

MÔNICA JOSIANE RODRIGUES DE JESUS

**Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a toxina de Shiga
de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) baseada
na proteína recombinante Stx2 Δ AB incorporada a lipossomas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

MÔNICA JOSIANE RODRIGUES DE JESUS

**Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a toxina de Shiga
de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) baseada
na proteína recombinante Stx2 Δ AB incorporada a lipossomas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para o Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro.

Orientador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Original

São Paulo
2016

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rodrigues de Jesus, Mônica Josiane
Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra
a toxina de Shiga de Escherichia coli
enterohemorrágica (EHEC) baseada na proteína
recombinante Stx2 Δ AB incorporada a lipossomas. /
Mônica Josiane Rodrigues de Jesus; orientador Luís
Carlos de Souza Ferreira. -- São Paulo, 2016.
86 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Escherichia coli. . 2. Nanopartículas . 3.
Toxina de Shiga. 4. Proteínas recombinantes. 5.
Sistema de entrega vacinal. I. de Souza Ferreira,
Luís Carlos , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Mônica Josiane Rodrigues de Jesus

Título da dissertação: Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a toxina de Shiga de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) baseada na proteína recombinante Stx2ΔAB incorporada a lipossomas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira.

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

() Aprovado

() Reprovado

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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **113** nas fls. **24** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luis Carlos de Souza Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a toxina de shiga de Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) baseada no uso da proteína recombinante Stx2ΔAB incorporada a lipossomas*" do qual participam o(s) aluno(s) **Sara Araújo Pereira, Lennon Ramos Pereira, Denicar Lina Nascimento Fabris, Mônica Josiane Rodrigues de Jesus, Ewerton Lucena Ferreira**, Pesquisadora Colaboradora **Rita de Cássia Café Ferreira**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)* em **24.11.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 25 de novembro de 2014.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho

Aos meus pais, irmãos (Ricardo *in memoriam*)
e sobrinhos, pelo apoio incondicional,
paciência, carinho e amor.
À Deus, força maior que permite a realização
dos meus sonhos e motiva a transpor cada
dificuldade que se coloca em meu caminho.

AGRADECIMENTOS

Ao prof^o Luís pela orientação, paciência sem fim, dedicação, profissionalismo e sempre uma palavra de conforto quando os resultados não apareciam. Muito obrigada pelos ensinamentos e oportunidades.

À prof^a Rita por me oferecer a oportunidade de adentrar ao laboratório, ainda estagiária técnica, mas foi ali que começou minha caminhada. Muito obrigada.

À colaboração do Doutorando Wesley, por me apresentar às MLVs com toda a paciência do mundo e a disposição sempre que precisei. Muito obrigada pela gentileza com que me auxiliou.

À colaboração da Doutoranda Roberta, por disponibilizar seu tempo, paciência e bom humor na realização dos ensaios para caracterização das MLVs.

À prof^a Dr^a Roxane Piazza e Dr^a Letícia Barbosa por disponibilizar os anticorpos anti-Stx2 e a toxina nativa Stx2 utilizada no ensaio de desafio.

Aos técnicos Eduardo Gimenes, Carolina Bertelli, por toda a ajuda e amizade, conversas no café da tarde. Vocês foram indispensáveis à realização deste projeto e realmente fazem o laboratório funcionar. Muito obrigada.

Aos meus queridos colegas e amigos do LDV, não sei nem por onde começar a agradecer. Muito obrigada pela paciência, cada um participou deste trabalho em cada dúvida que ajudaram a esclarecer, nas conversas e palavras de incentivo e conforto. Muito obrigada.

À velha guarda do LDV, Camila, Renata, Milene, Cariri, Wilson, Rafa, Juliana. Muito obrigada, aprendi muito com vocês.

Em especial aos amigos, que ao longo dos anos se tornaram a minha família. Deni (Dâni), Sara (Sarajane), Mariana Cintra (só tem um rim), Robert (Robertson), Lennon (Corno), Natiely (Danada), Ewerton (Filé de borboleta), Naína, Gisela e Rúbens. Que nossa amizade vá ao infinito e além.

À minha mãe Maria da Paz, minha Maria, a quem devo a vida e o exemplo de força que me motiva todos os dias. Muito obrigada por sempre acreditar em mim e nas batalhas que escolho encarar, sendo a minha base e a palavra certa na hora que mais preciso. Te amo mais que o infinito, mais, muito mais que chocolate.

À minha sobrinha Malú, a qual em sua inocência tanto me ensina. Muito obrigada por me tornar uma tia tão feliz.

À toda minha família, cunhada, primos, tios, avó, por acreditarem em mim, pelo incentivo, apoio, carinho e orações.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP).

À Deus pelo ar que respiro, o sol que me ilumina, pelas dificuldades e a força para combatê-las, por me fazer acreditar que tudo é possível e sou capaz.

“ O saber a gente aprende com os
mestres e com os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e
com os humildes. ”

Cora Coralina

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof^o Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT-GENE 4), no Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (Processo 2014/21141-4).

RESUMO

Jesus MJR. Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a toxina de Shiga (Stx) de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) baseada na proteína recombinante Stx2 Δ AB incorporada a lipossomas. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Infecções associadas a cepas da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), podem causar manifestações clínicas como diarreia, colite hemorrágica e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), a complicação mais severa da infecção. A expressão de variantes naturais da toxina de Shiga (Stx) representa o principal fator associado à virulência de linhagens de STEC (*Escherichia coli* produtora de Shiga toxina) sendo a variante Stx2 a principal forma da toxina associada à SHU. Até o momento não se dispõe de uma vacina ou tratamentos efetivos para a SHU em humanos. Neste cenário, formas recombinantes atóxicas da toxina Stx2, representam uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas para a prevenção da SHU. Assim, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma vacina baseada em uma forma atóxica de Stx2 combinada à lipossomas, capaz de induzir a geração de respostas imunológicas humorais com capacidade neutralizante frente à Stx2. Para isso, um derivado atóxico de Stx2, contendo a subunidade B e a porção A₂ da subunidade A denominado Stx2 Δ AB, foi expressa em linhagens de *E.coli* BL21. Tentativas iniciais de purificação resultaram na formação de agregados proteicos. Ajustes nas condições de cultivo e purificação permitiram obter a proteína na forma de monômero da subunidade B, mas sem a presença da porção A₂. O antígeno obtido foi incorporado a lipossomas multilamelares (MLVs), combinados ao lipídio A e administrados por via subcutânea a camundongos. Animais imunizados desenvolveram anticorpos sistêmicos específicos contra Stx2 capazes de neutralizar a toxina *in vitro* e conferir proteção parcial a animais desafiados com dose letal da toxina. Em conclusão, o trabalho confirmou o potencial vacinal do antígeno e validou a estratégia baseada na incorporação do antígeno aos MLVs como estratégia de imunização.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Toxina de Shiga. SHU. Stx2. Lipossomas. MLVs. Nanopartículas. Sistema de entrega vacinal. Proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Jesus MJR. Development of a vaccine strategy against Shiga toxin (Stx) of *Escherichia coli* (EHEC) based on recombinant protein Stx2 Δ AB incorporated into liposomes. [Dissertation (Masters thesis (Parasitology))]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomedicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Infections associated with strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), can cause clinical manifestations such as diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS), the most severe complication of infection. The expression of natural variants of Shiga toxin (Stx) is the main factor associated with virulence of STEC strains (*Escherichia coli* Shiga toxin-producing) and the variant Stx2 the main form of the toxin associated with HUS. Yet not have a vaccine or effective treatment for HUS in humans. In this scenario, non-toxic recombinant forms of the Stx2 toxin, represent an alternative to the development of vaccines for the prevention of HUS. Thus, this study aimed to develop a vaccine based on a non-toxic form of Stx2 combined with liposomes, capable of inducing the generation of humoral immune responses with neutralizing capacity against the Stx2. For this, a nontoxic derivative of Stx2, containing the B subunit and an A₂ subunit termed portion of Stx2 Δ AB was expressed in BL21 *E. coli* strains. Initial purification attempts resulted in the formation of protein aggregates. Adjustments in the cultivation and purification conditions have enabled the protein as the monomer subunit B but without the presence of the A₂ portion. The obtained antigen was incorporated in multilamellar liposomes (MLVs), the combined lipid A and administered subcutaneously to mice. Immunized animals develop systemic antibodies specific against Stx2 able to neutralize toxin in vitro and to confer partial protection when challenged with a lethal dose of toxin. In conclusion, the study confirmed the potential vaccine antigen and validated strategy based on antigen incorporation into MLVs as immunization strategy.

Keywords: *Escherichia coli*. Shiga Toxin. HUS. Stx2. Liposomes. MLVs. Nanoparticles. Vaccine delivery system. Recombinant protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura molecular da toxina de shiga (Stx) produzidas por EHEC.....	22
Figura 2 - Lipossomas multilamelares (MLVs)	27
Figura 3 - Clonagem e subclonagem do gene <i>stx2B</i> e análise de restrição da construção pET22- <i>stx2ΔAB</i>	43
Figura 4 - Expressão das proteínas Stx2B e Stx2ΔAB nas linhagens de <i>E. coli</i> BL21.....	44
Figura 5 - Purificação das proteínas Stx2B e Stx2ΔAB por cromatografia de afinidade.....	45
Figura 6 - Caracterização do tamanho das proteínas Stx2B e Stx2ΔAB.....	46
Figura 7 - Imunodeteção das proteínas Stx2B e Stx2ΔAB.....	47
Figura 8 - Determinação da presença de agregados proteicos de Stx2B e obtenção da proteína recombinante Stx2ΔAB na forma não agregada.....	48
Figura 9 - Expressão da proteína rStx2B na linhagem de <i>E. coli</i> -ArcticrStx2B.....	49
Figura 10 - Avaliação da atividade biológica e antigenicidade da proteína recombinante rStx2B.....	50
Figura 11 - Caracterização dos MLVs e MLV-Ova por análise de potencial zeta e DLS.....	52
Figura 12 - Efeito de liberação da proteína incorporada nos MLV-Ova com lipídeos DOPC:DPPC:LipA:DGS-NTA(Ni):CHOL.....	53
Figura 13 - Análise da cinética de dose-resposta de anticorpos IgG séricos OVA-específicos induzidos após imunização.....	54
Figura 14 - Caracterização dos MLV-rStx2B por análise de potencial zeta e DLS.....	55
Figura 15 - Avaliação da toxicidade da proteína recombinante rStx2B e dos MLV- rStx2B <i>in vitro</i>	56
Figura 16 - Análise da cinética de dose-resposta de anticorpos IgG sérico rStx2B-específicos induzida após imunização.....	57
Figura 17 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG rStx2B-específicos induzidos nos animais imunizados.....	58

Figura 18 - Longevidade da resposta de anticorpos IgG anti-rStx2B nos animais imunizados.....	59
Figura 19 - Avaliação da afinidade dos anticorpos IgG anti-rStx2B.....	60
Figura 20 - Determinação da dose citotóxica média (DC ₅₀) da toxina nativa Stx2 <i>in vitro</i> e atividade neutralizante sobre a Stx2 nativa do soro anti-rStx2B.....	61
Figura 21 - Análise da resposta humoral específica anti-rStx2B e capacidade de neutralização da toxina Stx2 dos soros obtidos em uma segunda imunização.....	63
Figura 22 - Determinação da DL ₁₀₀ e proteção dos camundongos imunizados contra atividade tóxica da Stx2 nativa.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>stx2B</i>	29
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.a.	Aminoácidos
ABS _{600nm}	Absorbância obtida em comprimento de 600 nm
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CHOL	<i>cholesterol</i> (Colesterol)
DC ₅₀	Dose citotóxica que elimina 50% das células
DGS-NTA (Ni)	<i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[(N-(5-amino-1-carboxypentyl)iminodiacetic acid)succinyl]</i> (nickel salt)
DL ₁₀₀	Dose letal que elimina 100% dos animais
DLS	<i>Dinamic light scattering</i> (Dispersão dinâmica de luz)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DOPC	<i>1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>
DPPG	<i>1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2 de imunoglobulina G
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside</i> (isopropil β-D-1 tiogalactopiranosídeo)
LB	Meio Luria-Bertani
MEM	<i>Minimum Essential Media</i> (Meio Mínimo Essencial)
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MLVs	Lipossomas multilamelares
Na ₂ HPO ₄	Fosfato bibásico de sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
OPD	<i>o-phenylenediamine dihydrochloride</i> (dicloridrato de o-fenilenodiamina)

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação de cadeia e polimerase)
s.c	subcutânea
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SHU	Síndrome Hemolítica Urêmica
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga
Stx2	Toxina de Shiga do tipo 2
Stx2 Δ AB	Subunidade B e porção A ₂ da toxina Stx2
Stx2B	Subunidade B da toxina Stx2
T.A.	Temperatura ambiente
Th1	<i>Cells T helper</i> (Células T auxiliaadoras 1)
Th2	<i>Cells T helper</i> (Células T auxiliaadoras 2)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (receptor do tipo Toll)
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i> (receptor do tipo toll 4)
TWEEN20	<i>Polysorbate 20</i> (Polissorbato 20)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg/µL	Micrograma/microlitro
µg/mL	Micrograma/mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromol
Abs	Absorbância
g/L	Gramas/litro
h	hora
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
m/v	Massa/volume
mg	Miligrama
mg/mL	Miligrama/mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
ng/mL	Nanograma/mililitro
nm	Nanometro
pb	Pares de base
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogênio
pmol	Picomol
psi	<i>Pound force per square inch</i> (libra força por polegada quadrada)
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundo
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Epidemiologia das infecções associadas a linhagens de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC) e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU).....	21
1.2 A patogênese de EHEC e a toxina de Shiga (Stx)	21
1.3 Epidemiologia de linhagens de STEC	23
1.4 Tratamentos disponíveis para SHU	23
1.5 Abordagens vacinais contra SHU	24
1.6 Desenvolvimento de vacinas profiláticas contra SHU	25
1.7 Estratégias vacinais baseadas no antígeno Stx2 Δ AB	26
1.8 Sistema de entrega de antígenos baseado em lipossomas	26
2 OBJETIVO	28
3 MATERIAS E MÉTODOS	29
3.1 Amplificação do gene <i>stx2b</i>	29
3.2 Clonagem do gene <i>stx2B</i> no vetor pGEM-T Easy (PROMEGA) e transformação em células de <i>E.coli</i> DH5 α	30
3.3 Subclonagem do gene <i>stx2B</i> em vetor de expressão pET22b (NOVAGEN) e análise de restrição do gene <i>stx2ΔAB</i> no vetor pET <i>stx2ΔAB</i>	30
3.4 Indução da expressão do gene <i>stx2B</i> e <i>stx2ΔAB</i> em linhagens de <i>E. coli</i> BL21.....	31
3.5 Tentativa de solubilização dos agregados proteicos das proteínas recombinantes Stx2B e Stx2 Δ AB por diminuição da concentração de sal.....	32
3.6 Extração periplasmática das culturas induzidas para expressão de Stx2B e Stx2 Δ AB com tampões contendo cloreto de sódio (NaCl) em concentrações variando de 0,05 M a 0,5 M.....	33
3.7 Indução da expressão do gene <i>stx2ΔAB</i> na linhagem de <i>E. coli</i> Arctic-Express	33
3.8 Purificação por afinidade ao níquel e exclusão de tamanho (Gel Filtração) de Stx2B, Stx2 Δ AB (rStx2B).....	34
3.9 Ensaio de <i>Western blotting</i> e Imunodeteção	35
3.10 Preparo dos MLVs (Lipossomas carreadores de proteínas)	35
3.11 Determinação da liberação de proteína pelos MVL-OVA	36
3.12 Ensaio de DLS (<i>do inglês Dynamic Light Scattering</i>), Potencial Zeta e Polidispersão..	36

