

JULIANA FALCÃO RODRIGUES

**Diversidade genética do óperon *etx* em amostras
de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC):
determinação da variabilidade das seqüências
gênicas e capacidade de síntese da toxina
termo-lábil (LT)**

RESUMO

RODRIGUES, J.F. **Diversidade genética do óperon *etx* em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): determinação da variabilidade das seqüências gênicas e capacidade de síntese da toxina termo-lábil (LT).** 2009. Tese de Doutorado (Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) são consideradas como importante agente de diarreia, principalmente entre crianças e turistas em países em desenvolvimento. Entre os fatores de virulência expressos por ETEC, as enterotoxinas termo-lábil (LT) e termo-estável (ST) representam os mais relevantes fenótipos. Evidências preliminares sugerem que a severidade da diarreia associada a linhagens de ETEC deve refletir a diversidade natural de linhagens selvagens quanto à produção de enterotoxinas e/ou à ocorrência de variantes naturais com efeitos tóxicos reduzidos. No presente trabalho, investigamos diversidade genética do óperon *etx*, que codifica para a toxina LT, e da capacidade de produção e secreção de LT por linhagens de ETEC isoladas de humanos ou suínos em diferentes regiões geográficas. Os resultados mostraram considerável variabilidade na produção de LT com valores variando de 2 a 2.525 ng de toxina por mL de cultura. Secreção de LT foi também variável com valores variando de menos que 0,04% a 49,5% do total de LT produzida pelas diferentes linhagens de ETEC. Adicionalmente, experimentos de alça ligada em coelho mostraram uma boa correlação entre a quantidade de LT secretada sob condições *in vitro* e a capacidade de causar acúmulo de fluidos *in vivo*. Nós determinamos ainda diversidade de ETEC pela obtenção das seqüências dos óperons *etxAB* de 50 linhagens (LT⁺ or LT⁺/ST⁺) pertencentes a diferentes sorotipos com ênfase para as linhagens produtoras apenas de LT e isoladas de crianças assintomáticas. As seqüências de nucleotídeo completas dos genes *etxAB* revelaram 23 alterações de aminoácidos nas subunidades A (18) e B (5), as quais geraram 16 variantes de LT. Entre estas variantes de LT, um mostrou efeito tóxico reduzido em comparação à toxina de referência LT1. A forma de LT atenuada (LT4) tem atividade enzimática reduzida devido à troca de aminoácido

(K4R) na subunidade A1. LT4 manteve suas propriedades imunogênica e adjuvante após imunização nasal. Além disto, o variante LT4 mostrou aspectos imunomoduladores alterados e promoveu uma resposta contra o antígeno co-administrado (OVA) para um padrão tendenciado para Th1, o que favoreceu a ativação de linfócitos T CD8⁺ efetores, em relação à toxina LT1. Nossos resultados demonstram que linhagens de ETEC isoladas de humanos expressam variabilidade genética natural, levando a um considerável polimorfismo do óperon *etx*, bem como da produção e secreção de LT. Tal diversidade genética natural observada em linhagens de ETEC deve afetar as relações parasito-hospedeiro e, conseqüentemente, contribuir para a severidade da doença entre indivíduos infectados.

Palavras-chave: ETEC; Toxina termo-lábil; Diversidade genética; Produção/secreção; Variante natural; Adjuvante de mucosa.

ABSTRACT

RODRIGUES, J.F. **Genetic diversity of *etx* operon in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains: determining the variability of gene sequences and the ability to synthesis of heat-labile toxin (LT).** 2009. Doctoral Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains represent an important etiological agent of diarrheal disease, particularly among children and travelers in developing countries. Among the virulence factors expressed by ETEC strains the heat-labile (LT) and heat-stable (ST) enterotoxins represent the most relevant phenotypes. Indirect evidences suggest that the severity of diarrhea associated to ETEC strains might reflect the natural diversity of wild strains to produce enterotoxins and/or the occurrence of variants endowed with reduced toxic effects. In the present study, we investigated both the genetic diversity of the *etx* operon, encoding the heat-labile toxin, and the capability to produce/secrete LT by ETEC strains isolated from humans or porcine in different geographic areas. The results showed a remarkable variability on the production of LT with values ranging from 2 to 2,525 ng of toxin per ml of culture. LT secretion was also variable with values ranging from less than 0.04% to 49.5% of total LT produced by the different ETEC strains. Additionally, rabbit ileal loop experiments showed a good correlation between the amounts of secreted LT under *in vitro* conditions and fluid accumulation *in vivo*. We determined also the diversity of the *etxAB* operon of 50 ETEC strains (LT⁺ or LT⁺/ST⁺) belonging to different serotypes with emphasis to LT⁺-only producing strains isolated from asymptomatic children. The complete nucleotide sequences of the *etxAB* genes revealed 23 amino acid changes at the A (18) or B (5) subunits, which generated 16 variant forms of LT. Among these LT variants, one of them showed reduced toxic effects in comparison to the reference toxin LT1. The attenuated LT form (LT4) had decreased enzymatic activity due to an amino acid replacement (K4R) at the A1 subunit. LT4 retains its immunogenic and adjuvant properties following nasal immunization. Additionally, the LT4 variant showed altered immune modulatory features and promoted a more biased Th1

response, which favor activation of effector CD8⁺ T lymphocytes, to co-administered antigen with regard to LT1. Taken together, our results demonstrate that ETEC strains isolated from human subjects express natural genetic variability leading to a remarkable polymorphism of the *etx* operon as well as production and secretion of LT. Such natural genetic diversity observed in ETEC strains may affect the host-pathogen relationships and, consequently, contribute to the severity of the disease among infected subjects.

Key Words: ETEC; Heat-labile toxin; Genetic diversity; Production/secretion; Natural variant; Mucosal adjuvant.

1 INTRODUÇÃO

As diarréias infecciosas têm sido reconhecidas como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em países em desenvolvimento e regiões que não dispõem de condições adequadas de saneamento básico. Entre os patógenos virais, o rotavírus é a mais comum causa de diarréia em crianças de 2 a 3 anos de idade. Dentre os parasitas enteropatogênicos, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Cryptosporidium* spp são os mais importantes. Os patógenos bacterianos comumente associados com diarréia nesses países são *Escherichia coli* diarreogênicas, *Vibrio cholerae*, *Shigella* spp, *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* spp (CHAKRABORTY *et al.*, 2001). A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) é uma importante causa de episódios diarreicos em crianças de 1 a 5 anos de idade em países em desenvolvimento, resultando em aproximadamente 380 mil óbitos anuais [World Health Organization (WHO, 2006)].

ETEC pode ainda acometer adultos imunodeprimidos e representa o principal agente etiológico causador da “diarréia dos viajantes” entre adultos de países desenvolvidos visitando áreas endêmicas, onde infecções por ETEC são freqüentemente assintomáticas (ARDUINO e DUPONT, 1993; MATTILA, 1994; WOLF, 1997). As infecções em humanos causadas por linhagens de ETEC induzem quadros clínicos bastante diversificados, variando de uma diarréia leve e auto-limitante a episódios diarreicos tipo cólera desidratante e fatal (BLACK, 1993). Linhagens de ETEC também causam diarréia em animais domésticos, o que implica em importantes perdas econômicas na criação de bovinos, caprinos, suínos e aves (HIRST, 1999).

