Triton X-100 em PBS por 5 min. O objetivo deste procedimento foi permeabilizar as células para permitir acesso da rodamina ao compartimento intracelular. Após este procedimento, os tapetes celulares foram lavados três vezes com PBS, e acrescentada uma solução de rodamina – FITC Labeled (SIGMA) conjugada à fluoresceína, preparada em PBS, na concentração de 5 µg/mL. Este material permaneceu incubado por um período de 30 min protegido da incidência de luz. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes com PBS e montadas em glicerol-PBS (9:1). Finalmente as lamínulas foram observadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse E-800).

4.12.1.6 Detecção da Indução de Apoptose pelo ECL em Linfócitos

4.12.1.6.1 Preparo da Cultura de Linfócitos

Em um tubo estéril, com 3 mL de Ficoll (Sigma) na densidade de 1.077g/mL, foi acrescentado 5 mL de sangue humano do tipo O e centrifugado a 1200 rpm por 30 min para a separação por densidade dos linfócitos. Os linfócitos foram coletados com pipeta Pasteur na nuvem formada acima do Ficoll, e depositados em tubo Falcon onde foram novamente centrifugados e lavados com tampão Hanks (Nutricell) para a retirada do Ficoll e mais 2 vezes com PBS. Após a retirada do Ficoll, foram depositados em uma placa de petri e deixados na estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 2 horas, para os macrófagos aderirem a placa. Em seguida, as células foram resuspendidas em meio RPMI e observadas em microscópio (câmara de Neubauer) e depositadas em placas de 24 orifícios (1x10⁶ céls/mL).

4.12.1.6.2 Realização do Teste de Apoptose

O ensaio para detecção de apoptose foi realizado segundo técnica descrita por Vermes, et al., 1995, utilizando células cultivadas de linfócitos humanos. As células foram inoculadas com doses fixas (18 µg/mL) do ECL e o ensaio foi realizado usando Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences). A análise foi realizada em citometria de fluxo após 1 hora de aplicação da toxina. Como controle negativo foi utilizado células não tratadas com a citotoxina; o teste foi realizado em duplicata.

4.12.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em Células Vero

A monocamada de células Vero foi fixada com solução contendo 50% de solução fixadora com 2% de paraformaldeído (Sigma, St Louis, USA) e 2 % de glutaraldeído (Electron Microscope Science, USA) em 10 mM de tampão Cacodilato, pH 7,4 e 50% de meio de cultura (MEM) por 15 min. Após este procedimento o material foi desidratado em um gradiente crescente de etanol (50% a 100%) e em seguida imerso em óxido de propileno e Epon 812 (Electron Microscope Science, USA) na razão de 1:1 e 1:3, respectivamente, por 6 h e em seguida em resina pura por 12 h. Após este tempo o material foi colocado em moldes contendo resina fresca para a polimerização final por 72h a 60 °C. Secções ultrafinas foram cortadas usando ultramicrotomo LKB e coradas com 2% de acetato de uranila (Fluka, Switzerland) e 0,5% citrato (Fluka, Switzerland) próprio para examinar e documentar em microscópio eletrônico de transmissão (LEO-Schot Zeiss EM906 80 kVa), Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp.

4.12.1.8 Teste de Adesão em Linhagens Celulares

Para a realização destes ensaios foram utilizadas células de linhagens HeLa e HT-29. Os ensaios foram realizados segundo a técnica descrita por Scaletsky et al. (1984), utilizando monocamada celular.

4.12.1.8.1 Cultivo das Linhagens Celulares

As linhagens celulares HeLa e HT-29 foram cultivadas como descrito no item 9.2, em seguida transferidas para placas de 24 orifícios contendo lamínulas, em volume de 1 mL de suspensão celular por orifício, numa concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ durante 24 horas para as células HeLa e por 48 horas para as células HT-29.

4.12.1.8.2 Realização do Teste de Adesão

Os testes de adesão foram realizados segundo técnica descrita por Scaletsky et al. (1984), utilizando células HeLa e HT-29, na ausência ou presença de D-manose

para verificar possível inibição da adesão bacteriana devido à fimbria do tipo I (OLD, 1972).

Inicialmente, o meio de cultura foi removido dos orifícios das placas e as células foram lavadas por cinco vezes com PBS estéril. Em seguida, adicionou-se 1 mL de meio MEM com 2% de SFB (para os testes com D-manose foi acrescentado 1% deste açúcar). Alíquotas de 25 µL da cultura bacteriana e 25 µL de bactérias lavadas, cultivadas em meio LB a 37 °C durante 12 horas, foram inoculadas sobre a monocamada celular. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C em 5% de CO₂ pelo período de 30, 60, 90 e 120 min. Após cada tempo, o meio de cultivo foi removido e as células lavadas 6 vezes com PBS, fixadas com 1 ml de metanol e ácido acético (3:1). Após 30 minutos seguiu-se a coloração por 10 min com May Grunwald diluído com tampão Sørensen (1:2, v/v) e por 20 min com Giemsa diluído com tampão Sørensen (1:3, v/v). As lamínulas foram lavadas em água corrente, retiradas das placas e deixadas para secar em estufa. Posteriormente foram montadas sobre lâminas utilizando Entellan (Merck-Germany). O material foi observado em microscópio Axioskop (Zeiss), Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP.

4.13 Testes de Patogenicidade *in vivo*

4.13.1 Atividade Enterotóxica em Camundongos Recém-Nascidos (CRN)

O ensaio em camundongos recém-nascidos foi realizado como descrito por Dean et al. (1972). Para cada diluição analisada foram utilizados quatro animais com quatro dias de vida, pesando entre 1,9 a 2,3 g. Os testes foram realizados com a toxina ECL diluída seriadamente na razão 2. Em cada diluição um volume de 100 µL foi adicionado a 800 µL de PBS e mais 100 µL de azul de Evans a 2% (Sigma). Em seguida 100 µL do preparado foi inoculado por via intragástrica, com auxílio de uma cânula de silicone. Os animais foram mantidos em temperatura ambiente, durante 3 horas, e em seguida sacrificados com éter. O grau de acúmulo de fluido intestinal foi determinado pela taxa de peso do intestino (PI) dividido pelo peso da carcaça (PC). Foram considerados positivos valores iguais ou superiores a 0,08.

4.13.2 Atividade Enterotóxica em Alça Ligada do Intestino de Coelhos

Os testes de acúmulo de fluido em alças ligadas de coelho foram realizados como descrito por Bergdoll (1988), utilizando cultura bacteriana, sobrenadante da cultura bacteriana e amostra da toxina ECL, injetados em diferentes porções do intestino delgado. Foram utilizados coelhos albinos machos da raça New Zealand, pesando entre 1,5 a 2,0 kg e mantidos em jejum por 24 horas antes do ensaio. Para a cirurgia os animais foram sedados por via intramuscular com Fentanil (0,005 mg/kg) e Droperidol (1 mg/kg) (Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda). Após este procedimento, foram analgesiados por via epidural com morfina (0,1 a 0,3 mg/kg) (Labesfal) e anestesiados intramuscularmente com Zoletil (20 a 30 mg/kg) (Virbac). A morfina mantém o animal analgesiado por 24 horas. O intestino foi exteriorizado através de uma incisão mediana. O lúmen intestinal foi lavado três vezes com solução salina, e foi realizada uma série de segmentos intestinais ligados (alças) de 5 cm de comprimento, separados por interalças de 3 cm de comprimento. Em cada alça foi inoculado 1 mL de solução da amostra a ser avaliada. Os animais foram mantidos por 18 horas e posteriormente sacrificados por aprofundamento de anestesia. O intestino delgado foi retirado, sendo realizadas medições do volume de líquido acumulado em cada alça e do comprimento da mesma. O coeficiente TIL (volume de líquido acumulado em cada alça e o comprimento em cm) foi considerado positivo para valores superiores a 1 mL/cm (Blanco e Blanco, 1993). Como controle negativo foi utilizado o meio LB suplementado com glicose.

4.13.3 Letalidade em Camundongos

Para este experimento foram utilizados camundongos da raça BALB/C machos com peso entre 25 –30 g (5-6 semanas de vida) (CEMIB, UNICAMP), em número de cinco animais por grupo, num total de 8 grupos. Os animais de cada grupo foram inoculados com 150 µL da solução com a toxina ECL (200 µg/mL, diluídos na razão 2 em tampão Tris-HCl 0,02M) através de injeções via intraperitoneal (v.i.p.) e intravenosa (v.i.v.) com seringas de insulina. Como controle negativo um grupo de animais foi inoculado com meio de cultura LB e outro grupo com a toxina ECL aquecida por 15 min a 100 °C. Os animais foram mantidos em

temperatura ambiente e observados constantemente durante 24 horas (Salvadori *et al.*, 2002).

4.13.4 Demonstração de Cardiotoxicidade

Eletrocardiografia e medida da pressão arterial foram realizadas nos testes de cardiotoxicidade. Ratos da raça Wistar, fêmeas, albinas, pesando 200 g (90 dias de vida) e 50 g (30 dias de vida) (CEMIB, UNICAMP) e, camundongos fêmeas da raça BALB/c, albinas, pesando de 30 a 45 g (5 a 6 semanas de vida) (CEMIB, UNICAMP), em número de 6 animais por grupo foram utilizados neste experimento. Os animais foram anestesiados com halotano (indução - ratos de 2 a 3%, camundongos 2 a 4%; manutenção - ratos 1%, camundongos 2%) (Cristália – Prod. Quím. Farm. Ltda) e ar medicinal, em sistema de vaporização (Vaporizador Dräger) (Wixson *et al.*, 1997). A toxina ECL foi injetada na veia caldal, sendo que os ratos de 200 g receberam 7 µg da toxina, os ratos de 50 g e os camundongos receberam 2,5 µg da toxina. Foi utilizada também no experimento, a toxina fervida por 15 min á 100 °C. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

O eletrocardiograma e a medida da pressão arterial foram realizados no mesmo aparelho (Fisiógrafo – BESE – Belo Horizonte-MG) A medida da pressão arterial foi realizada em ratos com 90 dias. A carótida foi pinçada e uma cânula inserida, ligada aos Domos de pressão arterial (Edwads Lafiscience).

Para a execução do eletrocardiograma 4 *leads* foram usados: um dos eletrodos na perna dianteira esquerda, um eletrodo na perna dianteira direita, um eletrodo na perna traseira esquerda e um eletrodo na perna traseira direita.

Os testes foram realizados no Núcleo de Cirurgia Experimental do Centro de Medicina – UNICAMP.

4.14 Estudo das Alterações Morfológicas Induzidas pelo ECL em Células Epiteliais Intestinais de Coelhos

4.14.1 Microscopia de Luz

Segmentos de 1 cm das alças intestinais ligadas de coelho tratadas com ECL foram fixados com Paraformaldeido 4% (v/v) em PBS 10 mM pH 7,2 por 24 horas e

em seguida lavados com o mesmo tampão por mais 24 horas. O material foi desidratado em gradiente de concentrações de Etanol, em escala crescente (70% - 100%), por 30 min em cada concentração. Após a desidratação, os tecidos foram diafanizados com Xilol, gradativamente (Álcool – Xilol até Xilol puro), durante 15 min cada imersão. A embebição em parafina seguiu o mesmo critério, Xilol – parafina (30 min a 60 °C), parafina (3 horas a 60 °C) e inclusão em parafina.

Após a solidificação da parafina, foram realizados cortes finos de 5 µm deste material em micrótomo, fixados em lâminas com Soro Fetal Bovino, desparafinizados por imersão das lâminas 3 vezes em Xilol por 10 min cada, hidratados por gradiente crescente de concentração de Etanol (P.A.- 70%), por 5 min cada imersão. Os cortes foram corados com Hematoxilina Erlicl (5 min) e EosinaY (8 min) e novamente desidratados (Etanol 95% por 5 min e Etanol P.A. 3 vezes de 5 min), diafanizados (Etanol mais Xilol por 5 min e Xilol 2 vezes de 5 min) e montados com lamínulas coladas com Bálsamo do Canadá Sintético. Para a visualização das lâminas foi utilizado microscópio de luz (Axiooskop, Zeiss), Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp.

4.14.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Fragmentos de tecido intestinal coletados das alças intestinais ligadas nas regiões proximal, central e distal das regiões do jejuno, ceco e cólon dos coelhos tratados com a toxina ECL de *P. shigelloides*, foram preparadas para microscopia de varredura. A fixação dos tecidos foi realizada com Glutaraldeído 2,5% (v/v) em 0,1M de tampão Cacodilato durante 4 horas a temperatura ambiente (Kitajima et al., 1999). Em seguida foram lavados com solução de lavagem glicosada e, pós-fixados durante 2 horas com Tetróxido de Ósmio (O₂O₄) 1% (v/v) e novamente lavados em solução glicosada. Posteriormente foram desidratados em gradiente crescente de concentração de Etanol (70% - 100%) e em seguida levados ao Ponto Crítico com CO₂. A amostra de tecido foram montadas imediatamente em Stabs e após secarem, cobertos com uma camada de ouro em evaporador Balzers (200 seg, 40 mA), para facilitar a observação em microscópio de varredura (JOEL MS 6300), Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, Unicamp.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Amostra Bacteriana Seleccionada para Produção do ECL

Das seis amostras de *P. shigelloides* examinadas, duas (9P3-1 e 8P4-1) apresentaram altos títulos da toxina ECL e mantiveram a expressão estável. O sobrenadante filtrado de ambas matam as células até a diluição 1:64 (Tab. 6), sendo assim, foram seleccionadas para a produção do ECL nos testes a serem realizados e para os processos de purificação.