3.13 Ensaio de citotoxicidade dos MVL-rStx2B (Proteína incorporada a lipossomas multilamelares) em células VERO.....	37
3.14 Ensaio de determinação da citotoxicidade de Stx2 – DC ₅₀ em Célula VERO	37
3.15 Ensaio de ligação da proteína recombinante rStx2B em células VERO	37
3.16 Ensaio de determinação da antigenicidade da proteína recombinante rStx2B	38
3.17 Imunizações.....	38
3.17.1 Imunização para obtenção de anticorpos anti-Stx2	38
3.17.2 Imunização para avaliação da cinética de dose-resposta dos MLV-OVA e MLV-rStx2B ...	39
3.17.3 Segunda imunização para produção de anticorpos anti-rStx2B	39
3.18 Coleta e processamento de amostras	40
3.19 Ensaio para dosagem de anticorpos IgG total e subclasses dos soros obtidos nas imunizações com rStx2B.....	40
3.20 Ensaio para determinação da afinidade de anticorpos IgG específicos rStx2B obtidos após imunização.....	40
3.21 Ensaio de neutralização da toxina Stx2 pelos soros obtidos após imunização <i>in vitro</i>	41
3.22 Determinação da dose citotóxica (DL ₁₀₀)	41
3.23 Ensaio de desafio com a toxina Stx2	42
3.24 Análises Estatísticas	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Obtenção do antígeno Stx2B e Stx2ΔAB	43
4.2 Caracterização da atividade biológica e antigenicidade da proteína recombinante rStx2B.....	50
4.3 Preparo e caracterização das MLV's (Lipossomas multilamelares carreadores de proteínas)	51
4.4 Avaliação da produção de anticorpos IgG sérico específico anti-OVA	53
4.5 Caracterização físico-química do MLV-rStx2B	55
4.6 Análise do potencial citotóxico de rStx2B e MLV-rStx2B <i>in vitro</i>	55
4.7 Avaliação da produção de anticorpos IgG sérico específico anti-rStx2B	56
4.8 Determinação da afinidade dos anticorpos IgG específicos anti-rStx2B gerados na imunização com o MLV-rStx2B.....	59
4.9 Determinação da dose citotóxica de Stx2 nativa (DC ₅₀) e ensaio de soroneutralização <i>in vitro</i> com anticorpos gerados em animais imunizados com rStx2B e MLV-rStx2B	60

4.10 Avaliação da produção de anticorpos IgG sérico específico anti-rStx2B em uma segunda imunização	62
4.11 Imunidade protetora conferida aos animais imunizados com rStx2B.....	63
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS*	
APÊNDICE	
A - Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches.....	86

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das infecções associadas a linhagens de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU)

Infecções associadas a cepas da EHEC, em especial aquelas do sorotipo O157:H7, causam manifestações clínicas como diarreia, colite hemorrágica e podem levar a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), a complicação mais severa da infecção (1,2). A SHU pode ser letal, principalmente em crianças e adolescentes. Globalmente estima-se cerca de 6,1 casos por 100.000 pessoas/ano, em crianças menores de 5 anos, com taxa de mortalidade de 3 a 5%. Em adultos, com idade entre 50 e 59 anos, a incidência de casos de SHU é mais baixa, com aproximadamente 0,5 casos por 100.000 pessoas/ano (3). A doença se caracteriza pela falência renal aguda, trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e complicações do sistema nervoso central (4,5,121). SHU emergiu nas últimas três décadas como uma ameaça à saúde pública mundial. É um problema crítico em países desenvolvidos e em alguns países latino-americanos, particularmente na Argentina atualmente o país com o maior número de casos no mundo, cerca de 55 casos de SHU por 100.000 pessoas (1,130).

Dentre as diversas linhagens de EHEC, as linhagens do sorotipo O157:H7 receberam maior destaque, pois foram responsáveis por surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos (6,7,123), Japão, Argentina, Chile, (8,9,122,129), Canadá e alguns países europeus (10–12,128). Outros sorotipos característicos de EAHEC (*E. coli* enteroagregativa com capacidade de produzir a Stx2 foram associados a casos de SHU, sendo o sorotipo O104:H4 responsável pelo surto ocorrido em 2011 na Alemanha (12–14). No Brasil poucos são os registros de isolamento de linhagens de EHEC do sorotipo O157:H7 associados a casos de SHU. No entanto, a proximidade com a Argentina, representa um risco que não pode ser ignorado (15,16).

1.2 A patogênese de EHEC e a toxina de Shiga (Stx)

Em semelhança a linhagens *E. coli* enteropatogênica (EPEC), linhagens de EHEC possuem a capacidade de colonizar o epitélio intestinal e induzir lesões do tipo A/E, do inglês “*attaching and effacing*”, ao colonizar o trato gastrointestinal. Essa habilidade é codificada por uma ilha de patogenicidade chamada LEE, do inglês “*Locus of Enterocyte*

Effacement” (17). No entanto, a capacidade de produção da toxina Stx, representa o fator associado à virulência mais relevante para o desenvolvimento da diarreia sanguinolenta e as complicações sistêmicas extra-intestinais da SHU.

Descrita pela primeira vez em 1977 (18), as toxinas produzidas por *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) pertencem a dois grupos sorologicamente distintos: Stx1 e Stx2. Os genes que as codificam estão localizados no genoma de bacteriófagos lambdoides (19), os quais levam à lise da célula hospedeira quando induzido por estresse (uso de antibióticos), desencadeando um aumento na liberação de Stx (20). A Stx1 está relacionada à toxina de shiga produzida pela *S. dysenteriae* tipo I, diferindo apenas pela troca de um aminoácido na subunidade A (11). Linhagens de STEC podem produzir variantes naturais de Stx1 (Stx1, Stx1c, Stx1d) assim como de Stx2 (Stx2a, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f) ou ambas em diferentes combinações (21). Stx1, Stx2 e seus variantes reconhecem um mesmo receptor glicolipídico (exceção de Stx2e, a qual se liga ao Gb₃ e Gb₄), mas apresentam diferenças de afinidade (22). Porém, essas toxinas podem ser diferenciadas por sua atividade biológica e características imunológicas (23).

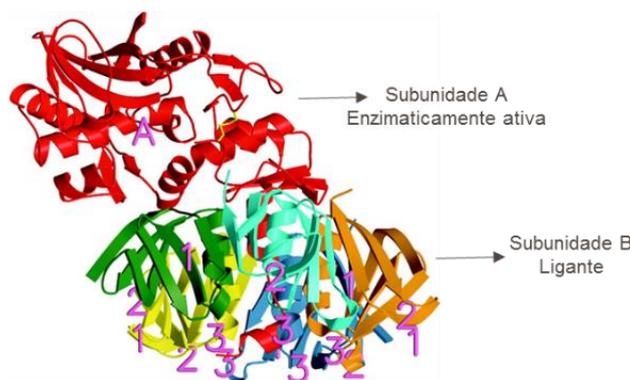


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura molecular da toxina de shiga (Stx) produzidas por EHEC. Em vermelho está indicada a subunidade A da toxina, sendo os locais de ligação da porção A₁ e A₂ destacados em amarelo. A porção A₂ ancora a subunidade A nas subunidades B, esta última composta por um anel pentamérico contendo cinco monômeros (indicado na figura com diferentes cores). Os sítios de ligação ao receptor glicolipídico Gb₃ (globotriaosilceramida) estão indicados pela numeração de 1-3, destacada em rosa. (Reproduzido de Fraser et. al., 2004)

Evidências clínicas indicam que casos de SHU estão mais frequentemente associados a cepas produtoras de Stx2 (10,126). As toxinas Stx2 de STEC são toxinas do tipo AB₅ (21). A subunidade A é formada por 319 aminoácidos, com peso molecular de 32 kDa e representa a porção enzimaticamente ativa. A subunidade B é composta por cinco monômeros formados por 89 aminoácidos, cada um com peso molecular de 7,7 kDa. Esses monômeros formam um anel pentamérico responsável pela ligação da toxina ao receptor glicolipídico Gb₃ (globotriaosilceramida), encontrados em maior quantidade na superfície

de células dos rins, endotélio microvascular e células como macrófagos, dendríticas e neutrófilos (11,24). A ação da Stx2 se dá após a colonização do intestino. A toxina produzida localmente é absorvida pela corrente sanguínea, chegando aos tecidos alvos (25). A subunidade B se liga ao receptor Gb₃ pelo pentâmero e a subunidade A é internalizada por endocitose. Ocorre a sua dissociação em fragmento A₁ (27,5 kDa) e A₂ (4,5 kDa) pela ação da enzima furina. O fragmento A₁ é transportado de forma retrógrada do aparato de Golgi até o retículo endoplasmático onde cliva uma ligação N-glicosídica do resíduo de adenina do RNA ribossômico eucarioto 28S da subunidade ribossomal 60S. Assim, inibe a síntese proteica, tornando-se citotóxica para as células-alvo (26,27).

1.3 Epidemiologia de linhagens de STEC

O principal reservatório de STEC e EHEC são os bovinos. Derivados, como leite e carne crua ou mal passada, representam os maiores contribuintes para a disseminação da infecção. Vegetais e água contaminados, assim como, o contato pessoal com indivíduos portadores da infecção, também são meios de transmissão de EHEC (7,28, 125).

No Brasil em avaliações prévias do gado leiteiro em fazendas no Estado de São Paulo, foi registrada a ocorrência de linhagens de EHEC que carregavam os genes *stx1* e/ou *stx2* (29). Recentes estudos com crianças saudáveis e diagnosticadas com SHU na cidade de São Paulo, mostraram altas frequências de indivíduos produtores de anticorpos contra as subunidades de Stx2 e lipopolissacarídeo do sorotipo O157:H7, o que sugere a presença dessas linhagens em nosso estado (16,30).

1.4 Tratamentos disponíveis para SHU

Nos casos mais graves de SHU, os pacientes necessitam de transfusões de sangue ou plasma e diálise. A hemodiálise e a diálise peritoneal dependem da idade e peso dos pacientes, sendo a diálise peritoneal o tratamento de escolha para a insuficiência renal crônica (31). Embora a diálise peritoneal tenha reduzido significativamente a mortalidade, os danos às células endoteliais predominantemente nos glomérulos renais, desempenham importante papel na patogênese da doença. Entretanto, outros órgãos também são afetados como cérebro, pâncreas e pulmões, levando a sequelas em 12 a 30% dos infectados, incluindo disfunção renal crônica, hipertensão ou manifestações no sistema nervoso central (17,32). As reposições hídricas e eletrolíticas são necessárias como suporte básico

ao paciente (33). O anticorpo monoclonal Eculizumab, um inibidor do complemento foi licenciado para tratamento de SHU primária, principalmente a atípica, associada a uma desregulação do sistema complemento e tem sido utilizado como tentativa terapêutica, principalmente em crianças, na Argentina (2012), Europa (2009) e Estados Unidos (2011) (34). Devido aos riscos associados ao tratamento com antimicrobianos contra as infecções de EHEC (35–37) e a presença de tratamentos apenas paliativos, a vacinação representaria uma alternativa válida para reduzir a incidência da doença e prevenir surtos.

1.5 Abordagens vacinais contra SHU

Diversas estratégias terapêuticas e profiláticas objetivando a neutralização da Stx2 têm sido estudadas em modelos experimentais. Embora modelos baseados em murinos não reproduzam os sintomas observados em humanos, representam uma ferramenta útil para a avaliação da imunidade protetora induzida por formulações vacinais, seja esta mediada por anticorpos secretados em mucosa ou anticorpos sistêmicos (38).

Dentre as abordagens terapêuticas contra SHU, há estudos quanto ao uso de bactérias recombinantes inativadas expressando a subunidade B ou o receptor glicolipídico na forma de bactérias fantasmas, que consistem em envelopes bacterianos desprovidos de citoplasma, como veículos vacinais (39–43). Proteínas do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS), também foram alvos de estratégias vacinais experimentais e atuam pelo bloqueio da colonização bacteriana (44,45). A administração de anticorpos monoclonais e anticorpos de cadeia simples contra a Subunidade B, produzidos em lhamas, visando à imunização passiva (46–49) e uso de análogos sintéticos de Gb₃ (50), que adsorvem competitivamente a toxina no intestino também foram testadas, porém, até então, apenas o anticorpo monoclonal Eculizumab mostrou-se promissor o suficiente para testes subsequentes em seres humanos (34,51,52). Encontra-se em fase de recrutamento um estudo clínico com o anticorpo monoclonal Eculizumab, utilizado para o tratamento de SHU atípica, causada por distúrbio no complemento, que leva a ativação de leucócitos e plaquetas, microangiopatia trombótica e subsequente lesão no órgão terminal (53–55).

1.6 Desenvolvimento de vacinas profiláticas contra SHU

Nas últimas décadas, abordagens profiláticas contra SHU também vêm sendo desenvolvidas. Toxóides derivados de Stx1 ou Stx2 mostram-se capazes de conferir proteção a coelhos desafiados com as toxinas (56). Uma vacina de DNA que codifica a subunidade B e uma parte da subunidade A₁ permitiu a indução de anticorpos neutralizantes e conferiu proteção a desafio com Stx2 quando co-administrada com plasmídeo que codifica o fator de estimulação de colônia de granulócitos e monócitos (57).

Vacinas de subunidade têm-se mostrado eficientes na geração de anticorpos neutralizantes e, em alguns casos, geram proteção em modelos animais frente a desafio com a toxina Stx2 (58,59). A imunização com uma proteína quimérica contendo StxA2-StxB1 foi capaz de gerar anticorpos e proteção em camundongos contra as duas toxinas (60–62). A subunidade B de Stx2 quando fusionada à enzima luminase sintase da *Brucella spp.*, resultou em resposta humoral capaz de conferir proteção a desafios com Stx2 em camundongos fêmeas imunizadas e suas crias (63,64). Neste contexto, a subunidade B representa um dos alvos vacinais mais utilizados, principalmente por ser atóxica e os anticorpos gerados contra ela serem capazes de bloquear a ligação da toxina ao receptor Gb₃ e sua entrada no citosol onde exerce seus efeitos tóxicos.

Estudos indicam que epítomos presentes na subunidade B de Stx levam à produção de anticorpos neutralizantes (46,60). Essa subunidade também mostra estabilidade em pH extremo e, mesmo na presença de proteases, possui capacidade de atravessar barreiras de tecido no organismo e resistência à inativação em ambientes extra e intracelular (65). No entanto, a subunidade B da Stx2 apresenta baixa imunogenicidade após imunização em mamíferos (66). Essa baixa imunogenicidade de Subunidade B de Stx representa uma restrição no desenvolvimento de uma formulação vacinal eficientemente capaz de induzir uma imunidade protetora contra EHEC e prevenir SHU (66). Nesse sentido, a proteína recombinante Stx2B já foi utilizada em diversos estudos associada a adjuvantes demonstrando a necessidade do uso de adjuvantes, para potencialização da resposta humoral gerada (59,62–64,67,68). Por outro lado, outras evidências indicam a presença de epítomos mais imunogênicos localizados na porção A₂ da subunidade A de Stx2 (69).

1.7 Estratégias vacinais baseadas no antígeno Stx2ΔAB

Uma vacina de DNA construída para expressar um mutante atóxico de Stx2, formado pela subunidade B e a porção A₂ (pStx2ΔAB), demonstrou ser capaz de gerar anticorpos neutralizantes *in vitro* e conferir proteção parcial *in vivo* (70). Esta mesma construção foi utilizada em outras duas abordagens vacinais. A primeira avaliou o potencial neutralizante e protetor dos anticorpos gerados pela imunização com linhagens vacinais de *S. Typhimurium* capaz de expressar o antígeno Stx2ΔAB (42). A administração de uma forma recombinante de Stx2ΔAB, em combinação com diferentes adjuvantes vacinais indicou que apenas o adjuvante de Freund foi capaz de induzir imunidade protetora parcial nos animais (71). Os resultados obtidos atestam o potencial vacinal da Stx2ΔAB, mas ressaltam a importância do adjuvante na geração de repostas imunológicas eficazes na neutralização da toxina Stx2

1.8 Sistema de entrega de antígenos baseado em lipossomas

Muito utilizados por seu potencial adjuvante e eficiência na entrega de antígenos, os lipossomas tem seu uso relacionado a diferentes estratégias vacinais. São vesículas lipídicas compostas normalmente por uma bicamada de fosfolipídios e compatíveis com as membranas celulares (72–77). Possuem baixa toxicidade, são biodegradáveis e se mostram apropriados para transportar antígenos pela capacidade de incorporar material solúvel na fase hidrofílica ou hidrofóbica (78). Fatores como estabilidade de armazenamento e baixo custo reforçam a lista de vantagens dos lipossomos. A ação adjuvante depende de características estruturais, dentre estas, o tamanho demonstra influência no tráfego, processamento e apresentação dos antígenos às APCs, em resumo, influencia no perfil de resposta imunológico a ser obtido com a formulação administrada, Th1 ou Th2 (79–83). Assim, antígenos pouco imunogênicos quando incorporados a lipossomas, são capazes de promover resposta imune humoral ou celular e, em alguns casos, podem promover sinergismo quando combinados a adjuvantes (76,84,85).