A patogenicidade ocasionada por linhagens de ETEC é resultante da produção de enterotoxinas termo-lábil (LT) e/ou termo-estável (ST) e fatores de colonização (CFs). Esses fatores são proteínas presentes na superfície das bactérias capazes de reconhecer receptores específicos na superfície de células epiteliais ou eritrócitos, permitindo a colonização da mucosa do intestino delgado pela bactéria (COHEN e GIANNELLA, 1995). A colonização pode ser mediada por um ou mais CFs que são fibrilares ou fimbriais e são designados por CFA

(antígeno de fator de colonização), CS (antígeno de superfície de coli) ou PCF (fator de colonização pontual). Mais de 20 CFs distintos antigenicamente foram caracterizados e estudos epidemiológicos apontam que aproximadamente 75% das ETEC isoladas de humanos expressam CFA/I, CFA/II ou CFA/IV (WOLF, 1997). Algumas adesinas ainda são referidas através de seus nomes originais, como por exemplo, para a fimbria K88 que é encontrada em ETECs isoladas de suínos (RUTTER *et al.*, 1975).

As LTs de ETEC são toxinas estritamente relacionadas em estrutura e função à toxina colérica (CT) expressa por *Vibrio cholerae* (SIXMAN *et al.*, 1993). Ambas são sintetizadas como toxinas oligoméricas compostas por uma subunidade A de 28 kDa e 5 subunidades idêntica de 11,5 kDa (STREATFIELD *et al.*, 1992). As subunidades B são arranjadas em anel e ligam-se fortemente ao gangliosídeo GM1 e fracamente a diversos glicoesfingolipídios (GD1b, GD1a, asialo-GM1, GM2, paraglobosídios, dentre outros) e a algumas glicoproteínas intestinais, mediando a interação da toxina à célula eucariótica (TENEBERG *et al.*, 1994; HAAN e HIRST, 2004). Após a ligação à membrana da célula hospedeira, principalmente em microdomínios de membrana sem caveolina e ricos em glicoesfingolipídios (“rafts” de lipídios), a toxina é endocitada e direcionada para o retículo endoplasmático (RE) via transporte retrógrado dependente ou não do complexo de Golgi. Uma vez no RE, a subunidade A é dissociada do pentâmero B e a região carboxi-terminal RDEL da subunidade A2 funciona como o principal sinal de retenção da LTA no lúmen do RE (SÁNCHEZ e HOLMGREN, 2005). Posteriormente, a LTA é processada e o peptídeo A1 enzimaticamente ativo é liberado no citoplasma, onde interage com fatores de ADP-ribosilação (ARFs) e catalisa a ADP-ribosilação da proteína estimulatória GTP-ligante ($G\alpha$), ativando uma cascata de reações enzimáticas que culminam na elevação intracelular de AMP cíclico (AMPc). O aumento de AMPc causa um desequilíbrio no transporte de eletrólitos pelos enterócitos, com decréscimo na captura de sódio e aumento na liberação de ânions pelas células, principalmente de íons Cl^- , diminuindo a absorção de água e a perda desta pelos enterócitos. Assim, o acúmulo de água e eletrólitos no lúmen do intestino delgado desencadeado pela ação enzimática da LT resulta na diarreia aquosa. LT pode ainda estimular síntese de prostaglandina de forma dependente ou não de AMPc

e estimular o sistema nervoso entérico, ativando a secreção e inibição de absorção de íons e água (FIELD, 1980).

A capacidade de LT ativar vias de sinalização nas células hospedeiras não está limitada à indução de AMPc e de outros mensageiros secundários. A ligação da subunidade B a receptores gangliosídios pode ainda induzir alterações na composição dos agrupamentos de lipídios associados a proteínas e formados na membrana externa, principalmente glicosfingolípídios, resultando em mudanças de transdução de sinais intracelulares que podem culminar em ativação celular, proliferação e diferenciação em vários tipos de células, incluindo células imunológicas, ou mesmo podem resultar em sinais apoptóticos induzidos por LTB (ARCE *et al.*, 2005; HAAN e HIRST, 2004; MILJAN e BREMER, 2002).

Os genes específicos para a produção de LT são encontrados em plasmídeos de alto peso molecular, os quais são denominados ENT (GYLES *et al.*, 1977). Estes plasmídeos parecem ser transmissíveis por conjugação, e freqüentemente, possuem genes adicionais para o fenótipo de resistência a antimicrobianos e produção de antígenos de colonização (SMITH e LINGGOOD, 1971; GYLES *et al.*, 1977). As subunidades A e B da enterotoxina LT são codificadas pelos genes *etxA* e *etxB* sobrepostos em quatro nucleotídios e organizados em um óperon, que possui seqüência promotora consenso para ligação da RNA polimerase localizada à montante do gene *etxA*. O óperon *etxAB* possui um promotor moderadamente forte, com elementos centrais ideais para ligação da subunidade σ da RNA polimerase no promotor, incluindo uma região –35 perfeita e um espaçamento ótimo de 17 pb. A região –10 e a seqüência entre esta região e o sítio de início da transcrição são altamente ricos em AT, o que facilita a abertura do promotor e transcrição dos genes *etxA* e *etxB*. No entanto, o óperon *etxAB* é regulado negativamente pela proteína nucleóide-estrutural termo-estável (HN-S), impedindo a expressão do óperon quando a bactéria não está no seu hospedeiro (TRACHMAN e MASS, 1998; YANG *et al.*, 2005). HN-S é um repressor de transcrição global, que não reconhece uma seqüência específica do DNA, mas apresenta uma forte preferência por regiões no DNA com curvatura intrínseca. Essas curvaturas podem ser alteradas diante de mudanças ambientais como temperatura e osmolaridade e, dessa forma, a regulação negativa por HN-S

pode ser amenizada e a as proteínas reguladas por este mecanismo produzidas (RIMSKY *et al.*, 2001). De fato, evidências apontam que HN-S é capaz de inibir a expressão do óperon *etxAB* em 5 vezes a 37 °C e em 10 vezes a 22 °C e mudanças na osmolaridade do ambiente também afetam a expressão do referido óperon. A ação da proteína HN-S pode ser adicionalmente regulada por várias proteínas bacterianas, que desligam HN-S do DNA, como a proteína ToxT que está envolvida na regulação do promotor *ctx* em *V. cholerae*. Em linhagens de ETEC, entretanto, não se identificou ainda um repressor de HN-S (YANG *et al.*, 2005; YU e DIRITA, 2002). Vale salientar que HN-S também regula em ETEC outros fatores relacionados à virulência, como sistema de secreção do tipo II e CFs (HORSTMAN e KUEHN, 2002; SÁNCHEZ e HOLMGREN, 2005).