Tabela 6. Produção do ECL por amostras de *P. shigelloides* em diferentes meios de cultura.

Linhagens	Meio de cultura/diluição				
	MSG	TSB	LB	BHI	MH
8P1-4	1:128	1:64	1:64	1:32	1:32
8P6-5	1:64	1:32	1:32	1:32	1:16
1P3-16	1:64	1:32	1:32	1:32	1:32
1P2-13	1:64	1:32	1:32	1:32	1:32
9P3-1	1:128	1:64	1:64	1:32	1:32
9P1-1	1:64	1:32	1:32	1:32	1:32

5.2 Influência de Diferentes Condições de Cultivo na Produção do Fator Citotóxico Letal

5.2.1 Diferentes Meios de Cultura, Influência do pH, Cultivo Estático ou com Agitação e Temperatura

Dos diferentes meio de cultura bacteriana analisados, verificou-se que o meio MSG foi o que proporcionou a produção de maior atividade citotóxica (ECL), partindo da diluição de 1:8 até 1:128. Os meios TSB e LB apresentaram efeito citotóxico até a diluição 1:64 e os demais meios, BHI e MH apresentaram resultados semelhantes (tabela 4).

O cultivo em pH neutro (7,0 a 7,5) foi o que apresentou maior atividade citotóxica (1:128), sendo que o cultivo em faixa de pH ácido diminui a atividade citotóxica e em faixa de pH alcalino praticamente não ocorre produção da citotoxina (Tabela 5).

A produção da citotoxina apresentou diferenças pouco significativa no cultivo bacteriano em aerobiose estática ou em agitação, mas em condições de anaerobiose a diferença foi bastante significativa. Apesar da diferença entre o cultivo bacteriano em aerobiose estática e com agitação ser pouco significante, a escolha foi pelo cultivo em aerobiose com agitação.

Como mostra a Tabela 7, a melhor temperatura de crescimento para produção da atividade citotóxica foi a 37 °C. Nas temperaturas de 4 °C a 10 °C, praticamente não houve produção do ECL. Bactérias cultivadas a 20, 24 e 40 °C tiveram baixa produção e, acima destes valores não ocorreu produção da citotoxina.

Tabela 7. Produção da atividade citotóxica ECL, obtidos no cultivo da amostras de *P. shigelloides* em diferentes condições de cultivo.

Efeito do Ph ¹	Produção do ECL ²
3,0	0,080
3,5	0,117
4,0	0,208
5,0	0,321
6,0	0,483
6,6	0,561
7,0	1,055
8,0	-
9,0	-
10,0	-
Temperatura ¹ / °C	
4	0
10	0
20	0,3355
24	0,3805
30	0,8345
37	1,0500
40	0,0210
50	0
60	0
70	0
Condições físicas de cultivo ¹	Título de produção do ECL ³
Estático	1:64
Agitação	1:128
Anaerobiose-Estática	1:8

¹ Linhagem 9P3-1 cultivada em LB

² Leitura em leitor de ELISA a 540nm do sobrenadante que produz atividade ECL

³ O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou atividade citotóxica.

5.2.2 Melhor Tempo de Incubação para Produção da Toxina

Uma curva de crescimento foi realizada utilizando o meio LB e a linhagem 9P3-1, observando o melhor tempo de cultivo para a obtenção do ECL no sobrenadante de cultura e, que melhor apresentasse efeito em ensaio com culturas celulares. A produção da toxina teve um aumento constante até 14 horas. Após este tempo ocorreu uma queda de produção de atividade citotóxica até o tempo de 18 horas. A produção reiniciou após este tempo e continuou constante até o tempo de 24 horas, voltando a cair até atingir um nível mínimo com 29 horas, subindo com 36 horas e assim sucessivamente até atingir 72 horas de crescimento com produção da toxina.

Os melhores tempos observados para o crescimento bacteriano com alta produção da toxina ECL são de 12 a 14 h, de 22 a 24 h, de 34 a 36 h, assim por diante até o tempo de 72 h. No tempo de 12 a 14 horas de crescimento a atividade citotóxica é mais intensa e existe pouco material bacteriano disperso no meio, como restos celulares e metabólicos. A escolha do tempo de 14 horas de cultivo bacteriano foi a ideal para a realização dos processos de purificação da proteína. A curva de crescimento para produção do ECL foi realizada 4 vezes e os resultados se repetiram.

5.2.3 Melhor Tempo de Incubação para Produção da Toxina Utilizando Inibidores de Proteases

Para definir por que ocorreram quedas na produção da toxina ECL durante alguns períodos de crescimento bacteriano, foram realizados testes com inibidores de proteases. Dos inibidores utilizados nos testes, aprotinina, uma serina protease foi o inibidor que conseguiu manter o nível de produção do ECL alto (Tab. 8).

Tabela 8. Produção da atividade citotóxica ECL, na presença de inibidores de proteases.

Inibidores	Tempo de crescimento				
	14 h	15 h	16 h	17 h	18 h
TPCK	-	-	-	-	-
LEUPEPTINA	-	-	-	-	-
PMSF	-	-	-	-	-
EDTA	-	-	-	-	-
EGTA	-	-	-	-	-
ODO ACETAMIDA	-	-	-	-	-
APROTIMINA	+	+	+	+	+
TLCK	-	-	-	-	-

(-) não ocorreu inibição de proteases

(+) ocorreu inibição de proteases

5.3 Detecção de Atividade Citotóxica *in vitro* em Diferentes Culturas Celulares

5.3.1 Teste de Citotoxicidade

Os resultados citotóxicos apresentados em células Vero, HeLa, HEp-2, CHO, CACO-2 e HT-29 foram:

- 1- Início da destruição do tapete celular 15 min após aplicação do sobrenadante filtrado chegando até a diluição 1:16;
- 2 – A partir da diluição 1:32 foi observado dilatações e arredondamento nas células, retração do núcleo, condensação e formação de vacúolos no citoplasma e rompimento do tapete. Estes efeitos citotóxicos, ocorreram no período de 1 hora após aplicação do sobrenadante.

Os efeitos citotóxicos (ECL) ocorreram até a diluição 1:128, iniciando na diluição 1:8. Estes efeitos iniciam com 15 minutos de inoculação do sobrenadante e seguem até 1 hora com total destruição do tapete celular, em todas as linhagens celulares testadas.

5.3.2 Determinação da Viabilidade Celular (CD₅₀)

O teste de viabilidade celular realizado com células VERO, CHO E HeLa, resultou em morte total das células até a diluição 1:64 e o CD₅₀ ocorre na diluição 1:256.

5.3.3 Termoestabilidade

O ensaio de termoestabilidade demonstrou que a atividade biológica é perdida quando o sobrenadante de cultura é submetido às temperaturas de 55 °C (30 min) e 60, 70, 80 e 100 °C (15 min). Em baixas temperaturas (-70, -20 e 4 °C), a proteína manteve-se estável.

5.4 DETECÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

5.4.1 Detecção da Atividade Hemolítica do ECL em Diferentes Condições de Teste

Como mostra a Tabela 9, os resultados da atividade hemolítica dos testes realizados em placas foram inferiores aos apresentados em tubos. Nos testes realizados com hemácias de carneiro ocorreu hemaglutinação e não hemólise.

A expressão da atividade hemolítica do ECL não apresentou variações significativas nos diferentes valores de pH. Nos testes usando hemácias de humano e boi, a atividade foi mais expressa (Tabela 10).

Na Tabela 11, podemos observar que os carboidratos D-glicose, sacarose, maltose e D-manose conseguiram inibir totalmente a atividade hemolítica dos sobrenadantes das linhagens testadas.

Tabela 9. Atividade hemolítica do ECL em tubos e placas.

Hemácias	LB	
	Tubos	Placas
Cobaia	1:64	1:32
Boi	1:64	1:4
Galinha	1:64	negativo
Carneiro	negativo	negativo
Cavalo	1:32	1:8

Tabela 10. Atividade hemolítica do ECL em diferentes pH.

pH	Hemácias		
	Cavalo	Boi	Humano
5,5	1:32	1:64	1:64
6,0	1:32	1:64	1:64
6,5	1:64	1:128	1:128
7,0	1:64	1:128	1:128
7,4	1:64	1:128	1:128
8,0	1:64	1:128	1:128
8,5	1:32	1:128	1:64

Tabela 11. Atividade hemolítica do ECL frente a carboidratos.

Açúcares	Título da atividade	
	9P3-1	8P1-4
D-glicose	0	0
Sacarose	0	0
Fructose	1:	1:16
D-sorbitol	1:16	1:32
Maltose	0	0
D-galactose	1:8	1:32
D-manose	0	0
Arabinose	1:32	1:32
Adonitol	1:32	1:32

5.5 Purificação da Toxina ECL

5.5.1 Produção da Toxina ECL

5.5.1.1 Precipitação com Sulfato de Amônio

Na precipitação com sulfato de amônio do sobrenadante de cultura de *P. shigelloides* 9P3-1, os melhores resultados (1:64) foram obtidos na faixa de saturação de 60% e 80% (o sobrenadante apresentou efeito citotóxico até 1:256).

5.5.1.2 Precipitação com Álcool e Acetona

Os resultados obtidos após diálise, concentração e aplicação em células Vero do material precipitado com álcool e acetona ficaram muito abaixo do título inicial (1:8).

5.5.1.3 Fracionamento por Ultrafiltração

Através da ultrafiltração do sobrenadante de cultura de *P. shigelloides* 9P3-1 em sistema Amicon com membranas XM 300, XM50 e PM 10, verificaram-se os seguintes resultados quando inoculados em células Vero:

Fração concentrada na membrana XM 300 causou efeito não definido;

Fração concentrada na membrana XM 50 causa morte celular (1:256);

Fração concentrada na membrana PM 10 causa efeito não definido;

Fração filtrada pela membrana PM 10 não causou efeito citotóxico.

5.5.2 Processos Cromatográficos

5.5.2.1 Cromatografia de Exclusão Molecular

A Figura – 1 representa os perfis eletroforéticos das cromatografias. As frações que apresentaram atividade biológicas estão nos tubos 7 e 8 e, foram concentradas (filtros 5.000 MWCO - centrifugação) em volumes de até 3 mL. A atividade citotóxica foi testada em células (item 3.3.), apresentando título de 1:64. Posteriormente este material foi utilizado em uma nova cromatografia de exclusão molecular, utilizando à mesma coluna.

Figura 1. Perfil de eluição obtido em cromatografia de exclusão molecular usando coluna de gel filtração Superdex 75 em FPLC e, tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0. Frações com atividade citotóxica foram encontradas nos tubos 7 e 8 (1 mL por tubo) (seta indica).

5.5.2.2 Cromatografia de Exclusão Molecular II

O perfil eletroforético das cromatografias realizadas com o material proveniente da coluna de Gel Filtração Superdex 75, e que foram novamente submetidos à cromatografia com a mesma coluna, estão representados na Figura – 2. As frações coletadas nos tubos 14, 15 e 16 apresentaram atividade citotóxica em células (Fig 2).

Figura 2. Perfil de eluição obtido em cromatografia de exclusão molecular usando a coluna de gel filtração Superdex 75 em FPLC e, tampão Tris-HCl 0,02M pH 8,0. Frações com atividade citotóxica foram encontradas nos tubos 14 a 16. (0,5 mL por tubo). Material proveniente da primeira cromatografia.

5.6 Determinação da Concentração Protéica

Em cada fase do processo da purificação foi realizada uma análise, representada na Tabela 12. A cada 3000 mL de cultivo bacteriano, obtém-se uma quantidade média de 4,1 mg da proteína purificada, mantendo sempre a atividade biológica específica da toxina durante todo o processo.

Tabela 12. Seqüência de purificação do ECL

Frações	Volume (mL)	Total de Proteína (mg)	Atividade Total ^a (U.C)	Atividade Específica (U.C/mg)	Atividade Relativa
Sobrenadante	3000	6180	1×2^8	0,04	1
Ultrafiltrado ^a	10 mL	860	1×2^{12}	4,76	119
Superdex75 ^b	3 mL	10,21	1×2^{10}	100,29	2507
Superdex75 ^c	3 mL	4,1	1×2^8	62,43	1560

a. A atividade foi determinada aplicando-se 100 µL do ECL em 100 µL de meio MEM, aplicados em células Vero e encubados por 2 horas. A Unidade Citotóxica (UC) foi expressa como a recíproca da maior diluição do ECL que causou 50% de morte celular.

b. Membranas XM-50.

c. Primeira cromatografia com gel filtração.

d. Segunda cromatografia com gel filtração.