Os lipossomas multilamelares (MLVs) representam uma forma de lipossoma que conta com várias camadas lipídicas espaçadas entre si. São obtidas por processo de fusão das vesículas na presença de íons de cálcio ou magnésio (86). Essas vesículas permitem o encapsulamento eficiente de antígenos e a liberação de forma lenta e contínua, o que

proporciona um maior estímulo da resposta imunológica (87). Lipossomas unilamelares conjugados a toxóides de Stx1 ou Stx2 por processo químico mostraram-se promissores quando avaliados em modelo murino e em macacos, gerando anticorpos neutralizantes de Stx2 (88,89,124). Em uma imunização oral com lipossomas compostos por lipídios neutros, aniônicos e o lipídio A (MPL), encapsulando um lisado celular de *E. coli* O157:H7, induziu a produção de anticorpos neutralizantes de mucosa e séricos, que inibiram a adesão de Stx em células Caco-2 (90). Esses resultados sugerem que o uso de lipossomas multilamelares associados à Stx2ΔAB possa aumentar a imunogenicidade do antígeno e seu potencial protetor.

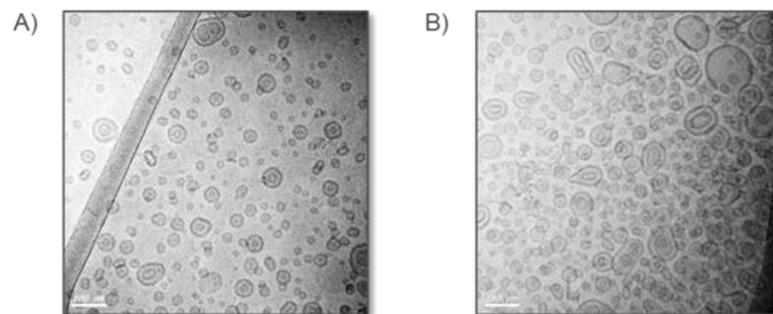


Figura 2 - Lipossomas multilamelares (MLVs). Imagem da estrutura de MLVs compostos pelos lipídios DOPC, DPPG e DGS-NTA(Ni), obtida por microscopia eletrônica de transmissão (A) MLV em solução. (B) Efeito de agregação das MLV (foto gentilmente cedida por Wesley Fotoran).

2 OBJETIVO

Este projeto de mestrado tem como principal proposta a geração de anticorpos neutralizantes e indução de imunidade protetora em modelo experimental murino, com a combinação de MLVs e a proteína recombinante Stx2 Δ AB. Esperamos desta forma, avaliar o efeito adjuvante dos MLVs frente a resposta imunológica humoral gerada contra Stx2 e, desta forma, propor uma nova alternativa para a prevenção da SHU. Para isto, as principais etapas traçadas para o alcance do objetivo foram:

- A. Expressão e purificação das proteínas antigênicas Stx2 Δ AB e Stx2B e preparo dos MLVs, utilizadas como adjuvantes e sistemas de entrega (delivery) nas formulações vacinais.
- B. Administração das formulações em camundongos BALB/c e avaliação das respostas de anticorpos antígeno-específico induzidas pelas formulações vacinais em ELISA.
- C. Determinação da afinidade e capacidade de neutralização dos anticorpos anti-Stx2 gerados em ensaios *in vitro* com células VERO.
- D. Determinação da capacidade de neutralização dos anticorpos anti-Stx em ensaios *in vivo* com animais imunizados com as formulações vacinais e posteriormente desafiados com doses letais de Stx2.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Amplificação do gene *stx2b*

O gene *stx2* clonado previamente no vetor pGEMT-Easy (pGEMTStx2) (57) foi utilizado como DNA molde para amplificação do fragmento correspondente ao gene *stx2B*. As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 μL , contendo aproximadamente 268 ng de DNA molde, 10 pmoles de cada um dos iniciadores Fwstx2bNHindIII e RvStx2bNXhoI (Tabela 1), 25 mM de MgCl_2 , 10 mM dideoxynucleotídeos trifosfatados, 0,5 μL da enzima “*Taq* DNA Polimerase (Recombinante)” e seu respectivo tampão na concentração final de 1 x (FERMENTAS). Os iniciadores foram desenhados de forma a manter o peptídeo sinal nativo da subunidade B da toxina de shiga 2 e incluir os sítios de restrição *HindIII* na porção 5' e *XhoI* na porção 3', permitindo a inserção de uma cauda de histidina e códon finalizador já presentes na porção C-terminal da sequência gênica do vetor pET22b.

Iniciadores	Sequências
Fwstx2bN HindIII	5' GCTAA <u>AGCTTT</u> AAAGGAGTTAAGCATGAAGAAG 3'
Rvstx2bN XhoI	5' GCAT <u>CTCGAG</u> GTCATTATTAAGTGCAC 3'

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para amplificação do gene *stx2B*. Em vermelho e sublinhado encontram-se os sítios de restrição das enzimas *HindIII* e *XhoI*.

O programa de PCR utilizado envolveu um passo de desnaturação a 96 °C por 5 min no primeiro ciclo, seguido de 30 ciclos de 40 seg a 94 °C (Etapa de desnaturação), 1 min e 50 seg a 55 °C (Etapa de Anelamento) e 1 min e 50 seg a 72 °C (Etapa de Extensão), seguido de extensão final de 20 min a 72 °C. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e corados com brometo de etídeo 0,1% (v/v).

3.2 Clonagem do gene *stx2B* no vetor pGEM-T Easy (PROMEGA) e transformação em células de *E.coli* DH5 α

Fragmentos de DNA de aproximadamente 300 pb para a subunidade B, obtidos (de acordo ao item 3.1), foram purificados utilizando o kit Montage Millipore – units 250 (MILLIPORE) conforme instruções do fabricante. Para a reação de ligação foram utilizados o produto purificado da PCR e o vetor pGEM-T Easy na razão molar vetor/inserto 1:3, conforme instruções do fabricante. O produto de ligação foi utilizado na transformação de células DH5 α quimiocompetentes (*E. coli* DH5 α). Para a reação de transformação por choque térmico alíquotas de 200 μ L de células DH5 α quimiocompetentes, preparadas previamente conforme protocolo descrito por Sambrook e Russel (127), foram misturadas a 10 μ L de reação de ligação no vetor pGEM-T Easy e colocadas em banho de gelo por 5 min, incubadas em banho-maria a 42 °C por 2 min e novamente em banho de gelo por 5 min. Imediatamente após o choque térmico foram acrescentados 800 μ L de meio LB (Luria Broth – 1% triptona, 0.5% extrato de levedura, 171 mM NaCl, pH 7.0) à alíquota e as células transformadas foram recuperadas por 1 h a 37 °C sob baixa agitação (80 rpm) em agitador orbital. Uma alíquota de 100 μ L resultante da transformação foi semeada em placas de Petri contendo meio LB sólido (triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%, ágar 2%) acrescido de ampicilina (100 μ g/mL), IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside), 0,5 mM e BluoGal 0,8 mg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C durante aproximadamente 18 h até o crescimento de colônias. Os transformantes contendo os insertos foram selecionados por técnica de alpha complementação pela evidência de colônias azuis.

3.3 Subclonagem do gene *stx2B* em vetor de expressão pET22b (NOVAGEN) e análise de restrição do gene *stx2 Δ AB* no vetor pET*stx2 Δ AB*

O vetor pGEM*stx2B*, contendo o gene *stx2B* clonado e o vetor pET22b vazio foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *XhoI* (FERMENTAS) de acordo com as orientações do fabricante. Os produtos das digestões foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (m/v) e corados com brometo de etídeo. As bandas correspondentes aos fragmentos do gene *stx2B* e o vetor pET22b com a massa molecular esperada foram recuperadas do gel utilizando o kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification (GE-HEALTHCARE). A

reação de ligação utilizando o fragmento *stx2B* e o vetor pET22b digeridos e purificados, foi realizada na razão molar vetor/inserto de 1:5 e as condições foram de acordo com as instruções do fabricante para o uso do kit T4 DNA ligase (FERMENTAS). A reação de ligação foi utilizada na transformação de células de *E. coli* DH5 α quimiocompetentes conforme descrito anteriormente (item 3.2) e os clones selecionados foram cultivados em meio LB (triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedura 0,5%), a 200 rpm em 37 °C por 16 h. O DNA plasmidial, foi extraído utilizando o kit GeneJET-Plasmid (FERMENTAS) e submetido a análise de restrição pelas enzimas *HindIII* e *XhoI*. Para a confirmação da presença do gene *stx2 Δ AB* (70), o vetor de expressão pET*stx2 Δ AB* foi duplamente digerido com as enzimas de restrição *NdeI* e *XhoI* (FERMENTAS) de acordo com as orientações do fabricante. Os produtos das digestões de pET22b*stx2B* e pET22b*stx2 Δ AB* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v) e corados com brometo de etídeo.

3.4 Indução da expressão do gene *stx2B* e *stx2 Δ AB* em linhagens de *E. coli* BL21

Após a subclonagem do fragmento contendo o gene *stx2B* no vetor pET22b, denominado pET*stx2B*, foi feita a transformação das linhagens de *E. coli* BL21-plysS e *E. coli* BL21-DEIII, resultando nas linhagens recombinantes *E.coli*-plysStx2B e *E.coli*-DeIIIStx2B, respectivamente. O mesmo procedimento de transformação foi realizado com o vetor de expressão pET*stx2 Δ AB* na linhagem BL21-pLysS, resultando na linhagem recombinante *E.coli*-plysStx2 Δ AB. As linhagens de *E. coli* transformadas foram cultivadas em meio LB acrescido de ampicilina (100 μ g/mL) para *E.coli*-DEIIIStx2B e ampicilina (100 μ g/mL) e cloranfenicol (10 μ g/mL) para *E.coli*-plysStx2 Δ AB. O cultivo foi feito a 37 °C e 200 rpm em agitador orbital até a absorbância (Abs) em 600 nm de 1. Em seguida adicionou-se o agente indutor IPTG a concentração final de 0,5 mM, seguido por nova incubação por 4 h a 37 °C e 200 rpm. Aliquotas de 300 μ L foram recolhidas antes (T0) e após (T4) a indução e centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm, ressuspensas em 50 μ L de tampão de amostra (2% de SDS, 4% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 4 mM de EDTA) e analisadas por SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15%). A cultura bacteriana foi submetida à centrifugação por 10 min a 8.000 rpm. As células sedimentadas foram ressuspensas em tampão A (0,1 M Fosfato de Sódio Bibásico

Anidro, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8) e lisadas mecanicamente (extração citoplasmática) com 600 psi por 3 ciclos de 5 min cada em um homogeneizador modelo APLAB-10 (ARTEPEÇAS, Brasil). Após nova centrifugação a 10.000 rpm (20 min) as frações solúveis (sobrenadante do lisado celular) das induções de Stx2B e Stx2ΔAB, foram filtradas com membrana com poros 0,22 μm e a frações insolúveis (material sedimentado), foram ressuspensas em tampão A contendo uréia (0,1 M Fosfato de Sódio Bibásico Anidro, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 8 M uréia, pH 8). Alíquotas de 15 μL das frações solúveis e insolúveis foram recolhidas e preparadas em tampão de amostra (2% de SDS, 4% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,06 M Tris-HCl, pH 6,8, 4 mM de EDTA) para análise em SDS-PAGE (condições desnaturantes).

Alternativamente, a expressão das proteínas de interesse foi realizada na temperatura de 18 °C por 18 h. Alíquotas antes (T0) e após (T18) indução, bem como a fração solúvel e insolúvel das linhagens induzida (obtidas por extração citoplasmática), foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

3.5 Tentativa de solubilização dos agregados proteicos das proteínas recombinantes Stx2B e Stx2ΔAB por diminuição da concentração de sal

As culturas de *E.coli*-DEIIIStx2B e *E.coli*-pLysStx2ΔAB foram induzidas por 18 h a 18 °C. As células sedimentadas das linhagens induzidas, foram ressuspensas no tampão A sem NaCl (20 mM de Fosfato de Sódio, conforme descrito por Sambrook e Russel (127), 5 mM 2-mercaptoetanol e pH 8), na proporção 1:10 de seu volume inicial da cultura. Após a extração citoplasmática (lise mecânica), as amostras foram centrifugadas por 40 min a 10.000 rpm e 4 °C. As frações solúveis e insolúveis das induções foram tratadas como descrito anteriormente. Alíquotas de antes (T0) e após (T18) indução, bem como as frações solúveis e insolúveis (tampão contendo 8 M uréia), foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

3.6 Extração periplasmática das culturas induzidas para expressão de Stx2B e Stx2 Δ AB com tampões contendo cloreto de sódio (NaCl) em concentrações variando de 0,05 M a 0,5 M

O cultivo das linhagens *E.coli*-DEIIIStx2B e *E.coli*-plysStx2 Δ AB realizou-se conforme descrito anteriormente. Após a adição de 0,5 mM de IPTG, foi realizada incubação por 18 h à 18 °C e 200 rpm. Alíquotas de 300 μ L, foram recolhidas antes (T0) e após (T18) e tratadas conforme protocolo anterior. Amostras contendo 50 mL das culturas das duas linhagens induzidas foram centrifugadas (8.000 rpm, 4 °C, 10 min) e as massas celulares resultantes de cada, ressuspensas com 5 ml dos tampões A (20 mM de Fosfato, diferentes concentrações de NaCl (50 mM, 0,1 M, 0,2 M, 0,3 M, 0,4 M, 0,5 M, pH 8,0). A lise periplasmática (extração periplasmática) foi realizada pela adição de sacarose (20%), lisozima (200 μ g/ml), inibidor de proteases PMSF (1 mM) e polimixina B (0,5 g/L) ao tampão, seguida de incubação em banho de gelo por 30 min com homogeneização vigorosa a cada 5 min. Ao final do período de incubação as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm, 30 min) e as frações solúveis filtradas em membranas com poros de 0,22 μ m. Alíquotas de antes (T0) e após (T18) as induções, assim como das frações solúveis e insolúveis, foram ressuspensas em tampão de amostra (2% de SDS, 4% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,06M Tris-HCl, pH 6,8, 4 mM de EDTA) para análise em gel SDS-Page (15%).