Mecanismos pós-transcricionais também participam da regulação da produção de LT, entretanto, informações na literatura sobre o assunto são extremamente escassas. O fato de ambas as subunidades A e B serem expressas a partir de um RNA mensageiro (RNAm) policistrônico significa que níveis relativos de síntese das subunidades A e B devem ser governados por eventos que ocorrem durante os processos traducionais. A explicação mais aceitável atualmente para a expressão balanceada das subunidades A e B baseia-se em diferenças na eficiência das seqüências Shine-Dalgarno (SD), que estão localizadas à montante dos códons de iniciação dos cistrons A e B (HIRST, 1999). Dorsey e colaboradores (2006) obtiveram indícios adicionais de que a produção de LT é regida por eventos de regulação pós-transcricionais. Esses autores não observaram diferenças significativas entre os níveis de RNAm LT-específico produzidos por ETEC H10407 quando esta foi cultivada em meio CAYE e LB, ao passo que em CAYE a quantidade de LT produzida foi drasticamente maior do que em LB.

Uma vez que os polipeptídios precursores das subunidades A e B tenham sido sintetizados sob controle diferentes eventos de regulação, ocorre na bactéria a remoção do peptídio sinal durante o transporte *sec*-dependente através da membrana citoplasmática para o periplasma, onde os polipeptídios maduros são montados e a holotoxina formada (SPANGLER, 1992; HIRST, 1999). Esta é a primeira etapa da via de secreção geral (GSP), que é um sistema de secreção do tipo II descrito para várias espécies bacterianas e associado com a secreção

extracelular de fatores de virulência (SANDKVIST, 2001). Em ETEC este mecanismo está envolvido no transporte de LT para meio extracelular e possui uma segunda etapa conhecida como sistema terminal principal do GSP (TAUSCHEK *et al.*, 2002). Inicialmente, a ETEC foi considerada ser incapaz de secretar LT, mantendo a toxina no periplasma e liberando-a apenas após lise celular (HIRST *et al.*, 1984). Para reforçar esta idéia, observou-se que derivados de *E. coli* K-12, que possuem região cromossomal contendo genes *gsp*, não foram capazes de secretar LT e CT do espaço periplasmático. Por outro lado, a observação de LT nos sobrenadantes de culturas de ETEC e a ocorrência de diarreia tipo cólera em infecções causadas por esses organismos apontaram a possibilidade de existência de um sistema secretor para a LT (FLECKENSTEIN *et al.*, 2000; KUNKEL e ROBERTSON, 1979). De fato, Tauschek e colaboradores (2002) demonstraram a ocorrência do agrupamento de genes *gsp* em diversas linhagens de ETEC e a importância do sistema GSP na secreção da toxina por ETEC. No referido estudo, a inativação por inserção de um cassete de resistência no gene *gspD* na linhagem de referência H10407 gerou uma linhagem mutante (MT13) incapaz de secretar toxina para o meio de cultura e de causar efeito citotônico em células adrenal Y1.

Alguns autores relatam ainda que, uma vez exportada da célula pelo sistema de secreção do tipo II, a LT pode interagir com o LPS na superfície da bactéria através de uma região na subunidade B da toxina, permanecendo assim associada à membrana externa ou sendo secretada para o lúmen intestinal através de um segundo mecanismo que envolve a liberação de vesículas da membrana. Essas vesículas contêm também LT no lúmen, além daquelas expostas nas superfícies. A LT aderida na superfície das vesículas pode interagir com o receptor GM1, que está presente na superfície dos enterócitos, e o com LPS simultaneamente (HORSTMAN e KUEHN, 2000, 2002). Segundo a literatura, a LT associada a vesículas seria captada pelas células eucarióticas e ativaria a adenilato ciclase. Entretanto, mantém-se em questão se a quantidade de LT ligada às vesículas é suficiente para induzir diarreia por ETEC (SÁNCHEZ e HOLMGREN, 2005). Um terceiro mecanismo de secreção específico para ETEC foi reportado por Fleckenstein *et al.* (2000). Neste último trabalho, a deleção do

gene *leoA* aboliu a secreção de LT para o sobrenadante e causou acúmulo de toxina no periplasma, além de um decréscimo de toxicidade *in vivo*. No entanto, o papel molecular do produto do gene *leoA* na secreção de LT permanece não caracterizado.

Diante das informações apontadas acima, fica evidente a complexidade de eventos necessários para a produção e secreção da toxina LT e a susceptibilidade à diversidade aos quais estes mecanismos estão expostos. De modo que é passível de se imaginar a existência de variabilidade na capacidade de linhagens de ETEC produzirem e secretarem LT. Além disso, alguns poucos relatos não sistematizados na literatura indicam que amostras de ETEC podem produzir quantidades diferenciadas de LT, o que sugere uma possível associação com a severidade da doença diarréica (ECHEVERRIA *et al.*, 1977; FLECKENSTEIN *et al.*, 2000; TAUSCHEK *et al.*, 2002). Uma das propostas de trabalho presente nesta tese de doutorado representa um estudo sistemático, e inédito, sobre a capacidade de produção e secreção da toxina LT por linhagens de ETEC isoladas de pacientes sintomáticos ou não. Assim, esperamos ajudar a esclarecer como a capacidade de produção de LT pode influenciar na manifestação clínica da doença diarréica associada a linhagens de ETEC produtoras apenas de LT.

Diversidade em linhagens de ETEC pode ser observada em diferentes estudos na literatura que abordaram investigações moleculares e epidemiológicas. Dentre estes estudos, foi visto que linhagens de ETEC são usualmente enquadradas em sorotipos baseados na composição de lipopolissacarídeos (LPSs) (antígeno O) e de flagelo (antígeno H) (LEVINE, 1987). A maioria das amostras de ETEC apresenta alguma associação entre fatores de virulência, enterotoxinas e CFs, e certos sorotipos O:H (ORSKOV *et al.*, 1976). No entanto, não existem evidências de correlação entre agrupamento de antígenos e localização geográfica, posto que um determinado país ou região pode exibir uma variedade de fenótipos (WOLF, 1997; PACHECO *et al.*, 1998). Dentre os antígenos O e H frequentemente associados a ETECs isoladas de casos diarréicos humanos estão O27:H7, O8:H9, O78:H12, O128:H12, O6:H16, O148:H28, O25:H42 e O153:H45 (WOLF, 1997). Alguns tipos H foram fortemente

associados com um CFA (H11, H12, e H45 com CFA/I; H16 e H51 com CFA/II; e H20 e H42 com CFA/IV) ou com uma toxina (H20 e H45 com ST, e H11 e H16 com LT/ST). Além disso, o fenótipo O6:H16 CFA/II LT/ST de ETEC foi o mais extensamente distribuído e mais freqüentemente encontrado em diferentes países e regiões do mundo (WOLF, 1997). Essas observações levam à formulação da hipótese clonal, a qual postula que isolados bacterianos expondo os mesmos traços fenotípicos, como sorotipos, biotipos e fatores de virulência, representam linhagens de células estáveis que permanecem isoladas devido à baixa taxa de recombinação cromossômica (ORSKOV *et al.*, 1976; ORSKOV e ORSKOV, 1977). Estudos da diversidade genética entre linhagens de ETEC através de amplificação aleatória do DNA polimórfico (RAPD) e de eletroforese em gel de campo pulsátil (PFGE) suportam a concepção clonal e indicam que linhagens com o mesmo sorotipo e, em muitos casos, outros traços fenotípicos são relacionados geneticamente, embora tenham sido isoladas em diferentes posições geográficas e temporais (PACHECO *et al.*, 1997; PACHECO *et al.*, 1998; PACHECO *et al.*, 2001). Existe uma outra possibilidade que refere-se à transferência horizontal de genes codificando traços selecionados positivamente, como fatores de virulência, entre linhagens distintas geneticamente (PACHECO *et al.*, 2001).