5.7 Análise Eletroforética

5.7.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Em cada etapa da purificação, realizou-se a análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%), corados por nitrato de prata. Os perfis protéicos obtidos mostram bandas comuns às frações com atividade enterotóxica e citotóxica. Após a realização da segunda cromatografia de gel filtração, o ECL aparece como uma única banda protéica (Figura 3).

O peso molecular da toxina purificada foi estimado em 48 kDa, a partir da sua mobilidade eletroforética em SDS-PAGE.

Figura 3. Perfil eletroforético das frações cromatográficas durante o processo de purificação em gel de poliacrilamida.

1. Padrão de peso molecular;
2. Fração da 2ª cromatografia;
3. Fração da 1ª cromatografia;
4. Fração da cromatografia em gel nativo-PAGE

5.8 Caracterização Físico-Química do Citotoxina Citotóxica Letal

5.8.1 Termoestabilidade

O ensaio de termo-estabilidade demonstrou que a toxina de *P.shigelloides* é termolábil, visto que a atividade citotóxica não foi observada, em culturas de células Vero, CHO, CaCo-2 e HT-29, quando a proteína ECL foi submetida às temperaturas de 55 °C por 30 min, 60 °C e 100 °C por 15 min. Os tratamentos com temperaturas entre 50 e 55 °C por 5 min já foram suficientes para eliminar completamente a ação citotóxica da proteína. A proteína mantém-se estável quando submetida às temperaturas de -70, -20 e 4 °C.

5.8.2 Atividade Proteolítica da Caseína

Nos testes realizados em placas com ágar *skimmed milk*, foi observado a formação de halos bem definidos ao redor dos pontos de aplicação da toxina, em função da difusão e proteólise deste substrato, mostrando que o ECL de *P. shigelloides* possui atividade proteolítica quando em contato com a caseína.

5.9 Caracterização Sorológica

5.9.1 Testes de Soroneutralização

O anti-soro ECL preparado em coelhos apresentou um título neutralizante homólogo de 1:1024. A soroneutralização heteróloga, com enterotoxina termolábil (LT1), produzida por *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) apresentou um título de 1:256, mostrando que o ECL apresenta um antígeno em comum. Com anti-soro anti-aerolisina produzida por *Aeromonas hydrophila*, apresentou título 1:32 e com anti-soro de *Aeromonas sóbria* o título neutralizante foi mais baixo ainda, 1:16.

Verotoxina (SLT) de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou de STEC, toxina colérica, produzido pelo *Vibrio cholerae* e Fator Necrozante Citotóxico (CNF), produzido por *E. coli* (NTEC) não mostraram similaridade sorológica com o ECL.

5.9.2 Western Blot

Nos testes de *Western blot* não ocorreu reação sorológica do ECL com a enterotoxina termo lábil (anti-LT-I), mas foi positiva para a toxina LT-I da cepa H10-407 de *Escherichia coli*.

5.10 Estudos Moleculares

5.10.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi realizada em amostras de *P. shigelloides* para os genes do Fator Citotóxico Necrotizante (CNF1 e CNF2); α -Hly; Enterohemolisina (EHly); Toxina Citoletal Distensora (CDT); Verotoxinas (Stx1 e Stx2); Enterotoxinas termo-lábeis (LT-1 e LT-2); Enterotoxinas termo-estáveis (STI e STII) e Aerolisina (X65043). No entanto, todos os genes de virulência diarreiogênicos estudados não foram amplificados nas amostras de *P. shigelloide*.

5.11 Caracterização Biológica do ECL *in vitro*

5.11.1 Determinação da Viabilidade Celular (CD₅₀)

Através do teste de viabilidade celular com vermelho neutro, foi padronizado a CD₅₀ da proteína ECL em função do tempo de exposição das células, pré-definido em 2 horas. Com a utilização de concentrações protéicas do ECL já definidas, foram obtidos os resultados apresentados na Figura 4 e, baseando-se na metodologia de Welkos e O'Brien (1994), foi determinado uma dose em torno de 0,7 $\mu\text{g/mL}^{-1}$ para indução de 50% de morte das células no teste. Com base neste resultado, foram utilizadas concentrações de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ do ECL para os testes posteriores, destinados a caracterização citotóxica.

Figura 4. Curva de viabilidade celular obtida através do teste com Vermelho Neutro em células Vero tratadas com diferentes concentrações da proteína ECL ($\mu\text{g mL}^{-1}$), durante período de exposição de 2 h.

5.11.2 Estudo da Integridade da Membrana

Na Figura 5 pode ser observado a perda da integridade da membrana celular através do teste de LDH. A sensibilidade do teste foi capaz de detectar o início da perda de enzimas citoplasmática logo nos primeiros 15 min de exposição das células ao ECL.

Figura 5. Cinética da atividade da enzima LDH, em função do tempo de exposição da cultura celular ao ECL. Os valores foram determinados a partir de experimentos realizados em triplicata.

5.11.3 Ensaios de Citotoxicidade

A toxina ECL de *P. shigelloides* causou efeito citotóxico semelhante em células Vero, CHO, CaCo-2 e HT-29. As primeiras alterações foram observadas 10 a 15 min após a adição do ECL nos tapetes celulares. Com 30 min de teste, foi observado grande quantidade de vacúolos no citoplasma de todas as células. As alterações seguintes foram: mudanças no formato normal das células para uma configuração arredondada; as células começaram a sofrer grandes alterações citoplasmáticas; aumentou o grau de vacuolização celular; os núcleos ficaram retraídos; e a monocamada foi gradualmente destruída (Fig. 6 e Fig. 6a).

Figura 6. Aparência morfológica das células CHO e HT-29 coradas com May Grünwald e Giemsa, após tratamento com ECL de *P. shigelloides*. (1.) Controle de células CHO; (5.) Controle de células HT-29; (2. e 6.) 15 min de tratamento; (3. e 7.) 30 min de tratamento; (4. e 8.) 60 min de tratamento.

Barras sobre a janela 8 representa 40µm e é válido para todas as janelas grandes (1–8) e 15µm em todas as janelas pequenas (a-h).

Figura 6a. Aparência morfológica das células Vero e CaCo-2 coradas com May Grünwald e Giemsa, após tratamento com ECL de *P. shigelloides*. (1.) Controle de células Vero; (5.) Controle de células CaCo-2; (2. e 6.) 15 min de tratamento; (3. e 7.) 30 min de tratamento; (4. e 8.) 60 min de tratamento.

Barras sobre a janela 7 representa 40µm e é válido para todas as janelas grandes (1–8) e 15µm em todas as janelas pequenas (a-h).

5.11.4 Teste de FAS (*Fluorescent Actin Staining*)

O teste de FAS (*Fluorescence Actin Staining*), com a toxina ECL purificada mostrou efeito com alta intensidade de fluorescência quando observados na microscopia de fluorescência (Fig. 7). É possível observar que há formação de fibras de estresse, caracterizada pela formação e espessamento de feixes de filamentos de actina, responsável pelo desarranjo do citoesqueleto, arredondamento das células, retração do conteúdo citoplasmático e prolongamento dos filamentos.

Figura 7. Efeito da atividade citotóxica da toxina ECL sobre os filamentos de actina de células HeLa. (A) controle de células; (B) formação de fibras de stresse; (C) prolongamento de filamentos; (E) desaparecimento dos filamentos de actina.

5.11.5 Detecção de Apoptose (Indução) pelo ECL em Linfócitos

Os testes de apoptose realizados com Annexin V-FITC, conduzidos com linfócitos tratados com o ECL (Fig. 8) e analisados por citometria de fluxo, demonstraram que o ECL induziu a morte celular por apoptose. Os testes foram realizados com linfócitos por ser uma célula que não adere à superfície, facilitando a análise por citometria de fluxo.

Figura 8. Diagrama do teste de apoptose analisado por citometria de fluxo com Annexin V-FITC em cultura de linfócitos humano, em diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30 e 60 min) com ECL (5 μ g).

O quadrante inferior esquerdo de cada janela mostra células viáveis, que são PI negativo e Annexin V-FITC ligados. O quadrante superior esquerdo contém células necróticas não viáveis, Annexin V-FITC negativo e PI positivo. O quadrante direito inferior representa a fase inicial de células apoptóticas Annexin V-FITC positivo e PI negativo. O quadrante superior direito, contém células apoptóticas não viáveis, Annexin V-FITC positivo e PI negativo, indicando que elas estão em estágio final de apoptose ou já morreram.

5.11.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) em Células Vero

Na análise ultraestrutural, as células Vero do grupo controle, apresentaram características de células saudáveis uniformes entre si e sem sinais de apoptose ou necrose. Estes dados podem ser observados nas Figura 9. Nesta figura pode-se ver que as células apresentavam-se próximas umas às outras confirmando “o tapete fechado”; Também apresentavam uma grande quantidade de junções celulares e poucos prolongamentos. Pode-se observar também, que os núcleos destas células estavam íntegros e apresentavam cromatina descondensada e, a presença de nucléolos, estes sim bastante condensados. No citoplasma das células do grupo controle, pôde ser observada a presença de retículo plasmático íntegro e mitocôndrias intactas.

Já nos grupos tratados com a toxina ECL por 1 h, as células Vero apresentaram características de células com sinais de apoptose e sem qualquer sinal de uniformidade entre si, onde puderam ser vistas células com evidentes diferenças quanto à eletrodensidade e forma (Fig. 9a). Foi possível observar também a presença de vacúolos nestas células, mitocôndrias em degeneração (sinal de apoptose), além da severa diminuição das junções celulares e o aumento de prolongamentos nas células, diferente das encontradas no controle. Também foi notada a presença de grânulos eletro-densos presentes no citoplasma destas células. Além destas características os núcleos destas células apresentavam ora um núcleo com envoltório nuclear regular quanto a sua forma e pouco condensado, ora um núcleo com envoltório nuclear irregular e cromatina densa.

Figura 9. Eletromicrografias de células vero (grupo controle):
 (A) – cromatina pouco condensada nos núcleos, presença
 (B) – de núcleos e uniformidade das células; (B) – célula
 em mitose; (C) – Junções celulares (setas). (D) – Junção
 celular; (E e F) – Mitochondrias.

Figura 9a. - Eletromicrografias de células vero, após o tratamento com ECL de *P. shigelloides*, visualização por MET. (A) – perda da uniformidade das células; distanciamento entre as mesmas; (B) – núcleo com cromatina e citoplasma condensados, presença de vacúolos (setas) e prolongamentos celulares abundantes; (C) – Núcleo condenando e presença de grânulos eletrondensos (setas); (D) – Junção Celular (setas) e mitocôndria em degeneração (*); (E) - presença de vacúolos, grânulos eletrondensos (setas), núcleo e cromatina condensados; (F) – Diferença na uniformidade.

5.11.7 Teste de Adesão em Linhagens Celulares

5.11.7.1 Teste de Adesão

O modelo de adesão apresentado por *P. shigelloides*, realizado com células HeLa e HT-29, é semelhante ao modelo agregativo apresentado por *Escherichia coli*. Inicialmente ocorreu a adesão de *P. shigelloides* sobre as células e sobre a lamínula (30 min), porém também ocorreu o início dos efeitos citotóxicos levando à destruição das células com a condensação do núcleo e extravasamento do conteúdo citoplasmático (60 min). Após este tempo, as bactérias estavam aderidas à lamínula, e sobre alguns restos celulares (90 min) (Fig. 10).

Figura 10. Adesão de *P. shigelloides* a células HT-29 e HeLa coradas com May Grünwald e Giemsa. A – controle de células HeLa; E – controle de células HT-29; B e F – bactérias aderidas a 30 min; C e G – bactérias aderidas a 60 min; D e H – bactérias aderidas a 90 min.

5.12 Teste de Patogenicidade *in vivo*

5.12.1 Atividade Enterotóxica em Camundongos Recém-Nascidos (CRN)

No teste de atividade enterotóxica em camundongo recém-nascido (CRN) a toxina ECL mostrou atividade altamente positiva, produzindo intenso acúmulo de fluido com sangue. A relação entre o peso dos intestinos e o peso das carcaças (PI/PC) dos camundongos foi de 1,6. São considerados positivos valores maiores ou iguais a 0,085.

5.12.2 Atividade Enterotóxica em Alça Ligada do Intestino de Coelhos

Com a Figura 11 exemplificamos os resultados obtidos nos teste com alça ligada de coelho. A toxina ECL causou efeito positivo em todas as regiões onde foi testada. As alças intestinais localizadas na região do jejuno e próximo ao ceco apresentaram bastante acúmulo de líquido (entre 20 a 25 mL) com muco, sangue e destruição das microvilosidades. As alças da região do ceco estavam hemorrágicas, mas sem muco. As alças da região do cólon apresentavam um volume de líquido maior (25 a 30 mL), estavam sem muco e hemorrágicas. As alças com cultura bacteriana apresentavam grande volume, porém sem muco ou sangue.

Figura 11. Teste em alça intestinal ligada de coelho. (1) cultura bacteriana; (2) controle negativo; (3) sobrenadante filtrado da amostra 9P3-1; (4) 5µg do ECL; (5) 3,5 µg do ECL; (6) 1,7 µg do ECL.