3.7 Indução da expressão do gene *stx2* Δ AB na linhagem de *E. coli* Arctic-Express

A linhagem de *E. coli* Arctic-Express quimiocompetente foi transformada conforme descrito anteriormente, com o plasmídeo pET*stx2* Δ AB, resultando na linhagem recombinante *E.coli*-ArcticStx2 Δ AB. O cultivo foi feito em meio LB acrescido de ampicilina (100 μ g/mL) e Gentamicina (20 μ g/mL). O cultivo foi feito a 37 °C, 220 rpm em agitador orbital até a densidade óptica (Abs em 600 nm) de 2. Após adição do indutor IPTG à concentração final de 0,5 mM, realizou-se a indução por 18 h a 18 °C e 220 rpm. Alíquotas foram recolhidas antes (T0) e após (T18) a indução. A cultura bacteriana foi submetida à centrifugação por 10 min a 5.000 rpm a 5 °C. Para a extração do periplasma bacteriano, as células sedimentadas foram ressuspensas em solução hipertônica (TRIS 10 mM, Sacarose 20%, pH 7,5), com volume definido pelo cálculo: Abs x Volume amostra/100. Procedimento seguiu-se com acréscimo da solução de EDTA (EDTA 0,5 M, pH 8), volume definido pelo

cálculo: Volume de sacarose/30, seguido de dois ciclos de agitação e incubação no gelo por 5 min. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 5.000 rpm e 5 °C, o sobrenadante foi recolhido (Sobrenadante 1) e as células sedimentadas novamente ressuspendidas, desta vez, em solução hipotônica (Tris 10 mM, pH 7,5) com mesmo volume da solução hipertônica. As células foram tratadas como descrito anteriormente, e centrifugadas por 10 min a 8.000 rpm e 5 °C, o sobrenadante foi recolhido (Sobrenadante 2). As alíquotas de antes (T0) e após (T18) indução e alíquotas de 15 µL dos sobrenadantes (Sobrenadantes 1 e 2), foram retiradas para análise em SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15%).

3.8 Purificação por afinidade ao níquel e exclusão de tamanho (Gel Filtração) de Stx2B, Stx2ΔAB (rStx2B)

As frações solúveis das extrações citoplasmáticas e periplasmáticas foram filtradas na presença de membrana com poros de 0,22 µm antes de serem submetidas a purificação. As amostras foram aplicadas em coluna HisTrap HP (1ml) com auxílio do aparelho AKTA – FPLC (GE). Após lavagem da coluna com seus respectivos tampões A. As proteínas foram eluídas mediante aplicação de volumes e concentrações pré-estabelecidos de seus respectivos tampões contendo 1 M de imidazol (tampão B). Alíquotas (15 µL) das frações eluídas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page 15%), sendo as frações contendo as proteínas Stx2B e Stx2ΔAB, reunidas para um segundo método de purificação quando necessário, a gel filtração (cromatografia de exclusão por tamanho). As amostras purificadas por cromatografia de afinidade selecionadas, foram aplicadas nas colunas de exclusão por tamanho (gel filtração) HiloLoad™ 16/60 – Superdex™ 75 pg ou HiPrep™ 26/60-Sephacryl™ S-100HR com auxílio do aparelho AKTA – FPLC (GE). As proteínas foram eluídas por exclusão de tamanho com a passagem de seus respectivos tampões A. Alíquotas (15 µL) das frações eluídas selecionadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-Page 15%).

3.9 Ensaios de *Western blotting* e Imunodeteção

Para realização dos ensaios de *Western blotting* as amostras proteicas foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%) e transferidas para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare Life Sciences). O bloqueio da membrana foi realizado em solução de PBS-Tween 0,05% com 5% de leite por 18 h a 4 °C. A marcação primária foi realizada por incubação (1 h 30 min) com anticorpos policlonais que reconhecem a toxina Stx2 (gentilmente cedido pelo Laboratório de Bacteriologia – Instituto Butantan), na diluição 1:300, utilizando tampão de bloqueio. Anticorpos anti-IgG de camundongos conjugados com a enzima peroxidase (Sigma) produzidos em camundongos (diluição 1:3.000), foram usados como anticorpos secundários. As bandas reativas de proteínas foram identificadas pela exposição das membranas à solução de Luminol - Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), de acordo com as indicações do fabricante (THERMO SCIENTIFIC).

3.10 Preparo dos MLVs (Lipossomas carreadores de proteínas)

Os MLVs foram preparados a partir dos lipídeos DOPC (Dipalmitoyl phosphatidyl choline), DPPG (Dipalmitoyl phosphatidyl glicine), DGS-NTA(Ni) (Dioleoyl glycerol succinyl), Colesterol e Lipídio A (Monophosphoryl Lipid A) (AVANTI POLAR LIPIDS). Três soluções estoques foram preparadas, uma contendo 0,945 mM de DOPC e 0,315 mM de DPPG (razão molar 4:1) ressuspensas em clorofórmio para volume final de 13,513 mL (correspondente a 1,26 mg de lipídeo total). A segunda, contendo 100 mg de DOPC acrescida de 12 mg de colesterol (4:1) e ressuspensa para um volume final de 5 ml utilizando clorofórmio e a terceira contendo 25 mg do lipídeo DGS-NTA(Ni) ressuspensa em 2,5 mL de clorofórmio. Aliquotas de 100 µL da primeira solução e 50 µL da segunda e terceira, foram submetidas a secagem sob agitação a 37 °C por 12 h (remoção do clorofórmio). O filme lipídico formado com DOPC:DPPG, foi ressuspense em 500 µg das proteínas Stx2ΔAB (tampão 20 mM Fosfato de sódio, 50 mM NaCl, 20% Glicerol, pH 8,0) e OVA (PBS, pH 7,4), individualmente e mantidos sob agitação (200 rpm, 37 °C, 1 h 30 min). As amostras foram sonicadas com auxílio do aparelho Digital SonifierR-250 (BRANSON) com amplitude de 20%, 2 ciclos de 2 min, (30 seg ON e 2 seg OFF). Cloreto de cálcio (10 mM) foi adicionado aos sobrenadantes resultantes, seguido de

nova incubação a 37 °C por 1 h sob agitação (200 rpm). As amostras foram centrifugadas (10.000 rpm, 5 min, Temperatura Ambiente – TA) e armazenadas a 4 °C. O filme lipídico composto por DOPC:Chol:DGS-NTA foi ressuspensão em 200 µL de tampão bis-tris-propano 10 mM (pH 7.0), adicionado 250 ng de Lipídio A e amostra foi sonicada conforme descrito anteriormente. Adicionou-se de 20 µL de Cloreto de Níquel (10 mM), seguido de incubação sob agitação (200 rpm, 37 °C, 1 h 30 min). A amostra foi centrifugada e o sobrenadante descartado. Por fim, os lipossomas (DOPC:DPPG) contendo as proteínas incorporadas e não incorporadas (sobrenadante) foram incorporadas às vesículas DOPC:Chol:DGS-NTA(Ni):Lipídio A, formadas anteriormente. Uma nova incubação por 12 h a 37 °C e 200 rpm, ao final, os MLVs foram centrifugados (14.000 rpm, 5 min, TA) e o sobrenadante transferidos para novos tubos. As proteínas não incorporadas e acopladas presentes nos sobrenadantes finais, foram quantificadas por método de redução de cobre com BCA Protein Assay Kit (THERMO SCIENTIFIC) conforme indicações do fabricante. Quantificação necessária para as posteriores avaliações da porcentagem de incorporação e acoplamento de proteínas.

3.11 Determinação da liberação de proteína pelos MVL-OVA

Os lipossomas multilamelares contendo a proteína OVA (MLV-OVA), foram preparadas conforme descrito anteriormente. 3 alíquotas foram armazenadas nas temperaturas de 37 °C, 25 °C e 4 °C. Diariamente, as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm, 5 min, TA) e os sobrenadantes foram quantificados, por método de redução de cobre, com o kit BCA Protein Assay Kit (THERMO SCIENTIFIC).

3.12 Ensaio de DLS (*do inglês Dynamic Light Scattering*), Potencial Zeta e Polidispersão

Frações da proteína Stx2B e Stx2ΔAB, obtidas após purificação por exclusão de tamanho e os MLV-OVA, MLV-rStx2B e MLVs vazios, foram centrifugadas (10.000 rpm, 4 °C, 10 min). Em seguida foram ressuspensas em seus respectivos tampões. Um mililitro de cada amostra foi submetido à análise de DLS para caracterização de tamanho molecular (proteínas), potencial zeta e polidispersão

das partículas, com auxílio do aparelho Zetasizer Nano-Z (MALVERN), procedimento realizado de acordo com especificações do fabricante.

3.13 Ensaio de citotoxicidade dos MVL-rStx2B (Proteína incorporada a lipossomas multilamelares) em células VERO

A proteína rStx2B e os MLV-rStx2B, foram incubados em 100 µL de meio MEM (2% soro fetal bovino), sob 2×10^4 célula/poço em placas de 96 poços (COSTAR-CORNING). Diferentes diluições (1:2) da proteína e dos MLVs, partindo de concentrações equimolares a 6 ng da toxina Stx2 nativa, utilizada neste ensaio como o controle positivo. As células foram incubadas em estufa por 48 h (37 °C/5% CO₂).

3.14 Ensaio de determinação da citotoxicidade de Stx2 – DC₅₀ em Célula VERO

A toxina Stx2 foi incubada em 100 µL de meio MEM (2% soro fetal bovino) sob 2×10^4 célula/poço aderidas em placas de 96 poços (COSTAR- CORNIG). Diferentes diluições (1:2) da toxina Stx2, partindo de 6 ng foram adicionadas sob as células, seguido de incubação em estufa por 48 h (37 °C / 5% CO₂). As células foram lavadas duas vezes com PBS, em seguida adicionado 100 µL de cristal violeta e incubadas por 15 min a 37 °C. As placas foram submergidas duas vezes para em água destilada e adicionado 100 µL de ácido acético seguido de incubação (20 min/TA). Como controle negativo foi utilizado apenas as células. Leitura da absorbância realizada a 570 nm em leitor de placas Epoch (BIOTEK). Cálculo para definição da porcentagem de células viáveis, realizados com a fórmula $(Abs_{sem\ toxina} - Abs_{com\ toxina}) \times 100$.

3.15 Ensaio de ligação da proteína recombinante rStx2B em células VERO

A partir de uma suspensão de células VERO, 10^5 células foram transferidas para placas de fundo U (COSTAR-CORNING). As células foram incubadas no gelo com 1 µg de rStx2B ou valores equimolares da toxina Stx2 em meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), por 30 min em um volume final de 50 µL. A placa foi centrifugada a 750 rpm e as células foram lavadas 3 vezes com

PBS suplementado com 2% de SFB. O soro anti-Stx2 (título de 10^3) foi diluído (1:300) e adicionado sob as células, seguido de incubação no gelo por 30 min. As células foram novamente lavadas com PBS-SFB 2% e incubadas com o anticorpo secundário FITC-conjugado a IgG anti-camundongo (BD BIOSCIENCES) por 30 min no gelo (diluição 1:100). Após novo processo de lavagem as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS-SFB 2% e analisadas por citometria de fluxo (FORTESSA, BD, MOUNTAIN VIEW, CA). Resultados obtidos analisados por FlowJo.

3.16 Ensaio de determinação da antigenicidade da proteína recombinante rStx2B

Placas de 96 poções de fundo chato (COSTAR-CORNING), foram sensibilizadas com 100 ng/poço da proteína recombinante rStx2B e proporção equimolar da toxina Stx2, em suas formas intactas e desnaturada (10 min a 100 °C), por 18 h a 4 °C. Adicionou-se 200 μ L/poço da solução de bloqueio (PBS-Gelatina 3%), seguido de incubação por 2 h a 37 °C. As placas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS-Tween 0,05% e o soro dos animais imunizados com Stx2-inativada, foram utilizados para a marcação primária, na diluição seriada, partindo de 1:50 em PBS-Gelatina 1%, para volume final de 100 μ L. Seguiu-se de incubação por 1 h 30 min a 37 °C. Novamente as placas foram lavadas por 3 vezes com solução de PBS-Tween 0,05% e adicionou-se o segundo anticorpo IgG-camundongo conjugado à peroxidase (SIGMA) na diluição 1:3.000, volume final de 100 μ L, (incubação por 1 h a 37 °C). As placas foram lavadas por 3 vezes e reveladas com 100 μ L da solução reveladora (tampão citrato, OPD, H₂O₂) por 20 min a temperatura ambiente e no escuro. Revelação interrompida com 50 μ L por poço de 1 M de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de placa Epoch (BIOTEK).

3.17 Imunizações

3.17.1 Imunização para obtenção de anticorpos anti-Stx2

A toxina nativa Stx2 foi inativada via glutaraldeído (gentilmente cedida pelo Laboratório de Bacteriologia – Instituto Butantan). Adicionou-se à 100 μ g de Stx2 1 mililitro de tampão fosfato bibásico de sódio (0,1 M Na₂HPO₄, pH8,0, 0,11% de

glutaraldeído), incubou-se por 30 min a 37 °C. O toxóide foi mantido em alíquotas armazenadas a -20 °C. Foram administradas 3 doses, por via subcutânea, em camundongos fêmeas da linhagem Balb/c (n=5) de Stx2 inativada (10 µg) e ALUM (Hidróxido de alumínio - 25 µg). A coleta do sangue dos animais se deu por punção no plexo submandibular, 14 dias após a última dose. Os soros obtidos foram titulados por ensaio de ELISA (vide 3.16) e a leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de placas Epoch (BIOTEK).

3.17.2 Imunização para avaliação da cinética de dose-resposta dos MLV-OVA e MLV-rStx2B

Camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas de 6-8 semanas, foram obtidos junto ao biotério do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas-USP. Os camundongos foram imunizados, com os MLVs carreando 25 µg da proteína OVA e 25 µg da proteína recombinante rStx2B, contando com os grupos: proteína OVA, MVL-OVA, proteína recombinante rStx2B, MLV-rStx2B e os MLVs vazios (utilizada como grupo controle da imunização). Cada grupo foi composto por 5 animais e o regime vacinal contou com 3 doses, em intervalos de 28 dias, por via subcutânea. A coleta de sangue (punção na região plexo-submandibular) foi realizada nos dias 7, 14, 21 e 28 após cada dose.

3.17.3 Segunda imunização para produção de anticorpos anti-rStx2B

Nesta segunda imunização, camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas de 6-8 semanas, foram obtidas junto ao biotério do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas-USP. A imunização contou com os grupos que receberam as seguintes formulações: proteína rStx2B, proteína rStx2B mais Lipídio A, MLV-rStx2B e os MLVs vazios (grupo controle da imunização). Cada grupo foi composto por 10 animais e o regime vacinal contou com 3 doses, administradas em intervalos de 15 dias, por via subcutânea. Realizou-se a coleta de sangue (punção na região plexo-submandibular) 14 dias após cada dose.

3.18 Coleta e processamento de amostras

A coleta de sangue dos camundongos foi realizada por punção no plexo submandibular. O sangue foi mantido em estufa a 37 °C por 30 min, em seguida a 4 °C por 30 min, para retração do coágulo. As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm a 4 °C. O soro foi armazenado a -20 °C.

3.19 Ensaio para dosagem de anticorpos IgG total e subclasses dos soros obtidos nas imunizações com rStx2B

Placas de 96 poções de fundo chato (COSTAR-CORNING), foram sensibilizadas com 100 ng/poço da proteína recombinante rStx2B e da proteína OVA por 18 h a 4 °C. Após, adicionou-se 200 µL/poço da solução de bloqueio (PBS-Gelatina 3%) com incubação a 37 °C por 2 h. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS-Tween 0,05% e o soro dos animais imunizados com rStx2B e MLV-rStx2B, partindo da diluição 1:50 em PBS-Gelatina 1%, para volume final de 100 µL foram adicionadas, seguido de incubação por 1 h 30 min a 37 °C. As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com solução de PBS-Tween 0,05% e adicionou-se o segundo anticorpo IgG-camundongo (IgG total) ou IgG1-camundongo ou IgG2a-camundongo (subclasses) conjugados à peroxidase, (SIGMA) na diluição 1:3.000, volume final de 100 µL/poço, seguido de incubação por 1 h a 37 °C. As placas foram lavadas por 3 vezes e reveladas com 100 µL da solução reveladora (tampão citrato, OPD, H₂O₂) por 20 min à temperatura ambiente e no escuro. Revelação interrompida com 50 µL por poço de 1 M de ácido sulfúrico. A leitura das absorbâncias foi realizada a 492 nm em leitor de placa Epoch (BIOTEK).