Variabilidade entre linhagens de ETEC pode ser também vislumbrada pela ocorrência de variantes naturais de LT sob aspectos estruturais, imunológicos e genéticos, que foram observados por diversos grupos de pesquisa. As LTs subdividem-se em dois sorogrupos maiores, LT-I e LT-II, que não apresentam reação cruzada imunologicamente, diferindo entre si também nos pontos isoelétricos e no reconhecimento de receptores celulares (NATARO e KAPER, 1998). LT-I apresenta dois variantes intimamente relacionados, que exibem reatividade antigênica cruzada. Esses variantes foram denominados LTp (LTp-I) e LTh (LTh-I) depois de serem descobertos de início em isolados de porco e humanos, respectivamente (NATARO e KAPER, 1998). LTp, LTh e CT compartilham determinantes antigênicos comuns, porém, cada enterotoxina também possui determinantes antigênicos únicos (HONDA *et al.*, 1981). Diferenças entre LTp e LTh são encontradas ao nível de conformação e tamanho da região B e subunidades B, de composição de aminoácidos e de seqüência de nucleotídeos (GEARY *et al.*, 1982; LEONG *et al.*, 1985). Leong *et al.* (1985),

estudando a seqüência dos cistrons de LT-Bh e LT-Bp de linhagens de ETEC de humano (H10407) e de porco (P307), respectivamente, observaram que ambos os cistrons são compostos por 375 pares de bases de nucleotídeos e mutações pontuais foram encontradas em 8 posições, das quais seis poderiam resultar em variações de aminoácidos na subunidade A (K4R K213E) e subunidade B (S4T, A46E, E102K). Eles detectaram ainda a presença de um sítio de reconhecimento enzimático para endonuclease *HhaI* em *etxBh* e ausência em *etxBp*.

Diversidade genética de LT tem sido também encontrada naturalmente entre linhagens de ETEC isoladas de humanos, embora alguns trabalhos tenham sugerido que o óperon *etx* de ETEC seria relativamente conservado e que pequenas diferenças poderiam ser encontradas a partir de diferentes hospedeiros (YAMAMOTO e YOKOTA, 1983; YAMAMOTO *et al.*, 1984; LEONG *et al.*, 1985; INOUE *et al.*, 1993). De fato, até 1993 duas únicas linhagens de ETEC produtoras de LTh (H10407 e H74-114) haviam sido analisadas quanto às seqüências dos genes *etxA* e *etxB* e mostraram quatro alterações de aminoácidos (R212K, K213E e N238 na subunidade A; R13H na subunidade B). Mais recentemente, um variante de LT foi reportado ser codificado por um óperon *etx* integrado ao cromossomo de uma linhagem isolada de um turista japonês. Este variante de LT apresentou quatro sítios polimórficos na subunidade A (S190L, G196D, K213E, S224T) e um na subunidade B (T75A) em comparação à LT isolada da ETEC H10407 (IMAMURA *et al.*, 1997).

Mutações pontuais resultantes de trocas de nucleotídeos (SNPs) podem levar a alterações genéticas que oferecem uma vantagem seletiva durante o curso de uma infecção isolada, de uma disseminação epidêmica ou evolução de virulência a longo prazo (HACKER *et al.*, 2003). Variação alélica de LT pode servir como uma ponte molecular de um comportamento comensal para um comportamento patogênico por linhagens de ETEC, sendo possível também observar a relação inversa, posto que linhagens de ETEC, albergando apenas LT com SNPs foram encontradas em pacientes assintomáticos (ANG-SIMÕES, 2003). O estudo da diversidade genética de LT pode nos prover informações de como a SNPs podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de patogenicidade desenvolvidos por esta enterotoxina e dos mecanismos

regulatórios envolvidos na sua expressão, como também esclarecer a dinâmica evolutiva do óperon *etx* em populações de ETEC, considerando a distribuição de variantes alélicas entre diferentes sorotipos. Assim, no presente trabalho nos propusemos a realizar também um estudo do polimorfismo natural do operon *etx* em amostras de ETEC, isoladas de pacientes diarréicos ou assintomáticos, pertencentes a diferentes sorotipos e provenientes de diferentes regiões geográficas.

A toxina LT não apresenta sua importância calcada apenas no seu caráter patogênico, mas também levanta interesses quanto às suas propriedades imunobiológicas, que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de adjuvantes vacinais. As toxinas LT e CT são reconhecidas como os mais potentes adjuvantes de mucosa, principalmente sob a via oral de inoculação, por induzir altos títulos de anticorpos sistêmicos e locais contra o antígeno co-administrado ou fusionado, como também por serem capazes de prevenir a tolerância contra antígenos específicos administrados oralmente (LYCKE e HOLMGREN, 1989; O'HAGAN e VALIANTE, 2003). Estas toxinas são ainda capazes de induzir potente resposta de anticorpos, sistêmica e secretada, quando administradas pelas vias parenteral (subcutânea, intradérmica, intramuscular) e transcutânea (TCI) (GLENN *et al.*, 1998; ZOEREWEIJ *et al.*, 2006).

Embora os mecanismos envolvidos na imunogenicidade e nas atividades adjuvantes da LT não estejam totalmente esclarecidos, algumas propriedades são apontadas com base em evidências experimentais: (i) capacidade de interagir com uma série de tipos celulares, que incluem células epiteliais e células do sistema imunológico, induzindo a produção de citocinas e/ou de moléculas pro-inflamatórias como prostaglandinas e leucotrienos; (ii) aumentar a apresentação de antígenos; (iii) induzir o aumento de expressão de moléculas co-estimuladoras em células apresentadoras de antígenos (APCs); (iv) promover a mudança de isotipo de superfície de células B IgM⁺ para linfócitos B sIgG⁺ e sIgA⁺ e (v) capacidade de persistir em superfícies de mucosa e aumentar a permeabilidade dos tecidos expostos para a penetração dos antígenos co-administrados aos tecidos adjacentes, onde células do sistema imune podem ser encontradas (HIRST, 1999; MARTIN *et al.*, 2002; FREYTAG e CLEMENTS, 2005). Essas

propriedades em parte são atribuídas ao aumento dos níveis intracelulares de AMPc associado à atividade ADP-ribosilante promovida pela subunidade A e em parte à capacidade de interação da toxina através da subunidade B a receptores de membrana nas células hospedeiras. Regiões regulatórias presentes na LT são também associadas com o efeito adjuvantes, posto que foi relatada a existência de mutantes de LT produzidos em laboratório que preservaram suas atividades enzimáticas e de ligação ao GM1, mas apresentaram adjuvantividade reduzida (RYAN *et al.*, 2000; FRASER *et al.*, 2003; HAJISHENGALLIS *et al.*, 2005).