5.12.3 Letalidade em Camundongos

O teste de letalidade em camundongos mostrou que a mortalidade dos animais é dependente da dose e a LD₅₀ foi de 1,7 µg por via intraperitoneal. A atividade letal do ECL também foi termolábel (Tab. 13).

Desse modo, com 5,5 µg do ECL morreram os 5 animais do grupo em duas horas, assim por diante. Quando o ECL (5,5 µg) foi aquecido a 60 °C por 15 min, os animais não morreram mesmo após 7 dias em observação. Os camundongos inoculados por via intravenosa tiveram morte instantânea, menos os inoculados com o ECL aquecido.

Tabela 13. Atividade Letal do ECL em camundongos.

μg	Tempo/Hora/Morte
5,5	2 horas
2,7	5 horas
1,3	8 horas
0,6	14 horas
0,3	18 horas
0,1	18 a 20 horas
Aquecida (5,5 μg)	-
Meio LB	-

5.12.4 Demonstração da Cardiotoxicidade

Para estudar as mudanças que ocorreram no eletrocardiograma dos ratos injetados com a toxina ECL, foram usados 4 leads para a eletrocardiografia. A Figura 12 exemplifica o que ocorreu durante os testes, quando ratos com mais de 200 g foram inoculados intravenosamente com 7 μg do ECL.

Dois minutos após a toxina ser injetada já apareceu os primeiros sinais de alteração nos batimentos cardíacos, a onda P (despolarização do átrio) começou a ficar mais larga e mais alta do que o normal, neste mesmo tempo a voltagem do QRS (despolarização do septo AV; despolarização do ápice V; despolarização de base V) começou a aumentar e o ST (despolarização de base V; repolarização do V) também mudou. Nos próximos minutos ocorreu a elongação do intervalo PQ (despolarização do septo AV; despolarização do átrio), em seguida os batimentos cardíacos foram diminuindo até que cessaram ao final de 6 min de experimento. Os sinais dos batimentos cardíacos não foram mais captados pelo aparelho, porém os movimentos respiratórios continuaram. Ocorreu a dissociação eletromecânica do coração, mas a atividade cerebral continuou isto sendo considerado sinal de que a toxina não afetou o cérebro. O cérebro continuou enviando sinais para os músculos que ainda estavam oxigenados, e estes continuaram movimentando no processo de respiração. O processo parou quando acabou todo o oxigênio dos músculos. Para os ratos isto ocorreu em aproximadamente 2 minutos.

Só foi possível realizar as medidas da pressão arterial em ratos com mais de 200 g. As menores cânulas ainda são de calibres muito grande para este

procedimento em camundongos. As alterações que ocorreram na pressão arterial dos ratos com mais de 200 g estão apresentadas na Tabela 14.

O eletrocardiograma dos camundongos injetados com a toxina ECL (Fig. 12a) foi similar aos obtidos com os ratos, porém mais difíceis para analisar as mudanças porque o pulso dos camundongos é mais rápido do que o dos ratos.

Figura 12. Eletrocardiograma e medida da pressão arterial do rato injetado com a toxina ECL. Linha 1, eletrocardiograma; Linha 2, medida da pressão arterial; A. Rato foi injetado via intravenosa com a toxina ECL no tempo zero; B. tempo de 2 min após injeção; C. tempo 3 min; D. tempo de 4 min; E. tempo de 5 min; F. tempo de 6 min após a injeção.

Figura 12a. Eletrocardiograma de camundongos injetados com a toxina ECL. (A) camundongo foi injetado via intravenosa com a toxina ECL no tempo zero; (B) tempo de 36 seg. após injeção; (C) tempo de 60 seg; (D) tempo de 78 seg; (E) tempo de 105 seg; (F) tempo de 120 seg. após a injeção.

Tabela 14. Medida de pressão arterial de ratos inoculados via intravenosa com a toxina ECL no tempo de 6 min.

Tempo/min	Pressão		Sangue circulante mm/seg	Batimentos/min
	Máxima	Mínima		
0	115	97	25	209
2	116	91	10	227
3	103	80	10	239
4	68	51	10	105
5	26	21	10	90

5.13 Estudo das Alterações Morfológicas Induzidas pelo ECL em Células Epiteliais Intestinais de Coelhos

5.13.1 Microscopia de Luz

Como mostra a Figura 13, a análise histopatológica realizada com os segmentos de intestinos ensaiados de alças ligadas de coelhos com a toxina ECL apresentou as seguintes características:

No segmento intestinal do jejuno, foram encontradas criptas hipercromáticas e vilosidades bastante curtas (intensa atrofia), mas com enterócitos maduros, há intensa congestão e focos de hemorragia. A submucosa também possui congestão acentuada e edema moderado. Há infiltrado inflamatórios mistos, sendo mais abundante na submucosa, onde se encontra maior quantidade de macrófagos, linfócitos e neutrófilos, com características de enterite.

Vilosidades e criptas preservadas foram encontradas no segmento do ceco, apresentando figuras de mitose e hipercromasia, indicando o início de um processo de hiperplasia de criptas. Alguns vilos apresentam dilatação, com grande quantidade de material amorfo eosinofílico indicativo de edema acentuado das vilosidades. No entanto, a lâmina própria apresenta congestão e hemorragia. A submucosa apresenta edema acentuado e difuso e focos de infiltrado inflamatório misto, com dilatação de vasos linfáticos e presença de linfócitos, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos. Há linfócitos entre os enterócitos das vilosidades, características indicativas de Enterite Aguda.

Criptas e vilosidades normais foram encontradas no segmento do cólon, porém, notando-se dilatação própria de vilosidades devido à congestão, edema e hemorragia (presença de grande quantidade de hemácias na luz intestinal). Há focos extensos de hemorragia em alguns vilos e principalmente no interior da submucosa, onde há focos de infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico. Entre os enterócitos há infiltrados inflamatório misto próprio de vilosidades com presença de leucócitos, características de enterite hemorrágica aguda multifocal.

Figura 13. Fotomicrografia dos cortes histológicos das alças intestinais de coelhos após tratamento com o ECL de *P. shigelloides*. (A, D e F) – Atrofia fusão e dilatação de alguns vilos; (B e C) – desorganização do tecido conectivo; (E) – infiltrados de granulócitos na lâmina própria.

5.13.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na análise histopatológica, através da microscopia de varredura, após a realização do ensaio de alça ligada do intestino de coelhos frente à toxina ECL, pode ser observado na Figura 14 as alterações ocorridas nos tecidos do intestino delgado. Observamos grandes alterações nas vilosidades do intestino (B e E) quando comparamos com o controle (A), com ocorrência de encurtamento das vilosidades (intensa atrofia), (C) depósito de grande quantidade de hemácias e muco na luz do lúmen intestinal. Podemos observar também, hemácias crenadas, aderidas ao tecido, característica de células que estão sofrendo uma intensa desidratação (E). Presença de bactérias aderidas junto com hemácias, no tecido proveniente de alça com bactéria (D). Há abundância de infiltrados inflamatórios mistos, encontrando maior quantidade de macrófagos, linfócitos e neutrófilos. Característica de Enterite

Figura 14. Análise ultraestrutural das alças intestinais de coelhos tratados com toxina ECL através de MEV. (A 100 x) – controle das vilosidades; (B 170 x e E 100 x) – alterações das vilosidades intestinais tratadas com ECL; (C 2500 x) – hemácias e muco na luz do lúmen intestinal; (D 1500 x) – infiltrados inflamatórios mistos: macrófagos, linfócitos e neutrófilos; (F 8000 x) – bactérias aderidas ao tecido junto com muco – alça inoculada com bactéria.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Plesiomonas shigelloides tem sido relacionada nas últimas décadas como importante patógeno humano, causando principalmente gastroenterites, entre outras doenças (Brenden et al., 1988; Clark et al., 1991). A patogenicidade destas bactérias deve-se à sua capacidade de colonizar células epiteliais do hospedeiro e/ou produzir toxinas. Bactérias enteropatogênicas, tais como *E. coli*, *Salmonella* spp e *Shigella* spp também são capazes de produzir fatores de virulência que promovem colonização e produção de toxinas que são importantes nas etiologias das doenças diarréicas (Cavalieri et al., 1984; Weinrauch e Zychlinsk 1999). No entanto, os fatores virulência em *P. shigelloides* ainda não estão bem definidos e, em especial, sua participação na enteropatogenia causada por esta bactéria (Hostaka et al., 2002; Manorama et al., 1983; Theodoropoulos et al., 2001; Tsugawa et al., 2005).

Diarréia aguda é principalmente causada por aumento na secreção de fluidos para o lúmen intestinal em função do aumento de AMPc, em resposta à infecção por microrganismos produtores de enterotoxinas, como *E. coli* enterotoxigênica ou *Vibrio cholerae* ou pela diminuição na absorção intestinal por infecções com microrganismos que causam dano ao epitélio intestinal como *E. coli* enteropatogênica, *Shigella* sp. e *Salmonella* sp. (Schultsz, et al., 1994; Kaur e Ganguly, 2003).

Em nosso estudo, com amostras de *P. shigelloides* isoladas de água de rio (Baratéla, et al., 1993), encontramos cepas produtoras de uma toxina extracelular, termolábel, cuja atividade *in vitro* foi detectada em culturas de células Vero, CaCo-2, HT-29, HeLa, CHO e HEp-2, e *in vivo* foi enterotóxica para camundongo e coelhos e, levou à morte camundongos e ratos por parada cardíaca. Esta nova toxina, ainda não descrita na literatura, foi denominada de Citotoxina Citotóxica Letal, aqui representada por ECL.

Esta citotoxina assemelha-se com a encontrada por Sanyal et al. (1980), que relataram resultados positivos em teste com alça intestinal ligada de coelho, utilizando cultura filtrada de *P. shigelloides*. A cultura filtrada também foi positiva em teste com camundongos recém-nascidos, mas foi termooestável a 121°C. Porém, Holmberg et al. (1986) não observaram acúmulo de fluido em teste com alça intestinal ligada de coelho usando cultura de 31 isolados clínicos de *P. shigelloides*.

Objetivando estudar a toxina encontrada como um possível fator de virulência, buscamos neste estudo compreender o mecanismo de ação desta citotoxina enterotóxica produzida por *P. shigelloides*, e também seus efeitos biológicos, e para tanto, purificamos e caracterizamos esta toxina.

Inicialmente, foram utilizadas várias metodologias para melhorar os processos de produção da toxina ECL, sendo as amostras de *P. shigelloides* cultivadas em diferentes meios de cultura, para selecionar aquele que seria o melhor meio a ser utilizado, induzindo aumento na expressão da toxina. Pudemos observar que quando da utilizamos os meios de cultura MSG e TSB, durante os processos de precipitação da proteína, ocorreu a formação de grânulos insolúveis que afetaram a atividade da citotoxina. O mesmo não ocorreu quando o meio utilizado foi o LB, o qual foi escolhido, portanto, para a produção da proteína, bem como para os posteriores processos de purificação.

O tempo de crescimento também foi avaliado durante 72 horas e o sobrenadante de cultura testado quanto à atividade citotóxica em células Vero. A atividade citotóxica foi crescente até atingir 14 h de cultivo, após este tempo ocorreu decréscimo na atividade até 18 h, quando reiniciou o aumento na atividade. Este processo continuou até atingir às 72h de cultivo.

Na literatura encontramos um único trabalho realizado com purificação de proteína de *P. shigelloides* (Okawa et al., 2004). Estes pesquisadores purificaram uma citotoxina extracelular produzida por amostras de *P. shigelloides* composta por um complexo formado por três proteínas ligadas a proteína LPS e, tiveram a produção da citotoxina acompanhando o crescimento bacteriano, tendo a produção máxima em 12 h de cultura, e continuando até o final do cultivo (108 h).

O decréscimo na atividade citotóxica encontrada no sobrenadante das amostras de *P. shigelloides* por nós cultivadas, foi causado pela produção, por esta bactéria, de uma enzima proteolítica similar à produzida pelo gênero *Aeromonas spp.* (Fujii et al., 1998), onde a atividade enterotóxica não foi detectada em cultivo por 18 a 20 h. Foi possível recuperar a atividade citotóxica quando *P. shigelloides* foi cultivada em meio contendo aprotinina, um inibidor de protease. Por esta propriedade, característica desta bactéria, decidimos coletar o sobrenadante com 14 h de cultivo.

As características bacteriológicas como tempo de crescimento e produção de enzimas proteolíticas, podem ser as causas dos resultados inconstantes na definição dos principais fatores de virulência que induzem a enteropatogenicidade de *P.*

shigelloides, o que pode explicar o baixo potencial patogênico encontrado por alguns pesquisadores, como Abbott et al. (1991).

Neste trabalho, na etapa inicial do processo de purificação, visando à separação do ECL das demais toxinas solúveis, testamos o método de fracionamento das proteínas por sulfato de amônia, álcool, acetona e por ultrafiltração em sistema Amicon.