3.20 Ensaio para determinação da afinidade de anticorpos IgG específicos rStx2B obtidos após imunização

A afinidade dos anticorpos anti-rStx2B obtidos após a imunização foi avaliado por ensaio de ELISA baseado na diluição de tiocianato de amônio (91). O procedimento foi similar ao realizado para ensaio de ELISA descrito anteriormente, com a inclusão de uma etapa extra contando com a exposição por 20 min (TA, no

escuro), de diferentes concentrações de tiocianato de amônio (0 a 4 M), após a incubação de diluições dos soros normalizados (Abs=1 em 492 nm). Os soros utilizados no ensaio foram previamente titulados e apenas os soros do grupo imunizado com os MVL-rStx2B permitiram realização do ensaio em função dos títulos finais alcançados. Foram utilizadas as seguintes diluições: 1:320 – do soro de 14 e 105 dias após última dose; 1:160 - do soro de 60 dias após última dose; 1:40 – do soro de 90 dias após última dose. Da segunda imunização utilizou-se a diluição 1:40 – do soro de 14 dias após última dose. A leitura das absorbâncias, foram realizadas a 492 nm em leitora de placas Epoch (BIOTEK).

3.21 Ensaio de neutralização da toxina Stx2 pelos soros obtidos após imunização *in vitro*

Amostras dos soros foram previamente diluídas em meio MEM-SFB 2%, em placa de 96 poços (COSTAR-CORNING), iniciando com a diluição de 1:10, para um volume final de 50 µL por poço. A toxina Stx2 foi diluída também em meio MEM-SFB 2%, com 1 x DC₅₀, para um volume final de 50 µL por poço e foi misturado as diluições dos soros. As placas foram incubadas por 1 h a 37 °C, seguido de 1 h a 4 °C. Após a incubação, os 100 µL foram transferidos para as placas de 96 poços, contendo uma monocamada de 2 x 10⁴ células VERO por poço, em seguida incubadas em estufa (5% CO₂/37 °C) por 48 h. Após incubação, descartou-se cuidadosamente o meio e a monocamada foi lavada com PBS, em seguida acrescentou-se 100 µL/poço de cristal de violeta e incubadas por 15 min a 37 °C. Para lavagem, as placas foram submergidas duas vezes em água e adicionou-se 100 µL de ácido acético por poço, seguido de incubação por 20 min em temperatura ambiente. Como controles do ensaio, utilizou-se apenas meio e apenas a toxina. A leitura da densidade óptica foi realizada a 570 nm em leitor de placa Epoch (BIOTEK). A porcentagem de células viáveis foi calculada com base na fórmula $[(Abs_{toxina+anticorpo}-Abs_{toxina})/(Abs_{sem\ toxina} - Abs_{toxina})] \times 100$.

3.22 Determinação da dose citotóxica (DL₁₀₀)

Concentrações da toxina Stx2 nativa de 0,5 a 12 ng/animal, foram ressuspensas para 50 µL e inoculadas via endovenosa (plexo retro-orbital), em

camundongos da linhagem Balb/c (n=3), fêmeas de 6-8 semanas. Camundongos foram obtidos junto ao biotério do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Ciências Biomédicas-USP. Os animais foram acompanhados por uma semana.

3.23 Ensaio de desafio com a toxina Stx2

A atividade neutralizante da toxina Stx2 foi determinada *in vivo* nos animais imunizados na segunda imunização. Para isso, 3 ng/animal (1 DL₁₀₀), foi inoculada 21 dias após a última dose, pela via endovenosa (plexo retro-orbital), nos grupos experimentais (n=10/grupo). A sobrevivência dos animais foi acompanhada durante 7 dias após a inoculação.

3.24 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa GraphPad Prism 5 utilizando análise de variância (Anova) com subsequente teste de comparação múltipla de Bonferroni e Teste T na comparação múltipla entre os grupos. Para os dados de sobrevivência foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox). A significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$, $p < 0.01$ ou $p < 0.001$.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção do antígeno Stx2B e Stx2 Δ AB

O gene *stx2B* foi amplificado a partir do vetor pGEMT*stx2*, usado como molde, e iniciadores específicos (Tabela 1). A reação de amplificação resultou em um único fragmento de aproximadamente 300 pb, correspondente à sequência que codifica a subunidade B e seu respectivo peptídeo sinal. O fragmento amplificado foi clonado no vetor pGEM e a ligação foi confirmada por análise de restrição com as enzimas *HindIII* e *XhoI* (Figura 3-A). A clonagem do fragmento contendo o gene *stx2B* no vetor de expressão pET22b foi realizada, em seguida, por clonagem forçada após digestão do vetor com as mesmas enzimas empregadas na liberação do fragmento clonado no vetor pGEM. A clonagem do gene foi confirmada após análise de restrição, na qual observa-se duas bandas, uma correspondente ao gene *stx2B* e outra que corresponde ao vetor plasmidial com 5.493 pb. (Figura 3-B). A presença do fragmento codificador para a proteína recombinante Stx2 Δ AB na construção pET*stx2* Δ AB foi confirmada após análise de restrição com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, na qual observa-se duas bandas, um fragmento de aproximadamente 550 pb, correspondente à sequência que codifica a porção A₂, a subunidade B e seus respectivos peptídeos sinal, e outra que corresponde ao vetor plasmidial com 5.493 pb (Figura 3-C).

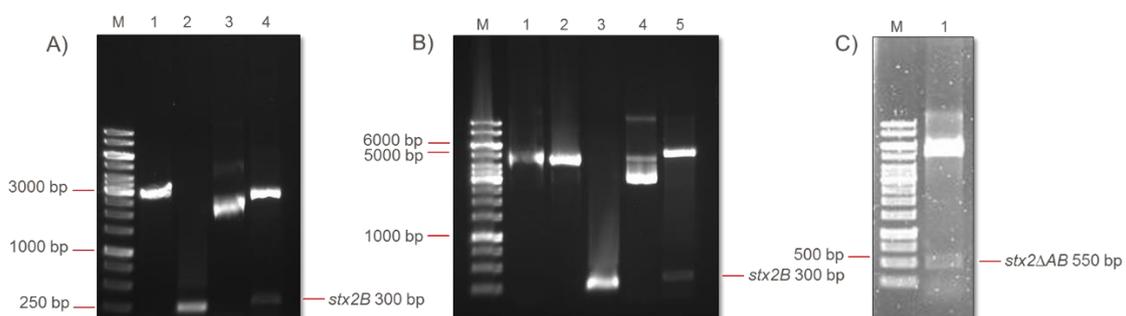


Figura 3 - Clonagem e subclonagem do gene *stx2B* e análise de restrição da construção pET22-*stx2* Δ AB. O fragmento do gene *stx2B* amplificado a partir do plasmídeo pGEMT*stx2* foi clonado no vetor de clonagem pGEMT-Easy (A) e subclonado em pET22b (B). A clonagem foi confirmada por análise de restrição utilizando as enzimas *HindIII* e *XhoI* e as reações foram analisados em gel de agarose a 0,8% p/v. (C) Análise de restrição do vetor codificador para Stx2 Δ AB com as enzimas *NdeI* e *XhoI*, em gel de agarose 0,8%. **Amostras A:** M: Marcador de peso molecular (O'GeneRuler 1Kb – THERMO SCIENTIFIC); 1: pGEMT-Easy linear; 2: Fragmento do gene *stx2B* purificado; 3: pGEM*stx2B* não digerido; 4: pGEM*stx2B* digerido. **Amostras B:** M: Marcador de peso molecular; 1: pET22b vazio circular; 2: pET22b linear; 3: Fragmento do gene *stx2B* purificado; 4: pET22*bstx2B* não digerido; 4: pET22*bstx2B* digerido. **Amostras C:** M: Marcador de peso molecular; 1: pET22b-*stx2* Δ AB digerido.

Confirmadas as clonagens, o plasmídeo recombinante pETstx2B foi introduzido nas linhagens de *E. coli* BL21-plysS e BL21-DEIII, denominadas *E. coli*-pLysStx2B e *E. coli*-DeIIIStx2B, respectivamente. O plasmídeo recombinante pETstx2ΔAB introduzido na linhagem de *E. coli*-pLysS, denominado *E. coli*-pLysSStx2ΔAB. As linhagens foram cultivadas, e posteriormente, induzidas para a expressão da proteína recombinante, como descrito na metodologia. Amostras das culturas antes e após a indução, assim como as frações solúvel e insolúvel dos lisados celulares foram analisadas por SDS-PAGE. Nestas análises observou-se uma banda correspondente à proteína recombinante Stx2B presente na fração solúvel entre os marcadores moleculares de 10 kDa e 15 kDa. Esta banda foi mais proeminente na cultura induzida da linhagem *E. coli*-DeIIIStx2B (Figura 4-B). Foi observado entre os marcadores de 10 kDa e 15 kDa uma banda na fração solúvel correspondente a proteína Stx2ΔAB. Para purificação das proteínas recombinantes optamos pelas linhagens *E. coli*-DeIIIStx2B e *E. coli*-pLysSStx2ΔAB.

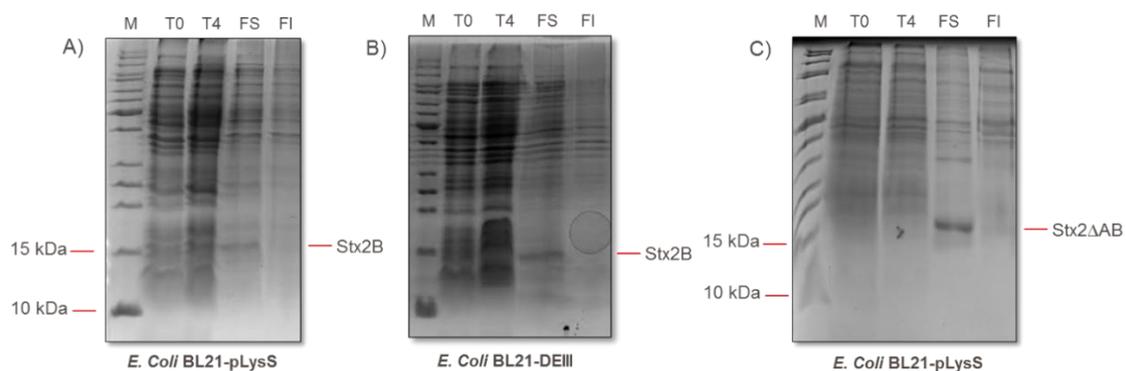


Figura 4 - Expressão das proteínas Stx2B e Stx2ΔAB nas linhagens de *E. coli* BL21. As linhagens de *E. coli* BL21-pLysSStx2B (A) *E. coli*-DeIIIStx2B (B) e *E. coli*-pLysSStx2ΔAB (C) foram induzidas a 37 °C por 4 h. **Amostras:** M: Marcador de peso molecular (UNSTAINED-PROTEIN-THERMO SCIENTIFIC); T0: Extratos das linhagens antes da indução; T4: Extratos das linhagens após indução; FS: Frações solúveis; FI: Frações insolúveis solubilizadas em tampão desnaturante contendo 8M de uréia. Eletroforese feita em géis de poliacrilamida na concentração de 15%.

As frações solúveis obtidas a partir dos extratos citoplasmáticos de *E. coli*-DeIIIStx2B e *E. coli*-pLysSStx2ΔAB após a indução, foram submetidas à purificação das proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade ao níquel. Observou-se na análise realizada em SDS-PAGE, a presença de uma única banda entre os marcadores de 10 kDa e 15kDa nas frações eluídas com 500 mM e 300 mM de imidazol (Figura 5-C e D).

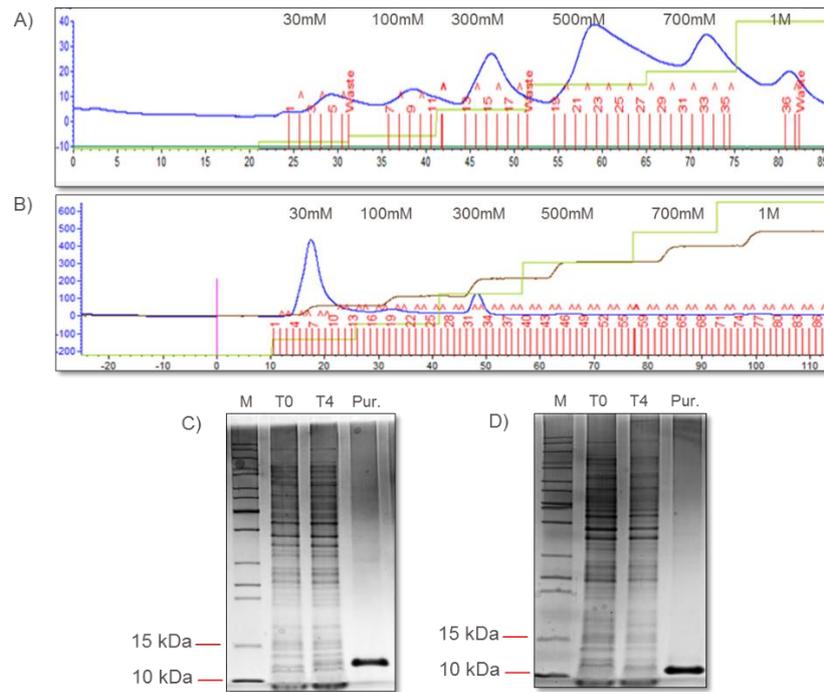


Figura 5 - Purificação das proteínas Stx2B e Stx2 Δ AB por cromatografia de afinidade. (A e B). Cromatogramas de eluição das proteínas Stx2B e Stx2 Δ AB, respectivamente, utilizando concentrações de 30 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, 700 mM e 1 M de imidazol para Stx2B e 300 mM para Stx2 Δ AB) foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. **(C)** Gel desnaturante (SDS-Page 15%) da Stx2B. **(D)** Gel desnaturante (SDS-Page 15%) da Stx2 Δ AB. **Amostras C:** M: Marcador de peso molecular; T0: Extrato total antes da indução; T4: Extrato total após indução; Pur.: Stx2B purificada. **Amostras D:** M: Marcador de peso molecular; T0: Extrato total antes da indução; T4: Extrato total após indução; Pur.: Stx2 Δ AB purificada.

As proteínas recombinantes Stx2B e Stx2 Δ AB purificadas foram analisadas pela técnica de DLS, que resultou na detecção de arranjos proteicos de 300 a 900 nm aproximadamente para Stx2B e de 300 a 800 nm aproximadamente para Stx2 Δ AB (Figura 6-A e B). Esse resultado indicou que as proteínas recombinantes formaram agregados moleculares que seriam incompatíveis com as etapas posteriores do trabalho, envolvendo a incorporação em vesículas lipídicas, uma vez que o tamanho das vesículas pode influenciar na apresentação do antígeno e perfil de resposta imunológica gerado (79,80).

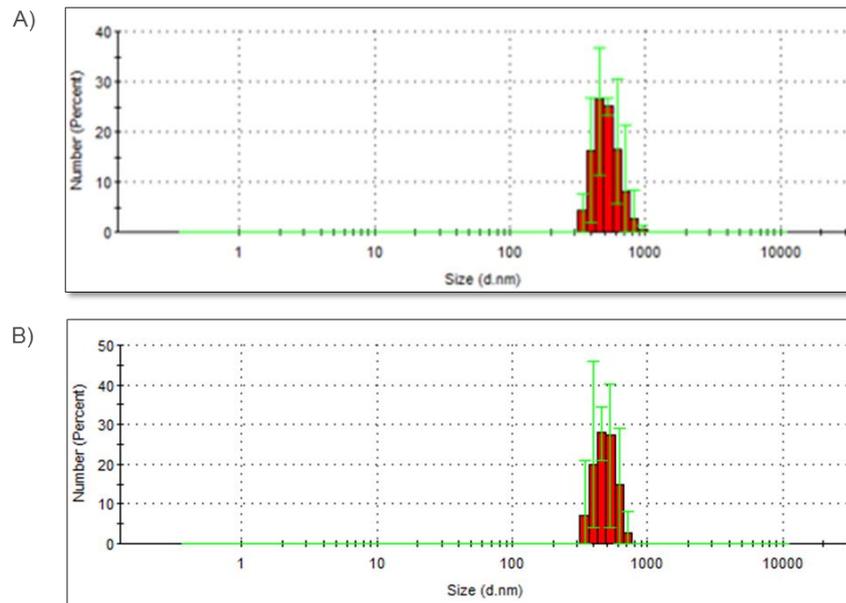


Figura 6 - Caracterização do tamanho das proteínas Stx2B e Stx2 Δ AB. Por ensaio de DLS (*do inglês Dynamic Light Scattering*), realizado em triplicata, obteve-se o tamanho aproximado das moléculas purificadas. **(A)** DLS da proteína Stx2B resultando na presença de partículas de 300 a 1.000 nm. **(B)** DLS da proteína Stx2 Δ AB resultando na presença de partículas de 300 a 700 nm. Para estes ensaios as proteínas foram solubilizadas em tampão fosfato (Fostato 0,1 M, NaCl 0,5 M, Glicerol 20%, pH 7.4).