A principal limitação no uso dessas enterotoxinas como adjuvantes em formulações vacinais dirigidas para humanos é obviamente o efeito tóxico desencadeado até mesmo quando pequenas doses são administradas por via de mucosa ou parenteral (FREYTAG e CLEMENTS, 2005). Por isso, vários grupos de pesquisa investiram em estudos que gerassem mutantes de LT atóxicos ou atenuados. A LTK63 é um exemplo de um desses mutantes atóxicos e apresenta a substituição de uma serina por uma lisina na posição 63 da subunidade A, região onde o NAD⁺ interage com a toxina para que o ADP-ribosil possa ser transferido para a proteína G α (DI TOMMASO *et al.*, 1996). Outro mutante bastante usado em ensaios de imunização em camundogos é a LTR72 (Ala-72-Arg), que possui ainda uma toxicidade residual. Ambos os mutantes descritos preservam suas propriedades adjuvantes, porém com uma redução devida provavelmente à perda da capacidade enzimática, e apresentam um padrão de resposta balanceado Th1/Th2 quando administrados em doses altas, no entanto, em doses baixas induzem preferencialmente resposta Th1 ou Th2, respectivamente (RYAN *et al.*, 2000; FREYTAG e CLEMENTS, 2005). O caráter adjuvante da LTK63 deve-se em parte à manutenção da capacidade de ligação da toxina a receptores, principalmente ao gangliosídeo GM1, que estão inseridos em complexos lipídicos na membrana ricos em colesterol e em proteínas sinalizadoras. Acredita-se que a interação da toxina a esses receptores induza uma cascata de sinalização intracelular que culmina, dentre outros eventos, na ativação de NF- κ B, que é um fator de transcrição envolvido na regulação de genes de citocinas (RYAN *et al.*, 2000; AMAN *et al.*, 2001).

Com base no que foi descrito anteriormente sobre diversidade natural de ETEC, pretendemos no presente trabalho estudar o polimorfismo natural do operon *etx* em amostras de ETEC, isoladas de pacientes diarréicos ou assintomáticos, pertencentes a diferentes sorotipos e provenientes de diferentes regiões geográficas, bem como avaliar as propriedades funcionais e imunológicas dos possíveis variantes encontrados neste estudo de diversidade genética de LT. Tais informações serão relevantes tanto para um melhor conhecimento sobre a evolução molecular do operon *etx*, como poderá dar subsídios importantes para o desenvolvimento de vacinas e novos adjuvantes.

2 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A diversidade genética entre linhagens de ETEC foi demonstrada no presente trabalho sob diferentes aspectos relacionados a um importante fator de virulência para este patógeno: a toxina termo-lábil. A capacidade de linhagens de ETEC em produzir e secretar LT foi caracterizada como um aspecto variável e pode ser resultante de eventos de regulação transcricional e pós-transcricional linhagem-específicos. De fato, a análise de RNAm LT-específico e a quantificação de toxina produzida pelas linhagens indica o envolvimento de mecanismos complexos ainda não elucidados. Como continuidade do trabalho, esperamos realizar o seqüenciamento do óperon inteiro e identificar a diversidade genética nos promotores e nas sequências “Shine-Delgarno”, assim como em seqüências estruturais que possam modificar a curvatura do DNA e, conseqüentemente, alterar a interação com a proteína HN-S.

Diferenças em mecanismos de regulação entre linhagens devem também ser responsáveis, em parte, pela variabilidade natural na capacidade de secretar LT em ETEC. Avaliamos no presente trabalho a ocorrência de dois mecanismos de secreção da toxina: sistema de secreção do tipo II e secreção através de vesículas. Porém, a presença desses mecanismos conhecidos não foi suficiente para explicar a variabilidade observada na secreção de LT em ETEC. O estudo da variabilidade de secreção de LT por linhagens de ETEC é complexo, pois envolve diversas proteínas de transporte e regulatórias, algumas provavelmente ainda não identificadas. No entanto, o seqüenciamento de genes envolvidos na via geral de secreção (GSP) e o estudo da sua regulação podem prover evidências que auxiliem na compreensão do comportamento variável de secreção de toxina LT por ETEC.

Nossos dados apontam ainda para a ocorrência de poliforfismo da seqüência de nucleotídeos do óperon *etx* e para uma possível correlação entre determinados alelos de *etx* e certos sorotipos em amostras de ETEC isoladas de hospedeiro humano. A presença de alelos específicos de LT em amostras de ETEC pertencentes a determinados sorotipos sugere que a transferência lateral

de plasmídeos seja menor do que o esperado, indicando um evento recente de transferência horizontal de elementos de virulência em amostras de *E.coli* patogênicas. Apesar disso, podemos concluir que a transferência lateral de fato ocorra entre linhagens de *E. coli* patogênicas, posto que diferentes grupamentos clonais de ETEC compartilham o mesmo alelo de *etx*.

O polimorfismo dos genes *etxAB* permitiu a identificação de 23 alterações de aminoácidos na holotoxina e 16 variantes de LT com polimorfismo nas subunidades A e B maduras. Dentre os variantes encontrados, o variante LT4 foi purificado e estudado quanto às suas propriedades funcionais e imunológicas. Demonstramos que esse variante possui atividade tóxica reduzida *in vitro* e *in vivo* devido à perda parcial da sua atividade ADP-ribosilante. Concluimos ainda que a alteração na atividade enzimática de LT4 foi resultante de uma mudança de aminoácido na posição 4 da subunidade A1 (troca de uma lisina por uma arginina). Ensaio adicionais *in silico* e de cristalografia poderão revelar as alterações estruturais decorrentes desta troca de aminoácidos em LT. Foi demonstrado ainda que esse variante de LT possui um comportamento imunogênico e adjuvante *in vivo* diferente da toxina LT1, isolada da linhagem de referência H10407. A toxina LT4 foi capaz de deslocar a resposta celular e humoral contra o antígeno alvo para um padrão Th1 e induziu maiores níveis de resposta citotóxica *in vivo* por linfócitos T CD8⁺. Essa alteração de perfil imunológico pode envolver também a subunidade B mas estudos adicionais baseados em mutantes construídos *in vitro* com cada uma das alterações de aminoácidos presentes no variante devem ser feitos.

A diversidade natural de ETEC apresentada neste trabalho traz informações relevantes para a compreensão da variabilidade de sintomas gerados por linhagens de ETEC, que variam de uma infecção assintomática a um quadro diarréico tipo cólera e fatal. A capacidade de ETEC induzir diarreia envolve processos multifatoriais. Estudamos a influência de dois fatores: a quantidade de LT produzida e secretada e a ocorrência de variantes naturais. Um exemplo marcante neste estudo da importância destes aspectos é a linhagem de ETEC 1372-1 e a toxina variante LT4 produzida por ela.