No fracionamento com álcool e acetona ocorreu diminuição da atividade citotóxica. Através do fracionamento com sulfato de amônia verificamos que o ECL encontrava-se na faixa de saturação de 60 - 80%, assim como Okawa et al. (2004) que tiveram sua citotoxina precipitada em 60% de sulfato de amônia. No processo de ultrafiltração utilizando membrana de exclusão de 50 kDa (XM 50, Millipore), verificamos que a toxina ECL estava presente na porção retida na membrana. Este processo mostrou-se mais adequado, pois permitiu um grau maior de isolamento da proteína de interesse do que o conseguido através do fracionamento com sulfato de amônia sendo, portanto, o método escolhido.

Estudos mostram que os processos de purificação de toxinas geralmente iniciam com cromatografia de troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica (Okawa et al., 2004; Falcón et al., 2001; Fujii et al., 1998; Noda et al., 1987). Baseado nestes estudos iniciamos os processos cromatográficos com colunas de troca iônica. Em testes preliminares, verificamos que a proteína não se ligava a resinas de troca aniônica e nem catiônica, sendo precipitada logo no início da cromatografia sem ocorrer separação.

Nas cromatografias de exclusão molecular, utilizando gradiente linear de NaCl, também não obtivemos bons resultados. As Proteínas precipitavam todas no mesmo pico de eluição sem ocorrer separação. Isto ocorreu, possivelmente, porque esta toxina é muito hidrofóbica. Farinas et al. (2005) utilizando concentrações diferentes de sal, demonstraram que as proteínas de *P. shigelloides* são muito hidrofóbicas e necessitam de pouca concentração de sal para precipitar. A maior concentração de proteínas (adesinas, fimbrias e pili) necessita de menor concentração de sal para precipitar e tem maior grau de hidrofobicidade celular. Amostras de *E. coli* enteropatogênica e *Salmonella typhi* têm grande superfície hidrofóbica, esta característica é dada pela presença de pili e outras adesinas, e pela determinação desta propriedade pode-se ter uma idéia do grau de adesinas destas bactérias. Assim, concluímos que a proteína em estudo é também muito hidrofóbica, e por isso optamos

por iniciar o processo de purificação utilizando coluna de exclusão molecular sem gradiente de NaCl. Deste modo, a purificação da proteína ECL foi obtida através de cromatografia com coluna de exclusão molecular Superdex 75, porém com parâmetros diferentes de corrida, como tempo de corrida e volume de coleta, o que permitiu a separação da proteína em fração isolada.

A toxina purificada mostrou uma única banda de 48 kDa em gel de SDS-PAGE, corado com nitrato de prata. Este resultado foi confirmado pelo gel Nativo-PAGE sem SDS e sem β -mercaptoetanol. Nossa toxina é bem diferente da citotoxina purificada por Okawa et al. (2004), que é formada por um complexo de proteínas ligadas a LPS, e possui massa molecular superior a 600 kD.

Neste estudo, a proteína ECL quando submetida a altas temperaturas perdeu a atividade citotóxica. Os tratamentos com temperaturas entre 50 e 55 °C por 5 minutos foram suficientes para eliminar completamente a ação citotóxica da proteína. Diferentemente da hemolisina termoestável produzida pelo *Vibrio parahaemolyticus* (Takeda, 1983) e da citotoxina purificada por Okawa et al. (2004), que manteve seu efeito após aquecimento a 60 – 100 °C por 10 – 30 min. Abott et al. (1991) trabalhando com 16 amostras de *P. shigelloides*, encontraram baixos níveis de citolisina no sobrenadante de cultura, que não foi inativado pelo tratamento por aquecimento a 100 °C por 10 min, ou 56 °C por 30 min. A toxina ECL de *P. shigelloides* é semelhante a citoxina de *Aeromonas veronii* biovar *sobria* purificada por Martins et al. (2007), quanto à termoestabilidade, porém diferente quanto ao seu tamanho (60 kDa).

Para verificar o potencial proteolítico do ECL, utilizamos a técnica descrita por Song et al. (2004) e, através dela foi possível observar que o ECL possui atividade caseinolítica. Este resultado é semelhante ao encontrado na toxina vacuolizante de amostras de *Aeromonas veronii* biovar *sobria* purificada por Martins et al. (2007).

O anti-soro ECL preparado em coelhos apresentou um título neutralizante homólogo de 1:1024. A soroneutralização heteróloga, com enterotoxina termo-lábil (LT1), produzida por *E.coli* enterotoxigênica (ETEC) apresentou um título de 1:256, mostrando que o ECL apresenta um antígeno em comum. Porém, em teste de Western blot, não foi possível revelar a reação sorológica. Provavelmente, o antisoro anti-LT-1 usado, não reconheceu o epítipo da enterotoxina-citotóxica termo-lábil de *P. shigelloides*.

Quando utilizado anti-soro anti-aerolisina produzido por *Aeromonas hydrophila*, a toxina ECL apresentou título de soro-neutralização de 1:32; com anti-soro de *Aeromonas sobria* o título neutralizante foi mais baixo ainda, 1:16. A Verotoxina (SLT) de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC ou de STEC), o Fator Necrozante Citotóxico (CNF), produzido por *E. coli* (NTEC) e o antisoro da enterotoxina anti-cólera não mostraram similaridades sorológicas com o ECL, diferentemente da citotoxina termoestável purificada por Okawa et al. (2004), e da toxina termolábil encontrada por Gardner et al. (1987) que tiveram um relacionamento cruzado com a enterotoxina colérica.

Os testes de PCR para pesquisa dos genes Fator Citotóxico Necrotizante (CNF1 e CNF2); α -Hly; Enterohemolisina (EHly); Toxina Citoletal Distensora (CDT); Verotoxinas (Stx1 e Stx2); Enterotoxinas termo-lábeis (LT-1 e LT-2); Enterotoxinas termoestáveis (STI e STII) de *E. coli* e Aerolisina (X65043) de *Aeromonas*, foram utilizados neste estudo em 6 amostras de *P. shigelloides* produtoras do ECL. Os resultados revelaram que nenhuma destas amostras apresentou amplificação para estes genes pesquisados, mostrando que possivelmente não houve transferência genética entre estes microrganismos, com relação aos genes pesquisados.

A atividade hemolítica do ECL foi detectada em teste com microplacas e tubos, sendo que em tubos os resultados foram melhores que em placas. Os títulos de hemólise foram melhores nas hemácias de boi e humana, de modo semelhante aos resultados observados por Falcón et al. (2003) usando o sobrenadante de cultura *P. shigelloides*; Janda e Abbott (1993) descreveram a produção de uma β -hemolisina associada a células semelhante às encontradas por Daskaleros et al. (1991) mas não encontraram nenhuma atividade hemolítica livre da célula. Baratéla et al. (2001) mostram a produção de β -hemolisina em teste com placas de ágar sangue, mas não realizaram nenhum teste com cultura filtrada de *P. shigelloides*. Tanto Baratéla et al. (2001) quanto Santos et al. (1999) encontram melhores resultados usando hemácias de carneiro.

Os ensaios de viabilidade celular foram baseados nos efeitos citotóxicos causados pelo ECL nas células. Estes efeitos como vacuolização, arredondamento e descolamento do tapete celular foram visualizados nos primeiros 15 min de teste, diferindo do comportamento das células controle, verificando-se ao longo do tempo uma diminuição significativa de células viáveis, mesmo com a utilização de pequena concentração de proteína ($0,5 \mu\text{g/mL}^{-1}$), o que foi comprovado pelo cálculo do CD-50.

Okawa et al., (2004) precisaram de $25 \mu\text{g/mL}^{-1}$ da proteína para causar efeito citotóxico, isso mostra que a toxina por nós purificada é muito potente.

Os testes de integridade da membrana celular (LDH) revelaram que a ação citotóxica do ECL causou dano na membrana celular e pela sensibilidade do teste foi possível detectar o início da perda de enzimas citoplasmáticas logo nos primeiros 15 min de exposição ao ECL, diminuindo a capacidade funcional das células.

Neste estudo, a atividade do ECL de *P. shigelloides* foi semelhante em todas as linhagens celulares testadas. Após 15 min de aplicação do ECL, as células mostraram intensa vacuolização intracelular, este efeito progrediu para arredondamento celular e degeneração da membrana, com perda do citoplasma em 30 min, quando foi observada também a perda de aderência ao substrato. Em 120 min, a monocamada celular havia descolado completamente. Diferente do efeito citotóxico encontrado por Gardener et al. (1990) que relataram a produção de uma toxina termolábil, que quando cultivada em meio pobre em ferro (Syncase), causava alongação em células CHO, similar ao efeito causado pela enterotoxina colérica. Porém, ela foi sorologicamente relacionada à toxina-colérica, como a toxina termoestável purificada por Okawa et al. (2004), que causou efeito citotóxico em células intestinais 407, CaCo-2, CHO e U-937.(macrófagos humanos).

Nas últimas décadas, alguns pesquisadores têm relacionado a vacuolização celular como indicativo de virulência e patogenicidade bacteriana (Henics & Wheatley, 1999; Mitra et al., 2000). *Vibrio cholerae* e *Helicobacter pylori* são bactérias conhecidas por sua capacidade de produzir citotóxicas vacuolizantes, demonstrando a associação entre o efeito biológico (vacuolização) e a patogenicidade causada por estes microrganismos (Cover et al., 1996; Figueroa-Arredondo et al., 2001). Martins et al. (2007) demonstraram que *Aeromonas sóbria* produz efeito citotóxico vacuolizante semelhante ao produzido pela toxina por nós purificada que aos 15 min de sua inoculação, apresenta grande número de vacúolos citoplasmáticos em diferentes linhagens celulares.

No presente estudo, a toxina ECL de *P. shigelloides* não causou efeito citotóxico como a enterotoxina colérica e nem como a enterotoxina termo-lábil de *E. coli* enterotoxigência (ETEC) (Guerrant et al., 1974). As alterações morfológicas e intracelulares causadas pelo ECL de *P. shigelloides* em linhagens celulares foram caracterizadas como efeito citotóxico, que podemos considerar muito rápido levando em conta o fato que após 30 min, um grande número de células da monocamada

foram descoladas. Nossos resultados envolvendo células epiteliais intestinais humanas estão em acordo com o que Falcón et al. (2003) referiram aos efeitos intracelulares. Resultados semelhantes aos nossos também foram encontrados por Abbott et al. (1991) quando o sobrenadante de 16 amostras de *P. shigelloides* causaram arredondamento celular e formação de grânulos no citoplasma, próprio de lise celular, em células HEp-2 e Y1, observados após 24 de inoculação, mas não causaram nenhum efeito citotóxico em células CHO.

Através do teste de FAS (Fluorescence Actin Staining), foi possível observar que a toxina induz a formação de fibras de estresse, caracterizada pela formação e espessamento de feixes de filamentos de actina, causando desarranjo do citoesqueleto, arredondamento das células, retração do conteúdo citoplasmático e prolongamento dos filamentos.

A fim de verificar qual a via de morte celular induzida pela toxina, foram realizados ensaios utilizando um conjunto de reagentes para detecção de apoptose, conduzidos com linfócitos e analisado em citometria de fluxo. As análises por citometria de fluxo mostraram que o resultado de morte dos linfócitos foi por apoptose e não por necrose, pois o Annexin V-FITC e o PI eram positivos. A perda da membrana plasmática é uma das primeiras características morfológicas de morte por apoptose. Annexin V é uma proteína que tem alta afinidade com a membrana fosfolipídica fosfatidilserina (PS) e, liga-se às células que estão com a PS exposta, servindo como uma sonda sensível para detecção das células que estão em processo de apoptose (Vermes et al., 1995). Martins et al. (2007) purificaram uma toxina VCF produzida por amostras de *Aeromonas veronii* biovar *sobria*, onde a toxina produzida por esta bactéria causou vacuolização em células Vero e também levou à morte por apoptose.

A morte por apoptose é definida como um processo que aciona a morte celular programada e é indicada como um dos possíveis mecanismos utilizados pelos microrganismos patogênicos para estabelecer-se e escapar da resposta imune do hospedeiro (Fernandez-Prada et al., 1997; Thompson, 1995). Bactérias associadas às doenças gastrointestinais como *E. coli*, *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., são reconhecidas como indutoras de apoptose (Weinrauch e Zychlinsk, 1999). Toxinas como a α -hemolisina e aquelas pertencentes à família das shiga-toxina de *E. coli*, são capazes de induzir a morte celular programada (Cavalieri et al., 1984), levando ao

arredondamento celular, condensação nuclear, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos.

As características apresentadas na microscopia eletrônica vêm confirmar os dados obtidos tanto nos testes de apoptose quanto nos testes de citotoxicidade nas linhagens celulares Vero, CHO, CaCo-2 e HT-29 observados na microscopia de luz. Os dados apresentados pela microscopia eletrônica nos grupos tratados caracterizam células em processo de morte celular como, por exemplo, a severa perda mitocondrial, presença de vacúolos, muito provavelmente derivados da degeneração das mitocôndrias, e a presença de grânulos eletrodensos no citoplasma. Além disso, foi notória a diferença entre o grupo tratado e o controle tanto nas características citadas (mitocôndrias, etc) bem como na condensação celular (demonstrada pela eletrodensidade diferente) e condensação cromatínica, dados que também evidenciam a morte celular por apoptose.