Na tentativa de solubilizar os agregados de Stx2B e Stx2 Δ AB fez-se a indução das linhagens *E.coli*-DeIIIStx2B e *E.coli*-pLysSStx2 Δ AB a 18 °C por 18 h, seguido de purificação a partir da fração solúvel do extrato celular (fração citoplasmática). As proteínas purificadas por cromatografia de afinidade mantiveram agregados semelhantes àqueles observados anteriormente, após nova análise por DLS (dados não mostrados). Como uma segunda tentativa para desfazer os agregados proteicos, utilizou-se um tampão sem a presença de NaCl (20 mM Fosfato de Sódio, 5 mM 2-mercaptoetanol, pH 8,0), para as extrações citoplasmáticas de ambas as linhagens de *E.coli* que expressam Stx2B e Stx2 Δ AB. A proteína recombinante Stx2B manteve agregados proteicos de tamanhos semelhantes aos vistos anteriormente, enquanto a Stx2 Δ AB apresentou uma pequena diminuição, apresentando partículas de 200 a 600 nm (dados não mostrados). Uma nova estratégia experimental foi utilizada para se obter as proteínas recombinantes em condição não agregada. Para isso, fez-se a extração das proteínas a partir do periplasma bacteriano, uma vez que o gene clonado codifica para o peptídeo sinal das proteínas e, em conjunto, avaliamos o efeito da salinidade no tampão utilizado para extração periplasmática das proteínas Stx2B e Stx2 Δ AB (conforme descrito em materiais e métodos). Os extratos periplasmáticos foram purificados por cromatografia de afinidade ao níquel, seguida de purificação

por exclusão de tamanho (Gel filtração). Em todas as concentrações de NaCl testadas, as proteínas Stx2B e Stx2 Δ AB mostraram comportamento eletroforético com massa molecular aparente entre 15 kDa e 10 kDa e sua intensidade diminuída com o aumento da concentração de NaCl no tampão de extração (dados não mostrados). As frações dos extratos periplasmáticos obtidas com tampão contendo 50 mM de NaCl resultaram em três bandas adicionais presentes abaixo do marcador molecular de 15 kDa, após a indução de Stx2B e duas bandas presentes na indução de Stx2 Δ AB. Um ensaio de imunodeteção revelou que as amostras de Stx2B e Stx2 Δ AB obtidas, reagiram especificamente com soro anti-Stx2 (Figura 7-A e B) demonstrando a presença de epítomos semelhantes à subunidade B da toxina nativa.

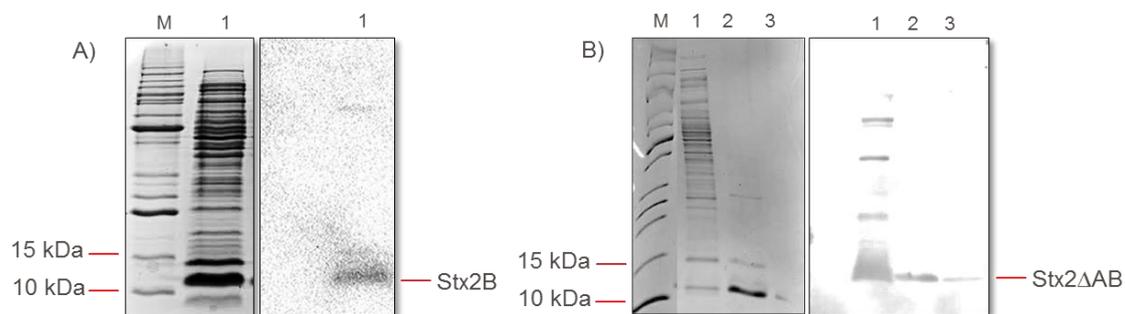


Figura 7 - Imunodeteção das proteínas Stx2B e Stx2 Δ AB. (A) Imunodeteção utilizando o extrato periplasmático obtido da linhagem de *E. coli*-DEIIIStx2B na presença de tampão contendo 50 mM de NaCl em gel desnaturante (SDS-Page 15%). (B) Ensaio de imunodeteção de Stx2 Δ AB. **Amostras A:** M: Marcador de peso molecular; 1: Extrato periplasmático. **Amostras B:** 1: Material periplasmático obtido com tampão contendo 50mM de NaCl; 2: Aliquota da proteína obtida após cromatografia de afinidade; 3: Aliquota da proteína obtida após purificação utilizando a técnica de gel filtração. Gel espelho (corado com Comassie blue) à esquerda e imunoblot (revelado com soro anti-Stx2) à direita.

As frações solúveis periplasmáticas obtidas com tampão contendo 50 mM de NaCl foram selecionadas para dar prosseguimento aos experimentos, visto que notamos bandas mais intensa no peso molecular esperado. As proteínas recombinantes Stx2B e Stx2 Δ AB, obtidas após a gel filtração, tiveram seu tamanho analisado por DLS (Figura 8-A e B). O ensaio resultou na detecção de partículas muito polidispersas, com tamanhos variando de 400 a 3.000 nm para Stx2B. No entanto, para Stx2 Δ AB se detectou partículas pouco polidispersas, de 4 a 10 nm e com tamanho esperado para a forma de monomérica. Esses resultados indicam que a condição experimental definida utilizando a extração do periplasma bacteriano com a utilização de tampão contendo 50 mM de NaCl, seguida das purificações por afinidade e gel filtração, permitiu a obtenção da proteína recombinante Stx2 Δ AB sem

a formação de agregados moleculares em sua forma de monômero, adequada para os testes de incorporação em lipossomas. Porém, este resultado indicou a ausência da porção A₂, uma vez que não foi observado a presença de partículas de tamanho correspondente ao pentâmero de Stx2B, a qual foi confirmada em ensaio de imunodeteção (Figura 9-B). Devido aos resultados encontrados, optamos por não dar continuidade aos experimentos com a proteína Stx2B e diante do ocorrido com a proteína Stx2ΔAB, direcionamos nossos esforços para os experimentos com este recombinante de Stx na forma de monômero, o qual denominamos rStx2B.

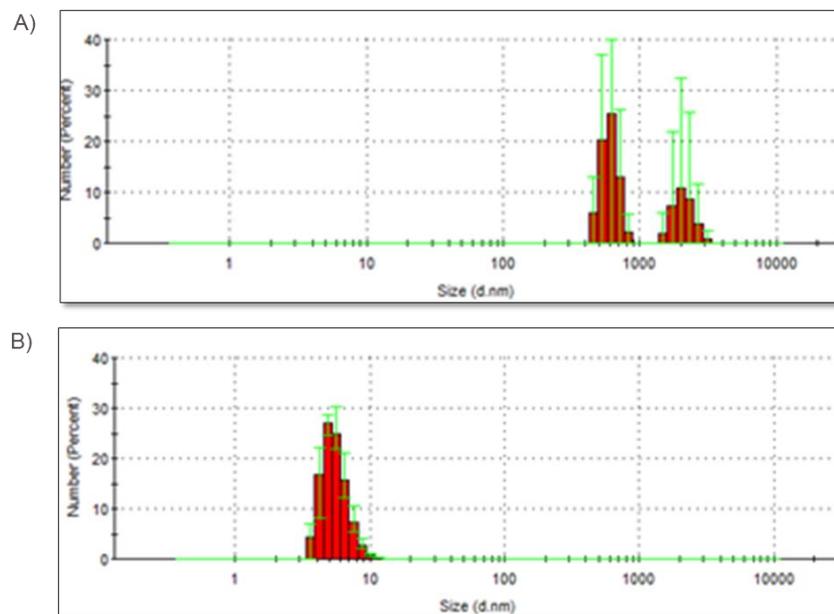


Figura 8 - Determinação da presença de agregados proteicos de Stx2B e obtenção da proteína recombinante Stx2ΔAB na forma não agregada. Por ensaio de DLS, realizado em triplicata obteve-se o tamanho das proteínas obtidas após purificação. (A) Agregados moleculares da proteína recombinante Stx2B caracterizada pelo tamanho de partículas entre 400 a 3.000 nm. (B) A análise por DLS da proteína Stx2ΔAB obtida após a purificação por gel filtração, no qual pode-se observar a presença de partículas com tamanho entre 3 e 10 nm. Ambas proteínas foram solubilizadas em tampão fosfato (Fostato 20 mM, NaCl 50 mM, Glicerol 20%, pH 8).

Apesar da obtenção da proteína rStx2B na condição esperada, o rendimento obtido foi de 0,5 μg por litro de cultura induzido. Na tentativa de aumentar esse rendimento, um novo teste de expressão foi realizado, desta vez, a expressão de rStx2B foi testada na linhagem de *E.coli* Arctic Express. A linhagem, denominada *E.coli*-ArcticrStx2B, foi induzida a 18 °C por 18 h e a fração periplasmática extraída na presença de soluções hipertônicas e hipotônicas (conforme descrito em materiais e métodos). As frações obtidas a partir do lisado celular de amostras antes e após indução, assim como dos extratos periplasmáticos obtidos foram analisadas em gel SDS-PAGE. A proteína recombinante rStx2B, foi melhor expressa pela linhagem

E.coli-ArcticrStx2B em relação a outra linhagem testada (Figura 9-A). Uma banda mais proeminente, próxima ao marcador de 10 kDa, foi observada na amostra do lisado celular da cultura induzida e na segunda etapa da extração periplasmática. A proteína rStx2B foi purificada a partir do extrato periplasmático por cromatografia de afinidade. Como segunda etapa de purificação utilizou-se a cromatografia por exclusão de tamanho, no qual apresentou tempo de retenção igual ao obtido na purificação da proteína expressa na linhagem *E.coli*-pLysSrStx2B (120 min). Por fim, foi feita uma nova cromatografia de afinidade ao níquel para concentrar a proteína obtida. Obteve-se ao final do processo um rendimento de 4 mg de proteína por litro de cultura induzido. Um ensaio de imunodeteção revelou que o soro anti-rStx2B reagiu especificamente com a subunidade B de Stx2 (Figura 9-B), o mesmo não ocorreu com a subunidade A de Stx2 utilizada como controle positivo do ensaio.

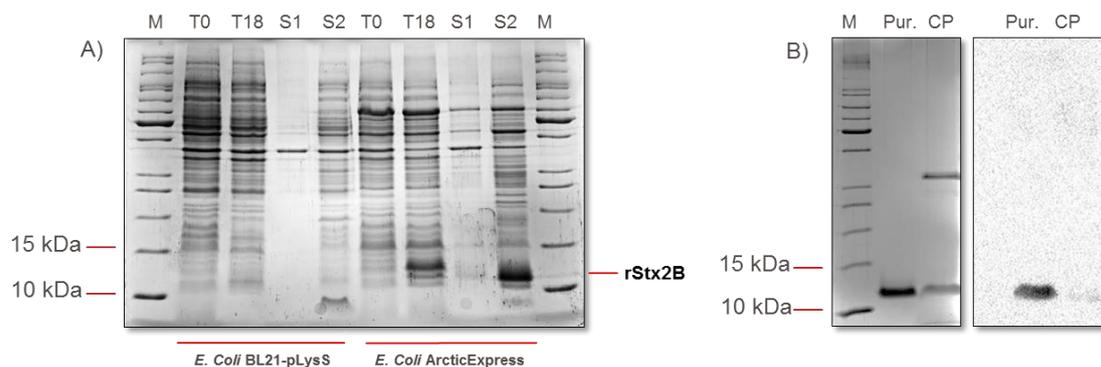


Figura 9 - Expressão da proteína rStx2B na linhagem de *E.coli*-ArcticrStx2B. As linhagens de *E. coli*-pLysSrStx2B e *E. coli*-ArcticrStx2B foram induzidas a 18 °C por 18 h. O extrato periplasmático foi extraído conforme protocolo descrito em materiais e métodos e analisadas em gel SDS-Page segundo a figura. **(A)** Expressão da proteína recombinante Stx2 Δ AAB. **(B)** Imunodeteção da proteína rStx2B. **Amostras A:** M: Marcador de peso molecular; T0: Extratos das linhagens antes da indução; T18: Extratos das linhagens após indução; S1: Sobrenadante 1; S2: Sobrenadante 2. Eletroforese realizada em géis de poliacrilamida na concentração de 15%. **Amostras B:** M: Marcador de peso molecular; Pur: rStx2B purificada por cromatografia de afinidade e gel filtração; CP: Toxina nativa Stx2. Gel corado com Comassie blue à esquerda e imunoblot revelado com soro anti-rStx2B à direita.

4.2 Caracterização da atividade biológica e antigenicidade da proteína recombinante rStx2B

A proteína recombinante foi obtida na forma de monômero. Para avaliar, se esta preserva a mesma capacidade de ligação da subunidade B nativa, testamos a capacidade de ligação da proteína recombinante e a toxina nativa Stx2 a células VERO. A análise realizada por citometria de fluxo demonstrou a capacidade do monômero de rStx2B em se ligar aos receptores das células. Em vermelho o controle negativo composto apenas pelas células VERO, em verde a toxina nativa Stx2 como o controle positivo, por fim, em azul a proteína recombinante rStx2B (Figura 10-A). Este resultado indica que a proteína rStx2B possui a capacidade de reconhecer e se ligar à receptores presentes na superfície de células de mamíferos.

Em outro ensaio avaliamos a antigenicidade da proteína recombinante por meio de ensaio de ELISA com soro de camundongos imunizados com a Stx2 nativa (conforme materiais e métodos). Para isto usamos a proteína recombinante em sua forma nativa e após tratamento de desnaturação térmica. A proteína rStx2B preserva mais epítomos conformacionais em relação aos lineares. No entanto, tanto lineares como conformacionais foram reconhecidos pelos anticorpos anti-Stx2 (Figura 10-B).

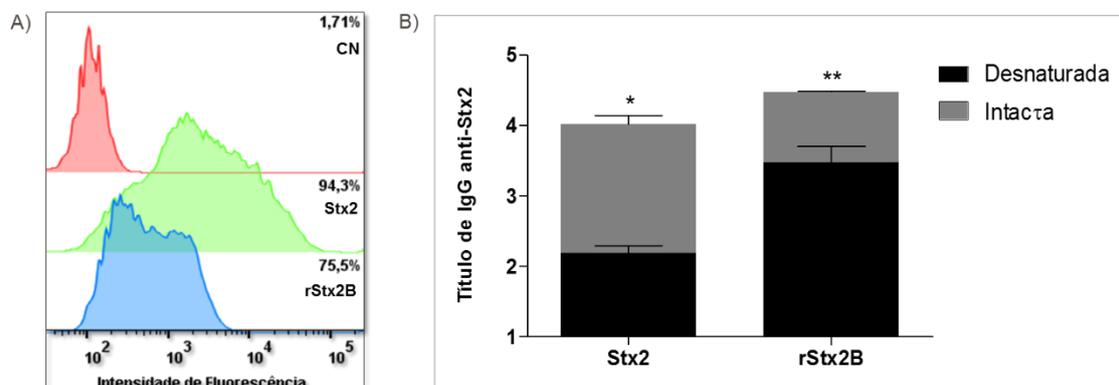


Figura 10 - Avaliação da atividade biológica e antigenicidade da proteína recombinante rStx2B. (A) A capacidade da proteína rStx2B se ligar a receptores de membrana foi avaliada em ensaio de ligação *in vitro* com células VERO por citometria de fluxo. (B) A antigenicidade da proteína rStx2B (em sua forma intacta ou previamente desnaturada por calor) foi mensurada em ELISA utilizando soro anti-Stx2. Proporções equimolares das proteínas foram utilizadas nos ensaios. Os dados apresentados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. Os valores representam a média \pm erro padrão dos títulos de anticorpos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, (Teste T).