A ETEC 1372-1 foi isolada de uma criança assintomática e foi incapaz de induzir acúmulo de fluidos em modelo animal, além disso, apresentou efeito citotóxico reduzido *in vitro* em comparação à ETEC de referência H10407 isolada de paciente com diarreia do tipo cólera. Essas características estão provavelmente relacionadas ao fato da ETEC 1372-1 mostrar *in vitro* a capacidade de secretar quantidade muito baixa de LT (3 ng/mL de cultura) e, adicionalmente, produzir uma toxina (LT4) variante com citotoxicidade reduzida *in vitro* e *in vivo*. Vale salientar que a LT4 possui sequência de aminoácidos idêntica à LTp e, provavelmente, promove diarreia em suínos. Para esclarecer tal questão pretendemos fazer testes de citotoxicidade *in vitro* com células intestinais de suínos e *in vivo* com o uso de outro modelo animal (suíno).

Em conclusão geral, os resultados apresentados e discutidos nesta tese de doutorado demonstram que a variabilidade natural observada em linhagens de ETEC pode ser correlacionada, pelo menos em parte, com características observadas na clínica e pode trazer contribuições importantes para estudos evolutivos e epidemiológicos de ETEC. Além disso, os dados mostram a influência da variabilidade de LT sobre as propriedades imunomoduladoras da toxina em mamíferos.

REFERÊNCIAS*

AMAN, A.T.; FRASER, S.; MERRITT, E.A.; RODIGHERIO, C.; KENNY, M.; AHN, M.; HOL, W.G.J.; WILLIAMS, N.A.; LENCER, W.I.; HIRST, T.R. A mutant cholera toxin B subunit that binds GM1-ganglioside but lacks immunomodulatory or toxic activity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 17, p. 8536-8541, 2001.

ANG-SIMÕES, M. **Detecção da diversidade genética de funcional da toxina termo-lábil produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) isoladas de humanos no estado de São Paulo**. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2003.

ARCE, S.; NAWAR, H.F.; RUSSELL, M.W.; CONNELL, T.D. Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells. **Infect. Immun.**, v. 73, p. 2718-2727, 2005.

ARDUINO, P.C.; DUPONT, H.L. Traveler`s diarrhoea Baillieres. **Clin. Gastroenterol.**, v. 7, p. 365-385, 1993.

BÄCKSTRÖM, M.; SHAHABI, V.; JOHANSSON, S.; TENEBERG, S.; KJELLBERG, A.; MILLER-PODRAZA, H.; HOLMGREN, J.; LEBENS, M. Structural basis for differential receptor binding of cholera and *Escherichia coli* heat-labile toxins: influence of heterologous amino acid substitutions in the cholera B-subunit. **Mol. Microbiol.**, v. 24, p. 486-497, 1997.

BARBER, D.L.; WHERRY, E.J.; AHMED, R. Cutting Edge: In vivo killing by memory CD8 T cells. **J. Immunol.**, v. 171, p. 27-31, 2003.

BLACK, R.E.; MERSON, M.H.; ROWE, B.; TAYLOR, P.R.; ABDUL ALIM, A.R.M.; GROSS, R.J.; SACK D.A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: acquired immunity and transmission in an endemic area. **Bull. WHO**, v. 59, p. 263-268, 1981.

* De acordo com:

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

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

CHAKRABORTY, S.; DEOKULE, J.S.; GARG, P.; BHATTACHARYA, S.K.; NANDY, R.K.; NAIR, G.B.; YAMASAKI, S.; TAKEDA, Y.; RAMAMURTHY, T. Concomitant infection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in an outbreak of cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139 in Ahmedabad, India. **J. Clin. Microbiol.**, p. 39, v. 3241-3246, 2001.

CHUNG D.W.; COLLIER, R.J. Enzymatically Active Peptide from the Adenosine Diphosphate-Ribosylating Toxin of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect. Immun.**, v. 16, p. 832-841, 1977.

COHEN, M.B.; GIANNELLA, R.A. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: BLASER, M.J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I.; GREENBERG, H.B.; GUERRANT, R.L. (Ed.). **Infection of Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1995. p. 691-707.

DI TOMMASO, A.; SALETTI, G.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G.; ABRIGNANI, S.; DOUCE, G.; DE MAGISTRIS, M.T. Induction of antigen-specific antibodies in vaginal secretions by using a nontoxic mutant of heat-labile enterotoxin as a mucosal adjuvant. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 974-979, 1996.

DORSEY, F.C.; FISCHER, J.F.; FLECKENSTEIN, J.M. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Cel. Microbiol.**, v. 8, p. 1516-27, 2006.

DOUCE, G.; TURCOTTE, C.; CROPLEY, I.; ROBERTS, M.; PIZZA, M.; DOMENGHINI, M.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as nontoxic, mucosal adjuvants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 1644-1648, 1995.

DREVET, P.; GUINET R. Comparison of sandwich-ELISA and GM1-ELISA for the detection of *Escherichia coli* thermolabile enterotoxin. **J. Immunoassay**, v. 12, p. 293-304, 1991.

ECHEVERRIA, P.; LOURIA, C.J.; SMITH, A.L.; SMITH, D. Variation in enterotoxigenicity of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 135, p. 195-200, 1977.

EVANS, D.J.; EVANS, D.G. Jr.; GORBACH, S.L. Production of vascular

permeability factor by enterotoxin *Escherichia coli* isolated from man. **Infect. Immun.**, v. 8, p. 725-730, 1973.

FIELD, M. Regulation of small intestinal ion transport by cyclic nucleotides and calcium. In: FIELD, M.; FORDTRAN, J.S.; SCHULTZ, S.G. (Ed.). **Secretory diarrhea**. Baltimore: Waverly Press, 1980. p. 21-30.

FINKELSTEIN, R.; VASIL, M.; JONES, J.; ANDERSON, R.; BARNARD, T. Clinical cholera caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 3, p. 382-284, 1976.

FLECKENSTEIN, J.M.; LINDLER, L.E.; ELSINGHORST, E.A.; DALE, J.B. Identification of a gene within a pathogenicity island of enterotoxigenic *Escherichia coli* H10407 required for maximal secretion of the heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 2766-74, 2000.

FRASER, S.A.; HAAN, LOLKE de; HEARN, A.R.; BONE, H.K.; SALMOND, R.J.; RIVETT, A.J.; WILLIAMS, N.A.; HIRST, T.R. Mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit that separates toxoid-mediated signaling and immunomodulatory action from trafficking and delivery functions. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 1527-37, 2003.

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

GEARY, S.J.; MARCHLEWICZ, B.A.; FINKELSTEIN, R.A. Comparison of heat-labile enterotoxin from porcine and human strains of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 36, p. 215-220, 1982.

GIULIANI, M.M.; GIUDICE, G.D.; GIANNELLI, V.; DOUGAN, G.; DOUCE, G.; RAPUOLLI, R.; PIZZA, M. Mucosal adjuvanticity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. **J. Exp. Med.**, v. 187, p. 1123-1132, 1998.

GLENN, G.M.; RAO, M.; MATYAS, G.R.; ALVING, C.R. Skin immunization made possible by cholera toxin. **Nature**, v. 391, p. 851, 1998.