Infecções intestinais causadas por *P. shigelloides* geralmente levam à diarreia com muco e sangue, sugestivo de processo invasivo. Theodoropoulos et al. (2001), estudaram adesão e invasão de *P. shigelloides* em células CaCo-2, e observaram que 2 h após a infecção a interação bactéria-célula hospedeira foi inicialmente de dois tipos: bactérias distribuídas difusamente sobre as células hospedeiras ou formando clusteres próximos às junções das células, deixando as regiões centrais das células relativamente livres de bactérias. A internalização das bactérias foi observada 4 h após a infecção. Binns et al. (1984) observaram que 5 das suas 16 amostras de *P. shigelloides* testadas invadem células HeLa por um mecanismo comparado ao de *Shigella sonnei*; Herrington et al. (1987) não encontraram a capacidade de invasão em nenhuma das 5 amostras investigadas; Olsvik et al. (1990) relataram que 3 de seus 11 isolados avaliados demonstraram inicialmente invasividade em células HeLa, mas não puderam confirmar este resultado; Abbott et al. (1991) avaliaram 16 amostras, mas não encontraram capacidade de invasão em células HEp-2.

Em nosso estudo, o modelo de adesão apresentado por *P. shigelloides* em células HeLa e HT-29 é semelhante ao modelo agregativo apresentado por *Escherichia coli*. Inicialmente ocorreu a adesão de *P. shigelloides* sobre as células e sobre a lâmina (30 min), porém, também ocorreu o início dos efeitos citotóxicos levando à destruição das células após 60 minutos. Após este tempo, as bactérias estavam aderidas à lamínula, e sobre alguns restos celulares, não sendo possível observar se ocorreu invasão.

A toxina ECL de *P. shigelloides* deste estudo, quando injetada intraperitonalmente, mostrou uma potente atividade letal em camundongos com 4 semanas de idade. Com 5,5 µg do ECL morreram os 5 animais do grupo em 2 h após a inoculação. A mortalidade causada pela ECL nos animais é dependente da dose e a LD₅₀ foi de 1,7 µg por via intraperitoneal. A atividade letal também foi termolábil, já que o aquecimento da toxina levou à perda completa da atividade letal em camundongos. Abbott, et al. (1991) relataram uma baixa patogenicidade animal em cultura de *P. shigelloides*, inoculada por via intraperitoneal em camundongos, que levou a morte dos animais apenas após 4 dias de inoculação.

Quando a toxina ECL de *P. shigelloides* foi injetada por via intravenosa em camundongos, a atividade letal foi muito rápida, causando a morte em poucos segundos. Salvadori et al. (2002) descreveram uma toxina letal produzida no sobrenadante de cultura de *E. coli*, isolada de galinha com síndrome de cabeça inchada. Esta toxina letal, similar á toxina do *Bacillus cereus*, também causava a morte dos camundongos em poucos segundos após a sua aplicação por via intravenosa.

Algumas toxinas produzidas por microrganismos são conhecidas por sua capacidade cardiotóxica, como a hemolisina termoestável letal do *Vibrio parahaemolyticus* purificada por Honda et al. (1976). Esta toxina, quando injetada por via intravenosa com 10 a 25 µg da toxina por rato (pesando 430g cada) matou os animais em 2 min; a hemolisina cardiotóxica letal de *Listeria monocytogenes* descrita por Kingdon e Sword (1970) causou a morte de 100% dos camundongos quando injetados por via intravenosa, em 4 a 5 min.

As alterações que ocorreram no coração dos ratos e camundongos após a inoculação da toxina ECL foram avaliadas através da medida da pressão arterial e de eletrocardiograma, e mostraram-se bastante similares às observadas por Honda et al. (1976) e Kingdon e Sword (1970).

O eletrocardiograma dos camundongos injetados com a toxina ECL foi similar aos obtidos com os ratos; entretanto, a análise das alterações em camundongos é mais complicada devido à diferença de frequência cardíaca entre esses animais, já que a frequência de batimentos cardíacos em camundongos (± 540 batimentos/min) é aproximadamente o dobro da dos ratos (± 210 batimentos/min).

A inoculação intravenosa da toxina ECL primeiro afeta diretamente o coração, levando à morte dos animais em poucos minutos após sua administração. Quando

injetada por via intraperitoneal a toxina é também letal, porém a sobrevivência dos animais é maior. Uma possibilidade é que a toxina quando injetada intraperitonealmente entre na corrente sanguínea e depois afete o coração.

Os resultados do nosso estudo mostraram que a toxina ECL de *P. shigelloides* foi capaz de causar acúmulo de líquido com sangue em alça intestinal de coelhos e as análises histológicas do tecido intestinal revelou que o ECL induziu alterações severas na mucosa intestinal, característica de enterite hemorrágica aguda multifocal.

As lesões observadas nos tecidos tratados com a citotoxina ECL em comparação com as células controle observadas nas análises com microscopia de luz, foram confirmadas nos estudos usando MEV. As análises ultraestruturais demonstraram que o ECL induziu severos danos na arquitetura das microvilosidades, levando as alterações no tecido conectivo onde foi possível observar células com presença de vacúolos, mitocôndrias em degeneração, sinal de morte por apoptose. Também foi notada a presença de granulócitos confirmando a ativação do sistema imune intestinal devido à ação da toxina nos enterócitos.

Nossos encontrados histológicos indicam lesões patológicas que variam de severa para morte por apoptose das células da superfície da mucosa do jejuno, ceco e cólon. Vitovec et al. (2001), encontrou resultados semelhantes aos nossos, porém com morte por necrose das células da superfície da mucosa. Herrington et al. (1987) descreveram que a toxina de *P. shigelloides* induziu inflamação na mucosa intestinal e este processo precede o desenvolvimento da diarreia, sugerindo que o processo inflamatório é um pré-requisito para a ocorrência de diarreia e este fato é suportado pelas observações de que a diarreia ocorre somente em animais com extensiva colite.

Nossos dados sugerem que *P. shigelloides* produz uma enterotoxina termolábil com atividade citotóxica e cardiotóxica, sorologicamente relacionada com a enterotoxina termolábil tipo 1 (LT-1) da enterotoxigênica *E. coli* (ETEC).

Estudos futuros são necessários visando aprimorar os resultados, como conhecer a estrutura protéica do ECL, o processo de internalização da citotoxina pelas células e as vias que levam ao processo de apoptose, enfim, definir melhor os mecanismos de ação da citotoxina produzida por *P. shigelloides* clarificando melhor sua patogenicidade.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. A melhor condição de cultivo encontrada para a produção da citotoxina ECL pela amostra 9P3-1 de *P. shielloides* foi o meio LB com 14 h de cultivo á 37 °C.
2. A seqüência de cromatografia por exclusão molecular (Supedex 75 10/30), seguida por uma nova passagem pela mesma coluna com diminuição do fluxo e da fração coletada, mostrou-se adequada à purificação do ECL.
3. A citotoxina purificada apresenta 48 kDa de peso molecular em gel de poliacrilamida SDS-PAGE e é termo-lábil.
4. A toxina ECL possui atividade enterotóxica, citotóxica e cardiotoxica, é letal para ratos e camundongos e causa morte celular por apoptose.
5. A análise histológica revelou severas alterações no tecido intestinal de coelhos tratados com ECL.
6. A toxina ECL é diferente da enterotoxina anti-cólera, mas é sorologicamente relacionada com a enterotoxina termo-lábil tipo 1 (LT-1) da enterotoxigênica *E. coli* (ETEC).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2004 May 06].

Abbott SL. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other Enterobacteriaceae In: Murray PR, Manual of clinical microbiology. 8^a ed. Washington, D.C., ASM Press. 2003; p.684-700.

Abbott SL, Kokka RP, Janda JM. Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. J. Clin. Microbiol. 1991; 20: 148-53.

Ahmad M, Aggarwal M, Ahmed A. Bloody diarrhea caused by *Plesiomonas shigelloides* proctitis in a human immunodeficiency virus-infected patient. Clin Infect Dis. 1998; 27:657.

Albert MJ, Faruque ASG, Faruque SM, Sack RB, Mahalanabis D. Case-control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka. Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 1999; 37: 3458-64.

Albert MJ, Ansaruzzaman M, Qadri F, Hossain A, Kibriya AK, Haider K, Nahar S, Faruque SM, Alam AN. Characterization of *Plesiomonas shigelloides* strains that share type-specific antigens with *Shigella flexneri* 6 and common group 1 antigen with *Shigella flexneri* spp. And *Shigella dysenteriae* 1. J Med Microbiol. 1993; 39:211-7.

Aldova E, Melter O, Chyle P, Slosarek M, Kodym P. *Plesiomonas shigelloides* in water and fish. Centr. Eur. j. Publ. Hlth. 1999; 7:172-5.

Aldova E, Shubert RHW. Serotyping of *Plesiomonas shigelloides*: a tool for understanding of ecological relationship. Med. Microbiol Lett. 1996; 5:33-9.

Aldova E. The importance of serotyping *Plesiomonas shigelloides*. Epidemiol Microb. Immun. 1995; 44:147-54.

Aldova E. Experiences with seroogy of *Plesiomonas shigelloides* 1. O-antigenic structure. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1985; 49:1954-47.

Aldova E, Geizer EA. Contribution to the serology of *Aeromonas shigelloides*. Zentralbl Bakteriол. 1968; 207:35-40.

Aldova E, Rakovsky J., Chovancova A. The microbiological diagnostics of *Aeromonas shigelloides*. J Hyg Epidem. 1966; 10:470-82.

Amin II, Hossain M, Miah MRA, Eahman Z. Bangladesh Med Res Council Bull. 1992; 18:12-22.

Arai T, Ikejima N, Itoh T, Sakai S, Shimada T, Sakazaki RA. Survey of *Plesiomonas shigelloides* from aquatic environments, domestic animals, pets and humans. J Hyg (Lond). 1980; 84(2):203-11.

Baines D. Analysis of purity. In: Roe S. Protein purification techniques: a practical approach. Ohio: Oxford, Oxford University Press. 2001.

Baratéla KC, Saridakis HO, Gaziri LCJ, Pelayo JS. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. J Appl Microbiol. 2001; 90: 482-87.

Bardon J. Evaluation of the pathogenicity of strains of *Plesiomonas shigelloides* isolated in animals. Vet Med (Praha). 1999; 90:482-87.

Bauwens L, Meurichy W, Lemmens P, Vandepitte J. Isolation of *Plesiomonas shigelloides* and *Edwardsiella* species in the Antwerp zoo. Act Zool Pathol Antverp. 1983; 77: 61-74.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Willians & Wilkins. 2nd Ed., 5vols, EUA. (2000).

Bergdoll MS. Ileal Loop Fluid Accumulation Test for Diarrheal Toxins. Meth Enzim. 1988; 165:306-23.

Bernard M, papini E, Filippis V, Gottardi E, Telford J, Manetti R, Fontana A, Rappuoli R, Montecucco C. Low pH activates the vacuolating toxin of *Helicobacter pylori*, which becomes acid pepsin resistant. J Biol Chem. 1995; 270:23937-40.

Billiet J, Kuypers S, Van Lierde S, Verhaegen J. *Plesiomonas shigelloides* meningitis and septicaemia in a neonate: report of a case and review of the literature. Infection. 1989; 19:267-71.

Binns MM, Vaughan S, Sanyal SC, Timmis KN. Invasive ability of *Plesiomonas shigelloides*. Zentralbakteriol Hyg A. 1984; 257:343-47.

Bhakdi S, Greulich S, Muhly M, Eberspächer B, Becker H, Thiel A, Hugo F. Potent leucocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. J Exp Med. 1986; 169:737-54.

Blanco M, Blanco J E, Alonso M P, Mora A, Basalobre C, Munoa F, Juárez A, Blanco J. Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesions and production of toxins. Res Microbiol. 1997; 148:747-55.

Blanco J, Blanco M. *Escherichia coli* enterotoxigênicos, necro toxigênicos y verotoxigênicos de origen humano y bovino. In: Blanco, J. & Blanco, M. editors. Patogêneses, epidemiologia y diagnóstico microbiológico. Lugo, Espanha. Ed. Servicio de publicaciones Diputación Provincia; 1993. p. 117.

Blum H, Beier H, Gross H J. Improved silver staining of plants, RNA and DNA in polyacrilamide gels. Electrophoresis. 1987; 8: 93-9.

Bohach GA, Snyder IS. Purification of *Escherichia coli* α -hemolysin. Methods Enzymol. 1988; 165:137-46.

Borenfreund E, Puerner J A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J Tissue Cult Meth. 1984; 9:7-9.

Bravo L, Cabrera R, Ramirez M, Llop A, Fernandez A, Garcia B, Morier L. *Plesiomonas shigelloides* una Vibrionaceae en quien pensar. Rev. Cubana Med Trop. 2000; 52:10-4.

Bravo L, Cabrera R, Ramírez M, Llop A, Fernández A, Ariosa C, Ferrer R. Fatal *Plesiomonas shigelloides* in a Newborn. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(5):661-2.