4.3 Preparo e caracterização dos MLV's (Lipossomas multilamelares carreadores de proteínas)

Uma vez caracterizado o antígeno, partimos para a padronização das condições experimentais do trabalho com os MLVs. Inicialmente realizou-se o monitoramento do tamanho das partículas formadas ao fim do preparo da formulação e sua polidispersão, neste caso, como antígeno a proteína OVA. O filme lipídico, composto pelos lipídios DOPC:DPPG:LipA:DGS-NTA(Ni):CHOL foi ressuspense com tampão Bis-Tris-Propano para a formação do lipossoma vazio e um segunda filme ressuspense com 500 µg da proteína OVA (tampão PBS 1X, pH 7,2), para a formação dos MLV-OVA. Ao fim do protocolo de preparo, obteve-se 55% de incorporação e acoplamento da proteína nas vesículas lipídicas. As amostras de MLVs (vazia) e dos MLV-OVA foram avaliadas por ensaio de DLS para análise do tamanho e polidispersão das partículas geradas, assim como do potencial zeta. Cerca de 90% das partículas apresentaram 142,2 nm, com carga superficial negativa de -16,7 mV, para as MLV vazias. Os MLV-OVA apresentou 97,2% das vesículas com 115,5 nm e carga superficial de -36,3 mV (Figura 11- A, B, C e D).

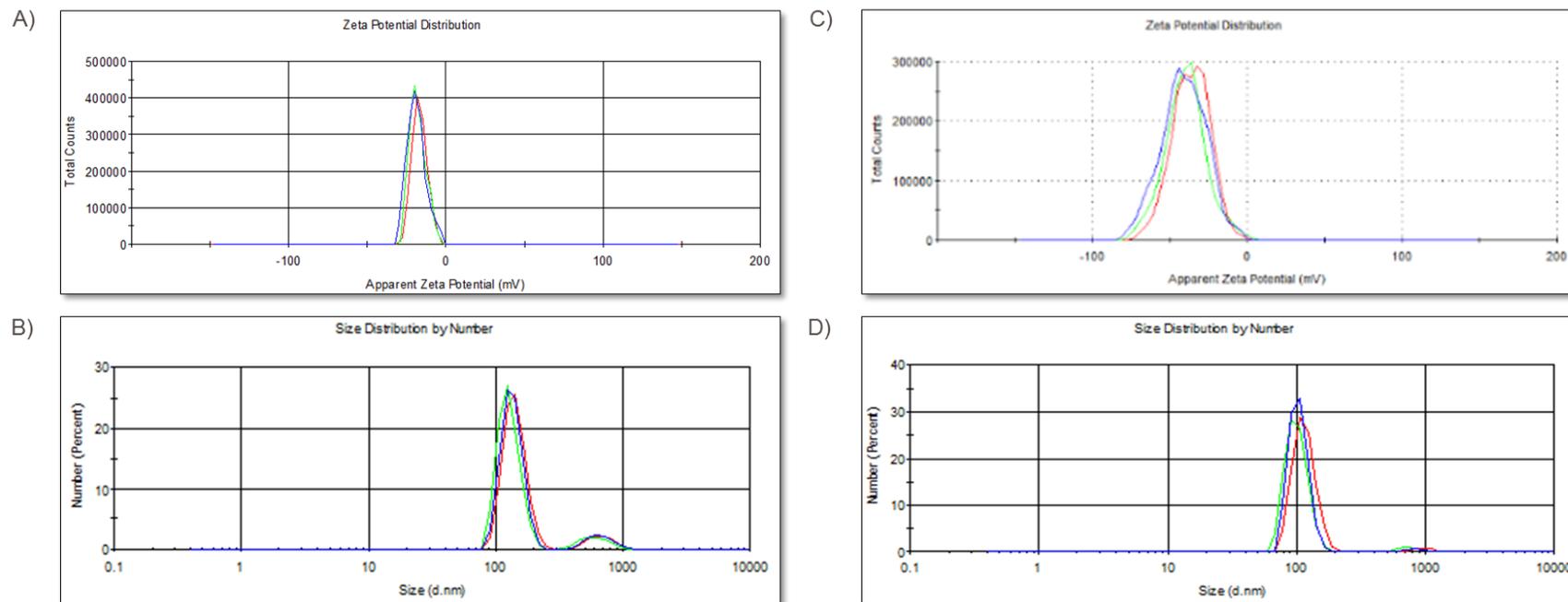


Figura 11 - Caracterização dos MLVs vazios e MLV-Ova por análise de potencial zeta e DLS. A carga superficial das vesículas lipídicas foi analisada em ensaio de potencial zeta e seu tamanho caracterizado por ensaio de DLS. **(A)** Potencial zeta dos MLV vazios, resultando em carga negativa de -16,7 mV. **(B)** Análise do tamanho das partículas dos MLV vazios. **(C)** Potencial zeta para os MLV-OVA (vesícula contendo OVA incorporada em sua porção hidrofílica). **(D)** Análise do tamanho das partículas dos MLV-OVA. Os resultados representados foram obtidos em ensaios realizados em triplicata.

Em seguida, avaliou-se a porcentagem de liberação da proteína OVA pelos MLVs (conforme descrito na metodologia) mantidos a 37 °C, 25 °C ou 4 °C. Em um ensaio preliminar, a massa de proteína incorporada e acoplada foi quantificada. Inicialmente 3 alíquotas dos MLV-OVA foram preparadas e incubadas nas temperaturas estudadas, partindo de aproximadamente 300 µg de OVA. Os resultados demonstraram a contínua liberação de proteínas nas temperaturas de 25 °C e 37 °C, sendo esta última a que proporcionou uma maior porcentagem de liberação. A 4 °C não se observou liberação de OVA.

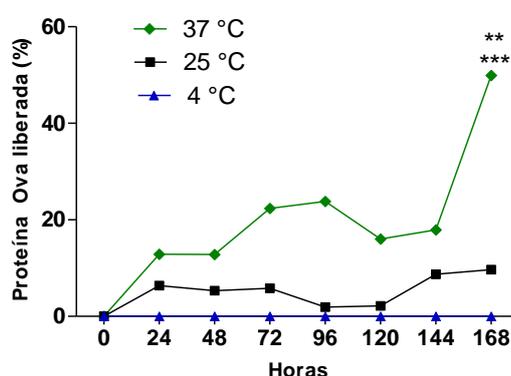


Figura 12 - Efeito de liberação da proteína incorporada nos MLV-Ova compostos pelos lipídeos DOPC:DPPC:LipA:DGS-NTA(Ni):CHOL. Três formulações do lipossoma contendo 500 µg da proteína OVA incorporada foram mantidas nas temperaturas de 37 °C, 25 °C e 4 °C. O sobrenadante das formulações foram quantificados diariamente por até 168 h, sendo o percentual de liberação proteica determinado de acordo ao descrito em Materiais e Métodos. *** indica $p < 0,001$, em comparação a temperatura de 4 °C, ** indica $p < 0,01$, em comparação a temperatura de 25 °C. (One-way ANOVA com pos-teste Bonferroni's). Os valores foram obtidos a partir de um único ensaio.

4.4 Avaliação da produção de anticorpos IgG sérico específico anti-OVA

A proteína OVA e os MLV-OVA demonstraram-se imunogênicas em camundongos. Camundongos fêmeas da linhagem Balb/C foram imunizadas com 3 doses, por via subcutânea, e amostras dos sangues foram coletadas para avaliação da cinética de dose-resposta de anticorpos IgG específicos anti-OVA séricos (Figura 13-A). Como controle negativo da imunização utilizou-se amostras de lipossoma vazio. Os maiores títulos foram observados 14 dias após a administração das doses. A análise dos títulos obtidos após segunda e terceira dose demonstrou uma diferença significativa em relação aos resultados obtidos para primeira dose. Os maiores títulos de IgG foram obtidos no grupo imunizado com os MLV-OVA na segunda dose, com diferença significativa em relação aos títulos obtidos após a segunda dose dos animais

imunizados apenas com a proteína (Figura 13-B). A longevidade da resposta de anticorpos anti-OVA também foi avaliada. Para isso, realizou-se a coleta de soro com 60, 90 e 105 dias após a última dose. Os animais receberam uma dose reforço com a proteína 91 dias após última dose. Os grupos experimentais apresentaram diferença significativa nos títulos de anticorpos presente nos soros após a reexposição ao antígeno OVA (soro de 105 dias) em relação aos títulos anteriores. Porém, novamente o grupo imunizado com os MLV-OVA apresentou aumento significativo em relação ao grupo imunizado apenas com a proteína (Figura 13-C). Os resultados demonstraram a eficiência deste sistema de entrega de antígeno na potencialização da resposta humoral gerada pela formulação vacinal neste modelo.

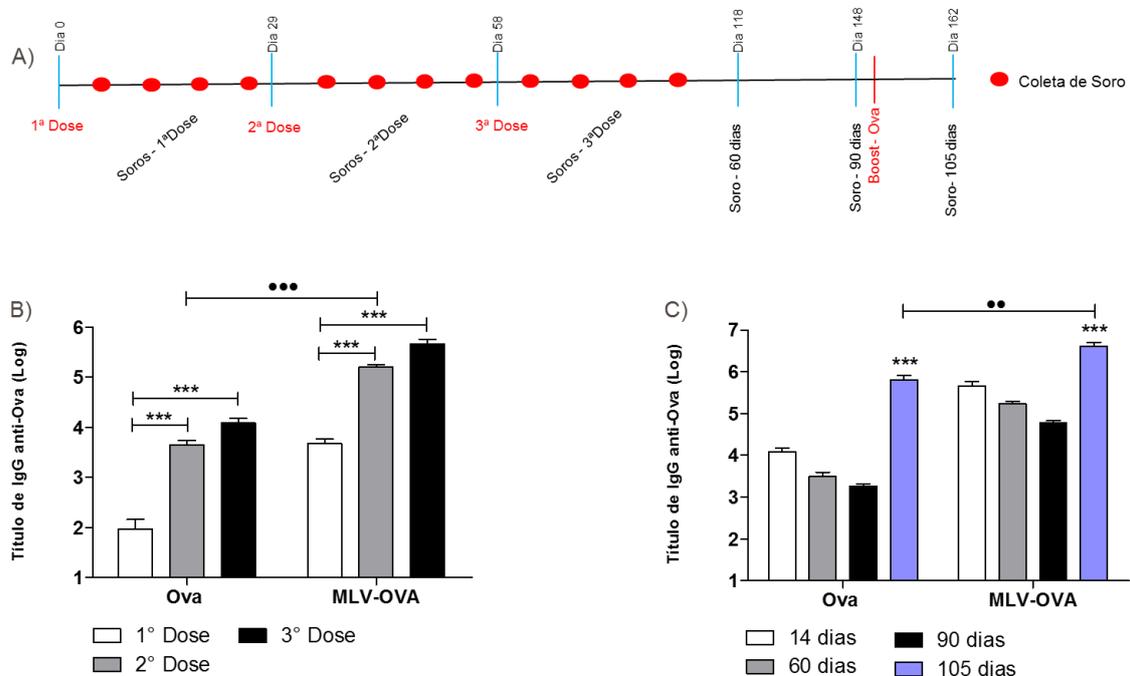


Figura 13 - Análise da cinética de dose-resposta de anticorpos IgG séricos OVA-específicos induzidos após imunização. Camundongos da linhagem Balb/c fêmeas (n=5/grupo) foram imunizadas com 3 doses por via subcutânea com a proteína OVA sozinha (25 µg), MLV-OVA (25 µg) ou apenas os MLVs vazios. Os animais foram reexpostos ao antígeno OVA (25 µg) 91 dias após a última dose. **(A)** Representação esquemática do protocolo de vacinação. **(B)** Títulos de anticorpos IgG específicos anti-OVA encontrados nos soros dos animais imunizados 14 dias após cada dose, analisados por ELISA. Os valores representam a média ± erro padrão dos títulos de anticorpos. *** p < 0,001 (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's). **(C)** Títulos de anticorpos IgG sérico anti-OVA dos animais imunizados mensurados nos dias 60, 90 e 105 após última dose. Os valores representam a média ± erro padrão dos títulos de anticorpos. *** p < 0,001 em relação aos dias 14, 60 e 90, (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's). ** p < 0,01; • p < 0,05 na análise entre os grupos OVA e MLV (Test T). Os títulos obtidos no grupo controle (Lipossoma vazio) foram subtraídos dos títulos obtidos nos grupos experimentais (MÉDIA+2XDP). As barras foram determinadas a partir da média dos títulos calculados individualmente em duplicata de um único experimento.

4.5 Caracterização físico-química dos MLV-rStx2B

Após a confirmação da eficiência do sistema de entrega com a proteína OVA, deu-se continuidade ao trabalho, com os MLVs formadas com a proteína recombinante rStx2B. Determinou-se o tamanho e polidispersão das partículas formadas ao fim do preparo da formulação por ensaio de DLS. Uma amostra de filme lipídico foi ressuspensa com 500 µg da proteína rStx2B (tampão fosfato de sódio 20 mM, 50 mM NaCl, 20% glicerol, pH 7,2). Ao fim do protocolo de preparo, obteve-se 92,6% de incorporação e acoplamento da proteína nos MLVs. O ensaio de DLS demonstrou que cerca de 97,4% das partículas apresentaram tamanho de 115 nm, indicando sua baixa polidispersão, com carga superficial de -14,4 mV, carga esta, esperada para uma vesícula com lipídio aniônico (DPPG) em sua composição.

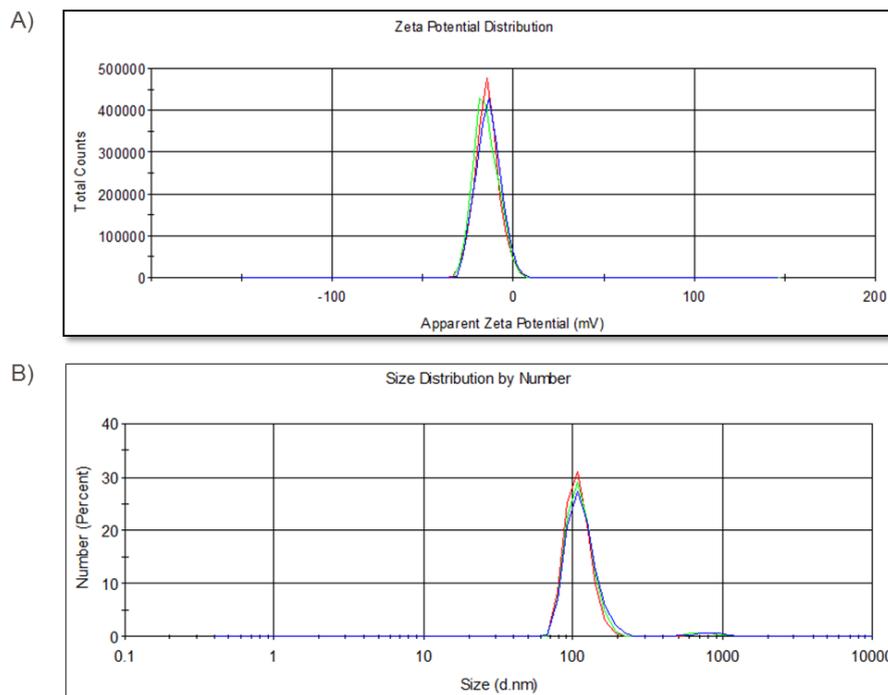


Figura 14 - Caracterização dos MLV-rStx2B por análise de potencial zeta e DLS. (A) Potencial zeta do MLV-RStx2B. **(B)** Análise do tamanho das partículas por DLS. Valores resultantes de leitura realizada em triplicata de uma amostra.