GRANT, C.C.R.; MESSER, R.J.; CIEPLAK, W. Role of trypsin-like cleavage at arginine 192 in the enzymatic and cytotoxic activities of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 4270-4278, 1994.

GRUNSTEIN, M.; HOGNESS, D.S. Colony hybridization: a method for isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 72, p. 3961-3963, 1975.

GUIDRY, J.J.; CÁRDENAS, L.; CHENG, E.; CLEMENTS, J.D. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4943-4950, 1997.

GYLES, C.L.; PALCHAUDHURI, S.; MAAS, W. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. **Science**, v. 198, p. 198-199, 1977.

de HAAR, L.; HIRST, T.R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). **Mol. Membr. Biol.**, v. 21, p. 77-92, 2004.

HACKER, J.; HENTSCHEL, U.; DOBRINDT, U. Prokaryotic chromosomes and disease. **Science**, v. 301, p. 790-793, 2003.

HAJISHENGALLIS, G.; ARCE, S.; GOCKEL, C.M.; CONNELL, T.D.; RUSSEL, M.W. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. **J. Dent. Res.**, v. 84, p. 1104-16, 2005.

HIRST, T.R.; SANCHEZ, J.; KAPER, J.B.; HARDY, S.J.S.; HOLMGREN, J. 1984. Mechanism of toxin secretion by *Vibrio cholerae* investigated in strains harboring plasmids that encode heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 7752-7756, 1984.

HIRST, T. R. Cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. In: ALOUF, J. E.; FREER, J. H. (Ed.). **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**. London: Academic Press, 1999. p. 104-129.

HONDA, T.; TSUJI, T.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 34, p. 337-340, 1981.

HORSTMAN, A.L.; KUEHN, M.J. Bacterial surface association of heat-labile

enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 32538-32545, 2002.

HORTON, R.M.; CAI, Z.; HO, S.N.; PEASE, L.R. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. **Biotechniques**, v. 8, p. 528-35, 1990.

IMAMURA, S; KIDO, N; KATO, M; KAWASE, H; MIYAMA, A; TSUJI, T. A unique DNA sequence of human enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin encoded by chromosomal DNA. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 146, p. 241–245, 1997.

IOUNE, R. D.; TSUJI, T.; KOTO, M.; IMAMURA, S.; MIYAMA, A. Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to that of human strain H10407. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 108, p. 157-162, 1993.

KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; CHEUNG, R.; ARBUS, G.S. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 614–619, 1985.

KUNKEL, S.L.; ROBERTSON, D.C. Factor affecting release of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 23, p. 652-659, 1979.

LASARO, M.A.S.; RODRIGUES, J.F.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; LASARO, M.O.; FERREIRA, L.C.S. Evaluation of capture immunoassay methods for quantification of LT produced by human derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p. 1-7, 2007.

LASARO, M.A.S.; RODRIGUES, J.F.; MATHIAS-SANTOS, C.; GUTH, B.E.; BALAN, A.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; FERREIRA, L.C.S. Genetic diversity of heat labile toxin (LT) expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated from humans. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 2400-10, 2008

LASARO, M.A.S.; MATHIAS-SANTOS, C.; RODRIGUES, J.F.; FERREIRA, L.C.S. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 55, p. 93-99, 2009.

LEONG, J.; VINAL, A. C.; DALLAS, W. S. Nucleotide sequence comparison between heat-labile toxin B-subunit cistrons from *Escherichia coli* of human and porcine origin. **Infect. Immun.**, v. 48, p. 73-77, 1985.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377, 1987.

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

LOBET, Y.; CLUFF, C.W.; CIEPLAK, W.Jr. Effect of site-directed mutagenic alterations on ADP-ribosyltransferase activity of the A subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. immun.**, v. 59, p. 2870-2879, 1991.

LYCKE, N.; HOLMGREN, J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. **Immunology**, v. 59, p. 301, 1989.

MAAS, R. An improved colony hybridization method with significantly increased sensitivity for detection of single genes. **Plasmid**, v. 10, p. 296-298, 1983.

MILJAN, E.A.; BREMER, E.G. Regulation of growth factor receptor by gangliosides. **Science**, v. 160, p. 1-10, 2002.

MARTIN, M.; SHARPE, A.; CLEMENTS, J.D.; MICHALEK, S.M. Role of B7 costimulatory molecules in the adjuvant activity of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **J. Immunol.**, v. 169, p. 1745-52, 2002.

MIYAHIRA, Y.; MURATA K.; RODRIGUES, D.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; RODRIGUES, M.M.; ZAVALA, F. Quantification of antigen Specific CD8⁺ Cells using an ELISPOT assay. **J. Immunol. Methods**, v. 181, p. 45-54, 1995.

MATTILA, L. Clinical features and duration of traveler`s diarrhea in relation to its etiology. **J. Infect. Dis.**, v. 19, p. 728-734, 1994.

NASHAR, T.O.; WEBB, H.M.; EAGLESTONE, S.; WILLIAMS, N.A.; HIRST, T.R.

Potent immunogenicity of the B-subunits of *E. coli* heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p. 226-230, 1996.

NASHAR, T.O.; HIRST, T.R.; WILLIAMS, N.A. Modulation of B-cell activation by the B subunit of *Escherichia coli* enterotoxin: receptor interaction up-regulates MHC class II, B7, CD40, CD25 and ICAM-1. **Immunology**, v. 91, p. 572-578, 1997.

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

O'HAGAN, D.T.; VALIANTE, N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 727-35, 2003.

OKAMOTO, K.; OKAMOTO, K.; MIYAMA, A.; TSUJI, T.; HONDA, T.; MIWATANI, T. Effect of substitution of glycine for arginine at position 146 of the A1 subunit on biological activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Bacteriol.**, v. 170, p. 2208-11, 1988.

ORSKOV, F.; ORSKOV, I.; EVANS, D.J. Jr.; SACK, D.A.; WADSTRÖM, T. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoeas in adults and children. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 162, p. 73-80, 1976.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *E. coli* strains from diarrhea in adults and children. Occurrence of the CF (colonization factor) antigen and of hemagglutinating abilities. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 163, p. 99-110, 1977.

PACHECO, A.B.F.; GUTH, B.E.C.; SOARES, K.C.C.; NISHIMURA, L.; ALMEIDA, D.F.; FERREIRA, L.C.S. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1521-1525, 1997.

PACHECO, A.B.F.; SOARES, K.C.; ALMEIDA, D.F.; VIBOUD, N.B.; FERREIRA, L.C.S. Clonal nature of enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O6:H16 revealed by randomly amplified polymorphic DNA analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2099-2102, 1998.

PACHECO, A.B.F.; FERREIRA, L.C.S.; PICHEL, M.G.; ALMEIDA, D.F.;

BINSZTEIN, N.; VIBOUD, G.I. Beyond serotypes and virulence-associated factors: detection of genetic diversity among O153:H45 CFA/I heat-stable enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 4500-4505, 2001.