Bravo L, Monte R, Ramirez M, Garcia B, Urbaskova P, Aldova E. Characterization of *Plesiomonas shigelloides* from diarrheic children. Central European. J Health. 1998; 6:67-70.

Bredford M M. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Brenden RA, Miller MA, Janda JM. Clinical disease spectrum and pathogenic factors associated with *Plesiomonas shigelloides* infections in humans. *Rev Infect Dis.* 1988; 10: 303-16.

Cavalieri S, Bohach G, Snyder I. *Escherichia coli* alpha hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol Rev.* 1984; 48:326-43,

Chantterjee BD, Neogy KN. Studies on *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* speceis isoletd from cases of choleraic diarrhoea. *Indian. J Med Res.* 1972; 60: 520-4.

Chart H, Jenkins C, Smith HR, Hedges D, rowe B. Haemolysin production by strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiology.* 1998; 144:103-7.

Chida T, Okamura N, Ohtani K, Yoshida Y, Arakawa E, Watanabe H. The complete DNA sequence of the O antigen gene region of *Plesiomonas shigelloides* serotype O17 wich is identical to *Shigella sonnei* form 1 antigen. *Microbiol Immunol.* 2000; 44(3):161-72.

Claesson BE, Holmlund DE, Lindhagen CA, Mätzsch TW. *Plesiomonas shigelloides* in a acute cholecystitis: a case report. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(5):985-7.

Clark RB, Janda JM. *Plesiomonas* and human disease. *Clin Microbiol Newsl.* 1991a; 13:45-52.

Clark R B, Westby GR, Spector H, Soricelli RR, Young CL. Fatal *Plesiomonas shigelloides* septicaemia in a splenectomised patient. *J Infect.* 1991; 23:89-92.

Clark RB, Lister PD, Arneson-Rotert L, Janda JM. In vitro susceptibilities of *Plesiomonas shigelloides* to 24 antibiotics and antibiotic- β -lactamase-inhibitor combination. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34:159-60.

Cover TL. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol.* 1996; 20: 241-6.

Cruz JM, Saraiva A, Eiras JC, Branco R, Sousa JC. Na outbreak of *Plesiomonas shigelloides* in farmed rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in Portugal. Bull. Eur. Ass Fish pathol. 1986; 6:20-2.

Daskaleros PA, Stoeber JA, Payne SM. Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the hemeiron uptake system. Infect Immun. 1991; 59:2706-11.

Davis II WA; Chretien JH, Garagusi VF, Goldstein MA. Snake-to-human transmission of *Aeromonas Plesiomonas shigelloides* resulting in gastroenteritis. South. Med J. 1978; 71: 474-6.

Davis BJ. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. Aninals of the New York Academy of Science. 1964; 121:404-27.

Davis B D and Minglioli E S. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin. J Bacteriol. 1950; 60:17-28.

Dean AG, Ching YC, Williams RG, Harden LB. Test of *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J Infect Dis. 1972.; 25: 407-11.

Echeverria P, Seriwatana J, Taylor DN, Yanggratoke S, Tirapat C. Comparative study of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Shigella*, *Aeromonas*, and *Vibrio* as etiologies of diarrhea in North-eastern Thailand. J Trop Med Hyg. 1985; 34:547-54.

Ewing WH, Hugh R, Johnson JG. Studies on the *Aeromonas* group. US Dpt. Hlth, Educ. And Welfare, Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, USA. 1961.

Falcón R, Carbonell GV, Figueredo PMS, Saridakis HO, Pelayo JS, Yano T. Intracellular vacuolation induced by culture filtrates of *Plesiomonas shigelloides* isolated from environmental sources. J Appl Microbiol. 2003; 95: 273-8.

Falcón R, Carvalho H, Joazeiro PP, Gatti MSV, Yano T. Induction of apoptosis in HT-29 Human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. Bioch And Cell Biol. 2001; 9:525-31.

Fariñas LB, Noblet DS, Arce MA, Garcia H, Ramirez M, Cabrera E, Fernadez A, Castañeda N. Estudio de factores de virulencia en cepas de *Plesiomonas shigelloides* aisladas de animales domesticos y afectivos. REDVET. Rev Elect Vet. 2005; 6(10):1-12.

Fernandez-Prada CM, Hoover DL, Tall BD, Venkatesan MM. Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexneri in vitro* undergo a rapid cytolitic event similar to oncosis but not apoptosis. Infect Immun. 1997; 65:1486-96.

Freitas AC, Mihomem AM, Nunes MP, Ricciardi ID. Virulence factors produced by *Aeromonas hydrophila* strains isolated from different sources. Revista Microbiol. 1993; 24:168-74.

Figuerola-Arredondo P, Heuser JE, Akopyants NS, Moriasaki JH, Cerezo SG, Rincón FE, Berg D. Cell vacuolation caused by *Vibrio colerae* hemolysin. Infect Immunol. 2001; 69:1613-24.

Fischer K, Chakraborty T, Hof H, Kirchner T, Wansler O. Pseudoappendicitis caused by *Plesiomonas shigelloides*. J Clin Microbiol. 1988; 26(12):2675-7.

Foster G, Patterson T, Pennycott T, Cheasty T. *Plesiomonas shigelloides* - an uncommon cause of diarrhoea in cats? Vet Rec. 2000; 146-296.

Fujii Y, Nomura T, Kanzawa H, Kaneyama M, Yamanaka H, Akita M, Setsu K, Okamoto K. Purification and characterization of enterotoxigen produced by *Aeromonas sobria*. Microbiol Immunol. 1998; 42:703-14.

Gardner SE, Fowlston SE, George WL. Effect of iron on production of a possible virulence factor by *Plesiomonas shigelloides*. J. Clin Microbiol. 1990; 28:811-3.

Gardner SE, Fowlston SE, George WL. In Vitro Production of Cholera Toxin-like Activity by *Plesiomonas shigelloides*. J. Infect Dis. 1987; 156(5):720-3.

Garrity GM, Winters M, Searles DB. Taxonomic outline of the prokaryotic genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2^{ed} ed. Ed. Garrity, G.M. Springer-Verlag. New York, USA. 2001.

Gibotti A, Saridakis H O, Pelayo J S, Tagliari K C and Falcão D P. Prevalence and virulence properties of *Vibrio Cholera* non-O1, *Aeromonas* spp. And *Plesiomonas shigelloides* isolated from cambé (State of Paraná, Brazil). J Appl Microb. 2000; 89: 70-5.

Gonzalez-Rey C, Svenson SB, Bravo L, Siitonen A, Pasquale V, Dumontet S, Ciznar I, Krovacek K. Serotypes and anti-microbial susceptibility of *Plesiomonas shigelloides* isolates from humans, animals and aquatic environments in different countries. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004; 27:129-39.

González-Rey C, Eriksson L, Ciznar I, Krovacek K. Unexpected isolation of the “tropical” bacterial pathogen – *Plesiomonas shigelloides*- from lake water above the Polar Circle in Sweden. *Plar Biol.* 2003.

González-Rey C, Svenson SB, Bravo L, Rosinsky J, Ciznar I, Krovacek K. Specific detection of *Plesiomonas shigelloides* isolated from aquatic environments, animals and human diarrhoeal cases by PCR based on 23 rRNA gene. *FEMS Imm. And Med Microbiol.* 2000; 29:107-13.

Graevenitz AV. Research on *Aeromonas* and *Plesiomonas*. *Exp Birkh Verlag.* 1987; 43:348-73.

Guerrant RL, Brunton LL, Schnaitman TC, Rebhun LI, Gilman AG. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1974; 10:320-7.

Habs H, Schubert RHW. Über die biochemischen Merkmale und die taxonomische Stellung von *Pseudomonas shigelloides* (Bader). *Zentralbl Bakteriol* 1962; 186:316-27.

Han J H, Lee J H, Choi Y H, Park J H, Choi T J, Kong I S. Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1599:106-114.

Henderson DP, Wyckoff EE, Rashidi CE, Verlei H, Oldham AL. Characterization of the *Plesiomonas shigelloides* genes encoding the heme iron utilization system. *J Bacteriol* 2001; 183(9):2715-23.

Henics T, Wheatley DN. Cytoplasmatic vacuolation, adaption and cell death: a view on new perspectives and features. *Biology cell.* 1999; 176:67-72.

Hernandez P, Rodriguez GR. Prevalence of *Plesiomonas shigelloides* in surface water. *Arch Latinoam Nitr.* 1997; 47:47-9.

Herrington D, Tzipori S, Robins-Browne RM, Tall BD, Levine MM. In vitro and in vivo pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Infect Dis.* 1987; 6:633-9.

Holmberg SD, Wachsmuth K, Hickman-Brenner FW, Blake PA, Farmer III JJ. *Plesiomonas* enteric infections in the United States. *Ann Intern Med* 1986; 105:690-4.

Holmberg SD, Farmer III JJ. *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides* as causes of intestinal infections. Rev Infect Dis. 1984; 6:633-9.

Hostacka A, Ciznar I, Krovacek K. Potencial associate properties of environmental *Plesiomonas shigelloides* strains. In: Symposium the *Aeromonas* and *Plesiomonas*. Espanã; 2002.

Hostacka A, Ciznar I, Korych B, Karolcek J. Toxic factors of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. Zentralb Bacteriol Microbiol Hyg. 1982; 252(4):525-34.

Ingram CW, Morrison AJ, Levitz RE. Gastroenteritis, sepsis and osteomyelitis caused by *Plesiomonas shigelloides* in na immunocompetent host: case report and review of the literature. J Clin Microbiol. 1987; 25:1791-3.

Inoue K, Kosako Y, Susuki K, Shimada T. Peritrichous flagellation in *Plesiomonas shigelloides* strains. Jpn J Med Sci Biol. 1991; 44:141-6.

Jagger TD. *Plesiomonas shigelloides* – a veterinary perspective. Infect Dis Rev. 2000; 2(4):199-210.

Islam MS, Alam MJ, Khan SI. Distribution of *Plesiomonas shigelloides* in various components of pond ecosystems in Dhaka, Bangladesh. Microbil Immunol. 1991; 35(11):927-32.

Issa R, Ahmad N, Yasin RM. Distribuição of *Plesiomonas shigelloides* in various components of pond ecosystems in Dhaka, Bangladesh. Microbiol Immunol. 1999; 35:927-32.

Janda JM. Genus XXXVII. *Plesiomonas* Habs and Schubert 1962. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd.ed. New York. Springer-Verlag; 2005; 2(B):740-4.

Janda JM, Abbott SL. Expression of hemolytic activiy of *Plesiomonas shigelloides*. J Clin Microbiol. 1993; 31:1206-8.

Jagger TD. *Plesiomonas shigelloides*-a veterinary perspective. Infect. Dis Rev. 2000a; 2(4):199-210.

Jagger TD, Keane S, Robertson S. *Plesiomonas shigelloides*-an uncommon cause of diarrhoea in cats? Vet Record. 2000;146-296.

Johnson WM, Lior H. Cytotoxicity and suckling mouse reactivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from human sources. Can J Microbiol. 1981; 27:1019-27.

Jonson I, Monsen T, Wiström J. A case report of *Plesiomonas shigelloides* cellulitis and bacteremia from Northern Europe. Scand. J Infect Dis. 1998; 29:631-2.

Kain KC, Kelly MT. Clinical Features, Epidemiology, and Treatment of *Plesiomonas shigelloides* Diarrhea. J Clin Microbiol. 1989; 27(5):998-1001.

Kaur T, Ganguly NK. Modulation of gut physiology through enteric toxins. Mol Cell Biochem. 2003; 253:15- 9.

Kelly MT, Kain KC. Biochemical characteristic and plasmids of clinical and environmental *Plesiomonas shigelloides*. Experimentia. 1991; 47:439-41.

Kirov SM. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: Doyle MP et al. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2nd.ed. Washington, DC. 2001; p.301-27.

Kitajima EW, Dolder MAH, Joazeiro PP. Apostila de microscopia eletrônica de varredura. Apostila (Laboratório de Microscopia Eletrônica), Instituto de Biologia, universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1999.

Klipsten FA, Engert RF. Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. Infect Immun. 1976; 13:1307-1314.

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 Immun. 1989; 57:1290-1298.

Konowalchuck J, Speir J I and Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977; 18: 775-9.

Krovacek K, Eriksson LM, González-Rey C, Cizmar I. Isolation, biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. Comp Immunol. Microbiol. Infect Dis. 2000; 23: 45-51.

Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680-5.

Leunk R D, Jonson P T, David B C, Kraft W G, Morgan D R. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. J Med microbial. 1988; 26:93-99.

Levy DA, Bens MS, Craun GF, Calderon RL, Herwaldt BL. Surveillance for waterborne-disease outbreaks – United States, 1995-1996. Morbid Mortal Weekly Rep CDC Surveill. Summ. 1998; 47:1-34.

MacDonell MT, Swartz DG, Ortiz-Conde BA, Last GA, Colwell RR. Ribosomal RNA phylogenic for the vibrio-enteric group of eubacteria. Microbiol Sci. 1986; 3(6):172-5.

MacDonell MT, Colwell RR. Nuclease S1 analysis of eubacterial 5S rRNA secondary structure. J Mol Evol. 1985; 22(3):237-42.