PIZZA, M.; DOMENIGHINI, M.; HOL, W.; GIANNELLI, V.; FONTANA, M.R.; GIULIANI, M.M.; MAGAGNOLI, C.; PEPPOLONI, S.; MANETTI, R.; RAPUOLLI, R. Probing the structure-activity relationship of *Escherichia coli* LT-A by site-directed mutagenesis. **Mol. Microbiol.**, v. 14, p. 51-60, 1994.

RIMSKY, S.; ZUBER, F.; BUCKLE, M.; BUC, H. A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. **Mol. Microbiol.**, v. 42, p. 1311-1323, 2001.

RISTAINO, P.A.; LEVINE, M.M.; YOUNG, C.R. Improved GM1-Enzyme – Linked Immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, p. 808-815, 1983.

RUTTER, J.M.; BURROWS, M.R.; SELLWOOD, R.; GIBBONS, R.A. A genetic basis for resistance to enteric disease caused by *E. coli*. **Nature**, v. 257, p. 135-136, 1975.

RYAN, E.J.; McNEELA, E.; MURPHY, G.A.; STEWART, H.; O'HAGAN, D.; MARIAGRAZIA, P.; RAPPUOLI, R.; MILLS, K.H.G. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin act as effective mucosal adjuvants for nasal delivery of an acellular Pertussis vaccine: differential effects of the nontoxic AB complex and enzyme activity on Th1 and Th2 cells. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 6270-6280, 1999.

RYAN, E.J.; MCNEELA, E.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; O'NEILL, L.; MILLS, K.H.G. Modulation of innate and acquired immune responses by *Escherichia coli* heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. **J. Immunol.**, v. 165, p. 5750-59, 2000.

SÁNCHEZ, J.; HOLMGREN, J. Virulence factors, pathogenesis and vaccine protection in cholera and ETEC diarrhea. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 17, p. 388-398, 2005.

SANDKVIST, M. Type II secretion and pathogenesis. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 3523-3535, 2001.

SCHWEIZER, H. P. Vectors to express foreign genes and techniques to monitor gene expression in Pseudomonads. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 12, p. 439-445, 2001.

SIMMONS, C.P.; MASTROENI, P.; FOWLER, R.; GHAEM-MAGHAMI, M.; LYCKE, N.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; DOUGAN, G. MHC class I-restricted cytotoxic lymphocyte responses induced by enterotoxin-based mucosal adjuvants. **J. Immunol.**, v. 163, p. 6502-6510, 1999.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v. 387, p. 569-572, 1997.

SIXMAN, T.K.; KALK, K.H.; ZANTEN, B.A. van; DAUTER, Z.; KINGMA, J.; WITHOLT, B.; HOL, W.G. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **J. Mol. Biol.**, v. 230, p. 890-918, 1993.

SMITH, H.W.; LINGGOOD, M.A. The transmissible nature of enterotoxin production in a human enteropathogenic strain of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 4, p. 301-305, 1971.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.

STEINSLAND, H.; BRANTH, P.V.; GJESSING, H.K.; AABY, P.; MOLBAK, K.; SOMMERFELT, H. Protection from natural infections with enterotoxigenic *Escherichia coli*: longitudinal study. **Lancet**, v. 362, p. 286-291, 2003.

STREATFIELD, S.J.; SANDKVIST, M.; SIXMAN, T.K.; BAGDASARIAN, M.; HOL, W.G.J.; HIRST, T.R. Intermolecular interactions between the A and B subunits of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli* promote holotoxin assembly and stability in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 12140-12144, 1992.

TAUSCHEK, M.; GORRELL, R.J.; STRUGNELL, R.A.; ROBINS-BROWNE, M. Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 99, p. 7066-71, 2002.

TENEBERG, S.; HIRST, T.R.; ÅNGSTRÖM, J.; KARLSSON, K.-A. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile enterotoxin in infant rabbit small intestine. **Glycoconj. J.**, v. 11, p. 533-540, 1994.

TRACHMAN, J. D.; YASMIN, M. Thermo-osmoregulation of heat-labile enterotoxin expression by *Escherichia coli*. **Curr. Microbiol.**, v. 49, p. 353-360, 2004.

TRACHMAN, J. D.; MAAS, W. K. Temperature regulation of heat-labile enterotoxin (LT) synthesis in *Escherichia coli* is mediated by an interaction of H-NS protein with the LT A-subunit DNA. **J. Bacteriol.**, v. 180, p. 3715-3718, 1998.

TRUITT, R.L.; HANKE, C.; RADKE, J.; MUELLER, R.; BARBIERI, J.T. Glycosphingolipids as novel targets for T-cell suppression by the B subunit of recombinant heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1299-1308, 1998.

TSUJI, T.; INOUE, T.; MIYAMA, A.; OKAMOTO, K.; HONDA, T.; MIWATANI, T. A single amino acid substitution in the A subunit of *Escherichia coli* enterotoxin results in a loss of its toxic activity. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 22520-5, 1990.

UESAKA, Y.; OTSUKA, Y.; LIN, Z.; YAMASAKI, S.; YAMAOKA, J.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. **Microb. Pathog.**, v. 16, p. 71-76, 1994.

van den AKKER, F.; MERRIT, E.A.; PIZZA, M.G.; DOENIGHINI, M.; RAPUOLLI, R.; HOL, W.G.J. The arg7lys mutant of heat-labile enterotoxin exhibits great flexibility of active site loop 47-56 of the subunit. **Biochemistry**, v. 34, p. 10996-11004, 1995.

VIBOUD, G.I.; JOUVE, M.J.; BINSZTEIN, N.; VERGARA, M.; RIVAS, M.; QUIROGA, M.; SVENNERHOLM A.M. Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentinean children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2829-2833, 1999.

ZOETEWIJ, J.P.; EPPERSON, D.E.; PORTER, J.D.; ZHANG, C.X.; FROLOVA, O.Y.; CONSTANTINIDES, A.P.; FUHRMANN, S.R.; EL-AMINE, M.; TIAN, J.-H.; ELLINGSWORTH, L.R.; GLENN, G.M. GM1 Binding-deficient exotoxin is a potent noninflammatory broad spectrum intradermal immunoadjuvant. **J.**

Immunol., v. 177, p. 1197-1207, 2006.

WARRENS, A.N.; JONES, M.D.; LECHLER, R.I. Splicing by overlap extension by PCR using asymmetric amplification: an improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. **Gene**, v. 186, p. 29-35, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Initiative for vaccine research (IVR)**. Available from: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/e_e_coli/en>. Acesso em: 24 abr. 2006.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 569-584, 1997.

YAMAMOTO, T; YOKOTA, T. Sequence of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* pathogenic for human. **J. Bacteriol.**, v. 155, p. 728-733, 1983.

YAMAMOTO, T.; TAMURA, T.; YOKOTA, T. Primary structure of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* pathogenic for humans. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 5037-5044, 1984.

YANG, J.; TAUSCHEK, M.; STRUGNELL, R.; ROBINS-BROWNE, R.M. The H-NS protein represses transcription of the eltAB operon, which encodes heat-labile enterotoxin in enterotoxigenic *Escherichia coli*, by binding to regions downstream of the promoter. **Microbiology**, v. 151, p. 1199-1208, 2005.

YU, R.R.; DIRITA, V.J. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 119-134, 2002.