Mandal BK, Whale K, Morson BC. Acute colitis due to *Plesiomonas shigelloides*. Br Med J. 1982; 2285:1539-40.

Manorama TV, Agarwal RK, Sanyal SC. Enterotoxins of *Plesiomonas shigelloides*: partial purification and characterization. Toxicon Suppl. 1983; 3:269-72.

Martinez-Murcia AJ, Benlloch S, Collins MD. Phylogenetic interrelationships of members of the genera *Aeromonas* and *Plesiomonas* as determined by 16S ribosomal DNA sequencing: lack of congruence with results of DNA-DNA hybridizations. Int J Syst Bacteriol. 1992; 42:412-21.

Martins LM, Catani CF, Falcón RM, Carbonell GV, Azzoni AA, Yano T. Inductions of apoptosis in Vero cells by *Aeromonas veronii* biovar *sobria* vacuolating cytotoxic factor. FEMS Imm Med Microbiol. 2007; 49(2):197-204.

Martins LM, Falcón R M and Yano T. Incidence of toxic *Aeromonas sóbria* isolated from food and clinical cases. FEMS Immun Med Microbiol. 2002; 32: 237-42.

Matthews BG, Douglas H, Guiney DG. Production of a heat stable enterotoxina by *Plesiomonas shigelloides*. Microb Pathog. 1988; 5:207-13.

Medema G, Schets C. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in surface water: relationship with faecal pollution and trophic state. Zentralbl Hyg. 1993; 194:398-404.

Miller ML, Koburger JA. Evaluation of inositol brilliant green bile salts and *Plesiomonas shigelloides* from aquatic samples in a seasonal survey of the Suwannee river estuary. J Food Prot. 1986; 49:274-7.

Miller ML, Kohburger JA. *Plesiomonas shigelloides*: an opportunistic food and waterborne pathogen. J Food Prot. 1985; 48:449-57.

Mitchell DB, Santone KS, Acost D. Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzymr leakage. J Tis Cult Methods. 1980; 6:113-6.

Mitra R, Figueroa-Arredondo P, Mukopadhyay AK, Shimada T, Takeda Y, Berg DE, Nair GB. Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. Infect Immunol. 2000; 68:1928-33.

Mondino SS, Nunes MP, Ricciardi ID. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. Memorias Instituto Oswaldo Cruz. 1995; 90:1-4.

Monge R, Arias-Echandi ML, Utzinger D. Presence of cytotoxic *Aeromonas* and *Plesiomonas shigelloides* in fresch vegetables, Rev Biomed. 1998; 9:176-80.

Manorama TV, Agarwal RK, Sanyal SC. Enterotoxins of *Plesiomonas shigelloides*: partial purification and characterization. Toxin, 1983; 3: 269-72.

Noda M, Yutsudo T, Nakabayashi N, Hirayama T, Takeda Y. Purification and some properties of Shiga-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 that is immunologically identical to Shiga toxin. Microbial Pathog. 1987; 2:339-49.

Nolte FS, Poole RM, Murphy GW, Clark C, Panner BJ. Proctitis and Fatal Septicemia Caused by *Plesiomonas shigelloides* in a Bisexual man. J Clin Microbiol. 1988; 26(2):388-91.

Obi CL, Coker AO, Epoke J, Ndip RN. Enteric bacterial pathogens in stools of residents of urban and rural regions in Nigeria: a comparison of patients with and without diarrhea and controls without diarrhea. J Diarrhoeal Dis Res. 1997; 15:241-7.

Okawa Y, Ohtomo Y, Tsugawa H, Matsuda Y, Kobayashi H, Tsukamoto T. Isolation and characterization of a cytotoxin produced by *Plesiomonas shigelloides* P-1 strain. FEMS Microbiol Letters. 2005; 239(1):125-30.

Okawa Y, Ohtomo Y, Tsugawa H, Matsuda Y, Kobayashi H & Tsukamoto T. Isolation and characterization of a cytotoxin produced by *Plesiomonas shigelloides* P-1 strain. FEMS Microbiol Lett. 2004; 239:125-130.

Old D C. Inhibition of interaction between fimbrial haemagglutinins and erythrocytes by D-manose and the carbohydrates. J Gen Microbiol. 1972; 71:149-57.

Olsvik Ø, Wachsmuth K, Kay B, Birkness KA, Yi A, Sack B. Laboratory observations on *Plesiomonas shigelloides* strains isolated from children with diarrhea in Peru. J Clin Microbiol. 1990; 28:886-9.

Parejo S, De Otero SJ, Ferrer F, Elias D, Sandiumenge M. Atypical presentation of *Plesiomonas shigelloides* infection. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2002; 20(5):236.

Pasquale V and Krovacek K. Isolamenti di *Plesiomonas shigelloides* da ambienti Marini costieri. Biolgi Ital. 2001; 6:47-50.

Paton A W, Paton J C. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* HlyA, rfbO111, and rfb O 159. J Clin Microbiol. 1998; 36: 598-602.

Pitarangsi C, Echeverria P, Whitmire R, Tirapat C, Formal S, Dammin GJ, Tingtalapong M. Enteropathogenicity of *Aeromonas Hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: prevalence among individuals with and without diarrhea in Thailand. Infect Immun. 1982; 35:666-73.

Rautelin H, Sivonen A, Kuikka A, Renkonen OV, Valtonen V, Kounen TU. Enteric *Plesiomonas shigelloides* infections in Finnish patients. Scand. J Infect Dis. 1995; 27:495-8.

Reinhardt JF, George WL. *Plesiomonas shigelloides*-associated diarrhoea. JAMA. 1985; 253:3294-5.

Ruiz MC, Elcuaz R, Silgueiro D, Lafarga B. Enteritis por *Plesiomonas shigelloides* : aspectos clínicos y epidemiológicos. Enfrm Infecc Microbiol Clin. 1995; 13:192-3

Rutala WA, Sarubi FA Jr, Finch CS, McCormack JN, Steinkraus GE. Oyster-associated outbreak of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. Lancet. 1982; 1:739.

Ruymi R, Breittmayer V, Elbaze P, Lafay B, Boussemart O, Gauthier M, Christen R. Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*. 1994; 44:416-26.

Salvadori MR, Chudzinski-Tavassi AM, Baccaro MR, Ferreira CSA, Ferreira AJP, Prado-Fonranceschi J, Yano T. Lethal factor to mice produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome. *Microbiol Immunol*. 2002; 46:773-5.

Salvadori MR, Yano T, Carvalho HF, Pariera VR, Gyles CL. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Diseases*. 2001; 45:43-51.

Sansonitte PJ. Bacterial pathogens, from adherence to invasion: comparative strategies. *Med Microbiol Immun*. 1993; 223–32.

Santos JA, Gonzáles CJ, López TM, Otero A, Garcia-López ML. Hemolytic and elastolytic activities influenced by iron in *Plesiomonas shigelloides*. *J Food Prot* 1999; 62(12):1475-7.

Sanyal SC, Sarawathi B & Sharma P. Enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *J Med Microbiol* . 1980; 13:401-9.

Sanyal SC, Singh SJ, Sen PC. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *J Med Microbiol*. 1975; 8:195-8.

Saraswathi B, Agarwal RK, Sanyal SC. Further studies on enteropathogenicity of *Plesiomonas shigelloides*. *Indian J Med Res*. 1983; 78:12-8.

Sayeed S, Sack DA, qadri F. Protection from *Shigella sonnei* infection by immunization of rabbits with *Plesiomonas shigelloides* (SVC 01). *J Med Microbiol*. 1992; 37:382-4.

Scaletsky ICA, Silva MLM, Trabulsi LR. Distictive patterns of adherence of enterophogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infection Immunity*. 1984; 45:534-6.

Schubert RHW. *Plesiomonas*. In: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Krieg NR & Holt JG, Editors. Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 1984. vol.1, p. 548-50.

Schultsz C, Pool GJ, Vanketel R, Dewever B, Speelman P, Dankert S. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in stool samples by using nonradiatively labeled oligonucleotide DNA probes and PCR. J Clin Microbiol. 1994; 32:2393-7.

Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. Microbiol Rev. 1996; 60:167-215.

Shigematsu M, Kaufmann ME, Charlett A, Niho Y, Pitt TL. An epidemiological study of *Plesiomonas shigelloides* diarrhea among Japanese travelers. Epidemiol Infect. 2000; 125:523-30.

Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Kosako Y, Inoue K, Ahengshi Y, Aldova E. New O and H antigens of *Plesiomonas shigelloides* and their O antigenic relationships to *Shigella boydii*. Curr Microbiol. 1994; 28:351-4.

Shimada T, Sakazaki R. One the serology of *Plesiomonas shigelloides*. Jpn J Med Sci Biol. 1978; 31:135-42.

Shubert RHW, Holz-Bremer A. Cell adhesion of *Plesiomonas shigelloides*. Zentr. Hyg Umw. 1999; 202(5): 383-5.

Shubert R & Pelz E. The occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in the water and md of ponds. Hyg Med. 1993; 18:148-52.

Shubert RHW, Beichert R. The influence of treated sewage effluentes on the numbers of *Plesiomonas shigelloides* isolated from river waters. Hyg Med. 1993; 18, 57-9.

Song T, Toma C, Nkasone N, Iwanaga M. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar sobria. J Med Microbiol. 2004; 53: 477-82.

Souza W. Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicada às ciências biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia. Rio de Janeiro. 1998; 1-179.

Stroeher U H, Bode L, Beutin L, Manning P A. Characterization and sequence of a 33-KDa enterohemolysin (Ehly1) – associated protein in *Escherichia coli*. Gene. 1993;132:89-4.

Swerdlow D L, Woodruff B A, Brady R C, Griffing P M, Tippen S, Donnell JR H D, Geldreich E, Payne B J, Meyer JR A, Wells J G, Greene K D, Bright M, Bean N H, Blake P A. A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. Annals Inter Med. 1992; 117: 812-819.

Takeda T, Peina Y, Ogawa A, Dohi S, Abe H, Balakrish Nair , Pal SC. Detection of heat-stable enterotoxin in a cholera toxin gene-positive strain of *Vibrio cholerae* O1. FEMS Microbiol Lett. 1991; 80:23-8.

Takeda Y. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Pharmac Ther. 1983; 19:123-46.

Taylor DN, Echeverria P, Blaser MJ, Pitarangsi C, Blacklow N, Cross J, Weniger BG. Polymicrobial aetiology of traveller's diarrhoea. Lancet. 1985; 1:381-3.

Theodoropoulos C, Wong TH, O'Brien M, Stenzel D. *Plesiomonas shigelloides* Enters polarized Human Intestinal Caco-2 Cells in an In Vitro Model System. Infect Immun. 2001; 69(4):2260-9.

Thompson CB. Apoptosis in the Pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995; 267:1456-61,

Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci. 1979; 76: 4350-4.

Tsugawa H, Ono T, Murakami H, Okawa Y. Invasive phenotype and apoptosis induction of *Plesiomonas shigelloides* P-1 strain to Caco-2 cells. J Appl Microbiol. 2005; 99: 1435-43.

Tsukamoto T, Kinoshita Y, Shimada T, Sakazaki R. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. J Hyg. 1978; 80:275-80.

Van Damme LR, Vandepitte J. Isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from mammals and birds in Zaire. Rev Elev Med Vet Pays trop. 1984; 37(2):145-51.

Van Loon FPL, Rahim Z, Chowdhury KA, Kay BA, Rahman SA. Case report of *Plesiomonas shigelloides* – associated persistent dysentery and pseudomembranous colitis. J Clin Microbiol. 1989; 27(8):1913-5.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. J Immunol Methods. 1995; 182: 39-51.

Vitovec J, Aldova E, Vladik P, Krovacek K. Enterpathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* and aeromonas spp. In experimental mono- and coinfection with *Cryptosporidium parvum* in the intestine of neonatal BALB/c mice. Comp Imm Microbiol Infect. Dis. 2001; 24, 39-55.

Vladik P, Vitovec J. *Plesiomonas shigelloides* in rainbow trout septicemia. Vet Med (Praha). 1974; 19:297-300.

Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurozono H, Takeda Y, Yoshida O. Detection of urovirulence factor in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995; 12: 85-95.

Yeh TJ, Tsai WC. *Plesiomonas shigelloides*-associated diarrhea. Chin Med J. (Taipei). 1991; 47, 362-8.

Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol. 1999; 53:155-87,

Welkos S, O'Brien. A Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. Methods Enzymol. 1994; 235:29-39.

Wixson SK, Smiller KL. Anesthesia and Analgesia in Rodents. In: Kohn DF, Wixson SK, White WJ, Benson J. editors. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. San Diego, California: Academic Press. 1997; p. 165-203.

Wong TY, Tsui HY, So MK, Lai ST, Tse CWS, Ng TK. *Plesiomonas shigelloides* infection in Hong Kong: retrospective study of 167 laboratory-confirmed cases. Hong Kong Med J. 2000; 6, 375-80.

Zakhariev ZA. *Plesiomonas shigelloides* isolated from sea water. J. Hyg Epidemiol. Microbiol. Immunol. (Praga). 1978; 15:402-4.