4.6 Análise do potencial citotóxico de rStx2B e MLV-rStx2B *in vitro*

Afim de determinar a segurança da formulação composta pelos MLV-rStx2B, incubou-se o correspondente a 6 ng da toxina Stx2 e proporções equimolares da proteína recombinante rStx2B e dos MLV-rStx2B sob monocamada formada por células VERO. O ensaio revelou a ausência do efeito citotóxico às células, que se

mantiveram semelhantes ao controle negativo (apenas células) e diferentes ao controle positivo (células incubadas com a toxina nativa Stx2) (Figura 15-A, B, C e D).

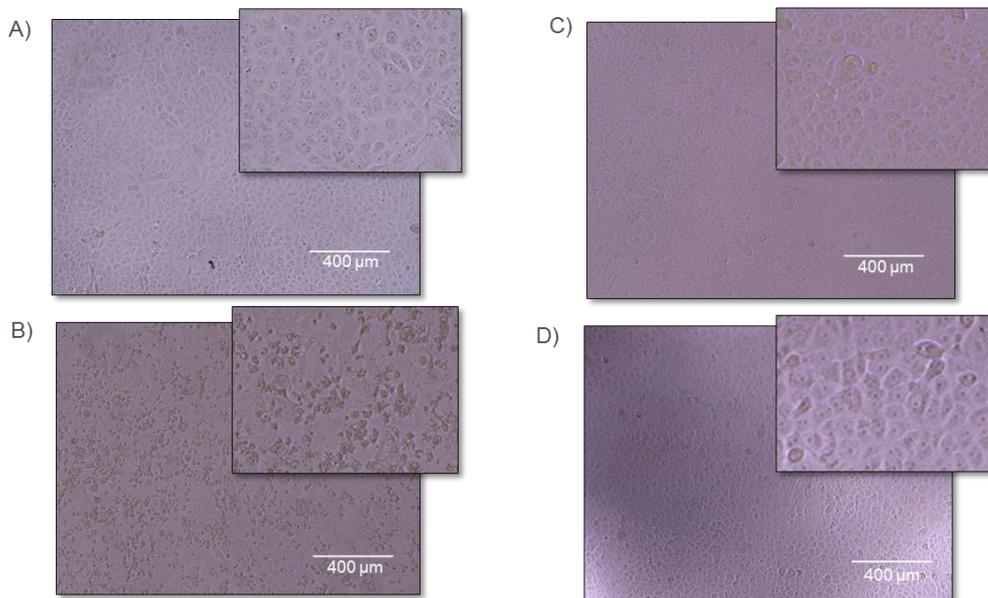


Figura 15 - Avaliação da toxicidade da proteína recombinante rStx2B e dos MLV-rStx2B *in vitro*. O potencial citotóxico da proteína recombinante rStx2B e dos MLV-rStx2B foi avaliado em ensaio empregando células VERO. Proporções equimolares das proteínas foram utilizadas no ensaio. Após incubação por 48 horas em estufa de CO₂, as culturas foram analisadas por microscopia. **(A)** Controle negativo, células incubadas apenas em meio MEM. **(B)** Controle positivo, células incubadas com a toxina Stx2. **(C)** Células incubadas com a proteína recombinante rStx2B. **(D)** Células incubadas com os MLV-rStx2B. Imagens correspondentes a maior concentração da toxina Stx2 utilizada no ensaio.

4.7 Avaliação da produção de anticorpos IgG sérico específico anti-rStx2B

Após a confirmação do potencial carreador e adjuvante do sistema de entrega (baseado nos MLVs), assim como da ausência de citotoxicidade da formulação, realizou-se uma imunização para análise da cinética de resposta da produção de anticorpos IgG anti-rStx2B. Para isso, camundongos fêmeas da linhagem Balb/c foram imunizados com 3 doses, por via subcutânea, da proteína recombinante rStx2B e os MLV-rStx2B. Como controle negativo da imunização utilizou-se os MLVs vazios. Os maiores títulos foram observados com 14 dias após a administração da segunda e 21 dias após a terceira dose. A primeira dose induziu baixos títulos, os quais se mantiveram abaixo de dez nos dias 21 e 28, para os dois grupos experimentais, não resultando em diferenças significativas entre eles (Dados não mostrados). A partir da segunda dose, foi possível observar uma significativa diferença entre os dois grupos experimentais. A terceira dose aumentou ainda mais

os títulos de anticorpos e confirma o efeito adjuvante gerado pela incorporação das proteínas aos lipossomas (Figura 16-A e B).

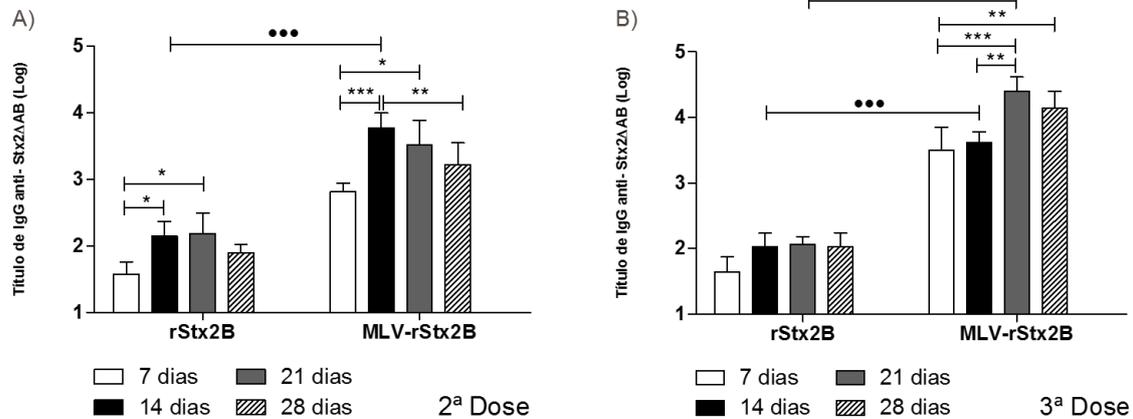


Figura 16 - Análise da cinética de dose-resposta de anticorpos IgG sérico rStx2B-específicos induzida após imunização. Camundongos da linhagem Balb/c fêmeas (n=5/grupo) foram imunizadas com 3 doses por via subcutânea com formulações vacinais contendo a rStx2B (25 µg), os MLV-rStx2B (25 µg) ou MLVs vazios. (A e B) Títulos de anticorpos IgG sérico anti-rStx2B mensurados nos animais imunizados correspondente aos dias 7, 14, 21 e 28 após a administração da segunda e terceira dose. Os valores dos títulos observados no grupo controle (apenas lipossoma) foram subtraídos dos títulos obtidos nos grupos experimentais (MÉDIA + 2 DP). Os valores apresentados nos gráficos representam a média ± erro padrão dos títulos de anticorpos. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001. (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's). *** p < 0,001, na análise entre os grupos Ova e MLV (Test T). Resultados baseados em um único ensaio com amostras individuais medidas em duplicata.

O grupo imunizado apenas com a proteína rStx2B não apresentou diferenças significativas entre as 3 doses administradas. Por outro lado, o grupo imunizado com os MLV-rStx2B apresentou significativa diferenças entre a primeira e as doses subsequentes. Na análise entre os grupos, a segunda e terceira dose demonstraram diferenças significativas quando comparadas a segunda e terceira dos títulos obtidos no grupo imunizados apenas com a proteína rStx2B (Figura 17-A). Estes resultados demonstram o efeito adjuvante promovido pelos MLVs carregados com rStx2B em camundongos.

As subclasses de anticorpos IgG, IgG1 e IgG2a também foram analisadas no soro de 14 dias após a terceira dose. Títulos de IgG1 e IgG2a foram observados em ambos os grupos, contudo, apenas os animais do grupo imunizado com os MLV-rStx2B obtiveram títulos acima de dez. Um perfil misto de subclasses foi produzido, com maiores títulos para IgG1, resultando em uma diferença significativa para IgG2a (Figura 17-B).

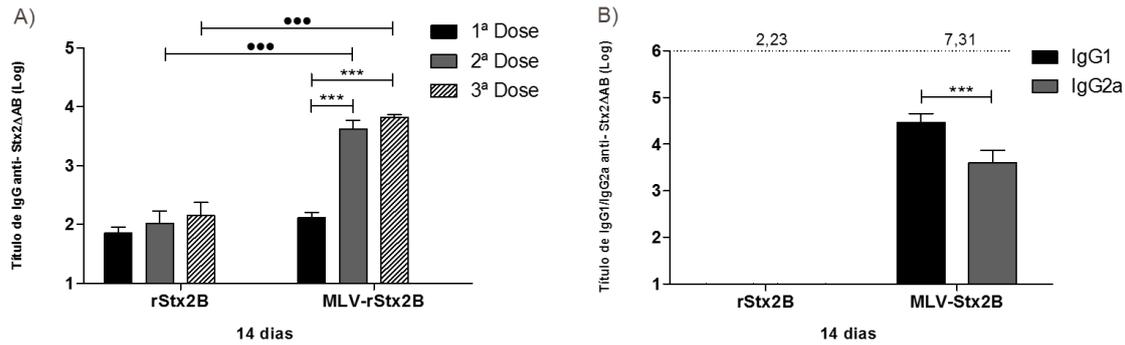


Figura 17 - Análise do perfil de subclasses de anticorpos IgG rStx2B-específicos induzidos nos animais imunizados. (A) Títulos de IgG sérico anti-rStx2B mensurados 14 dias após a administração da 1ª, 2ª e 3ª dose vacinal. **(B)** Títulos das subclasses de IgG (IgG1 e IgG2a). A razão entre os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a estão indicados na parte superior do gráfico. As barras representam à média \pm erro do título de subclasses de anticorpos IgG dos animais imunizados ($n=5$ /grupo). Os valores dos títulos de subclasses observados no grupo controle (apenas lipossoma) foram subtraídos dos títulos obtidos nos grupos rStx2B e MLV-rStx2B (MÉDIA + 2DP). Os valores representam a média \pm erro padrão dos títulos de anticorpos. *** $p < 0,0001$. (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's). *** $p < 0,001$ (Test T). Resultados baseados em um único ensaio com amostras individuais medidas em duplicata.

Na análise da longevidade da resposta de IgG específico anti-rStx2B observou-se diferenças significativas entre os grupos experimentais, tendo o grupo imunizado com os MLV-rStx2B apresentado os maiores títulos. Não houve diferenças significativas entre os resultados observados com soros de 14, 60, 90 e 105 dias de cada grupo (Figura 18-A). Os títulos das subclasses de IgG, IgG1 e IgG2a também foram dosados nos soros. Estes, permaneceram semelhantes ao longo do período analisado no grupo imunizado com os MLV-rStx2B. No entanto, no grupo imunizado apenas com a proteína rStx2B pode-se observar um aumento nos títulos, sendo este melhor evidenciado no soro coletado 105 dias após a última dose e reexposto à proteína. Em ambos os grupos os maiores títulos foram observados para IgG1. Apenas no soro coletado após 105 dias, não se observou uma diferença significativa entre as duas subclasses analisadas no grupo que recebeu os MLV-rStx2B. Os maiores títulos foram obtidos no grupo que receberam os MLV-rStx2B (Figura 18-B, C e D).

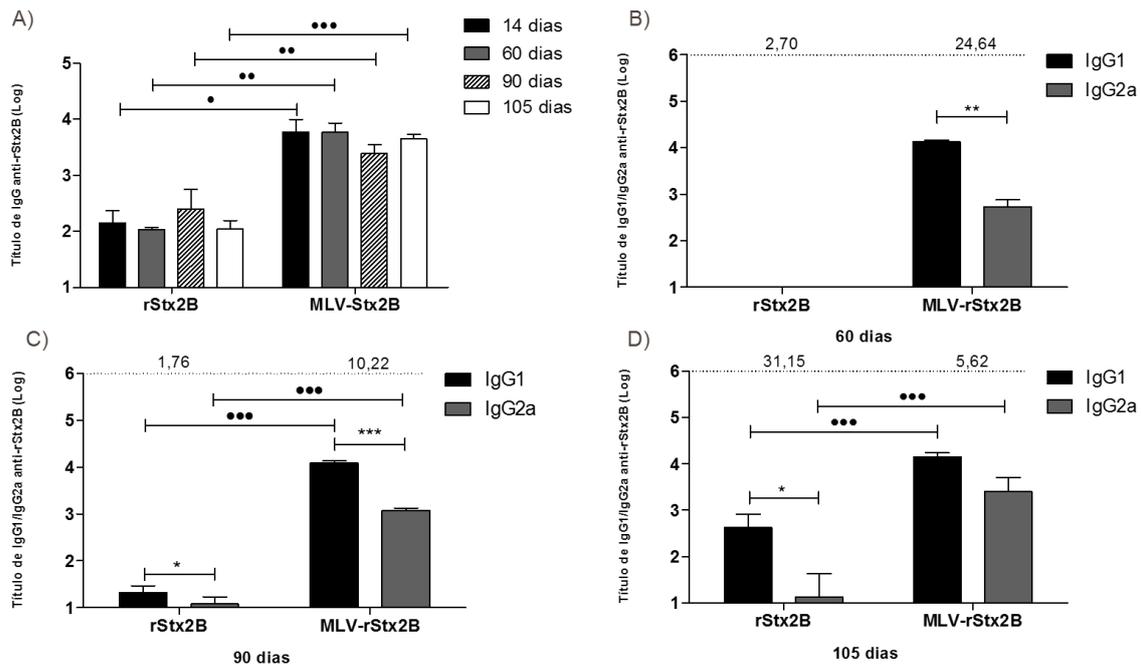


Figura 18 - Longevidade da resposta de anticorpos IgG anti-rStx2B nos animais imunizados. Os soros obtidos com 60, 90 e 105 dias após imunização foram analisados em ensaio de ELISA para determinação dos títulos de IgG total e subclasses. Noventa e um dias após a última dose vacinal os camundongos foram re-estimulados com 25 µg da proteína rStx2B. **(A)** Determinação dos títulos de IgG total anti-rStx2B por até 105 após vacinação. **(B, C e D)** Determinação dos títulos de subclasses de IgG, IgG1 e IgG2a específicos anti-rStx2B dos soros correspondentes a 60, 90 e 105 dias após última dose, conforme indicado na figura. As barras representam a média ± erro padrão do título de anticorpos IgG e subclasses dos animais imunizados (n=5/grupo). A razão entre os títulos de anticorpos IgG1 e IgG2a estão indicados na parte superior do gráfico. A média dos títulos de subclasses observados no grupo controle (MLVs vazios) foram subtraídos dos títulos obtidos nos grupos experimentais. Os valores representam a média ± erro dos títulos de anticorpos. *** p < 0,0001; ** p < 0,01; * p < 0,05 (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's) *** p < 0,001; ** p < 0,01; • p < 0,05 (Test T). Resultados baseados em um único ensaio com amostras individuais medidas em duplicata.

4.8 Determinação da afinidade dos anticorpos IgG específicos anti-rStx2B gerados na imunização com os MLV-rStx2B

Analizamos a avidéz dos anticorpos anti-rStx2B em relação à ligação ao antígeno recombinante, por meio de ensaio de ELISA e em diferentes concentrações de tiocianato de amônio, usado como agente dissociante (91). Nesta análise empregamos as amostras de soros colhidos dos animais imunizados com os MLVs, pois foram aqueles que apresentaram os títulos adequados ao ensaio. Uma redução da afinidade foi observada nos soros de 90 dias, que tornou a aumentar após a reexposição dos animais ao antígeno no dia 91 após última dose, confirmado pela significativa diferença de afinidade entre os soros de 90 e 105 dias nas diluições de 0,4 M a 1,0 M de tiocianato (Figura 19 A-B).

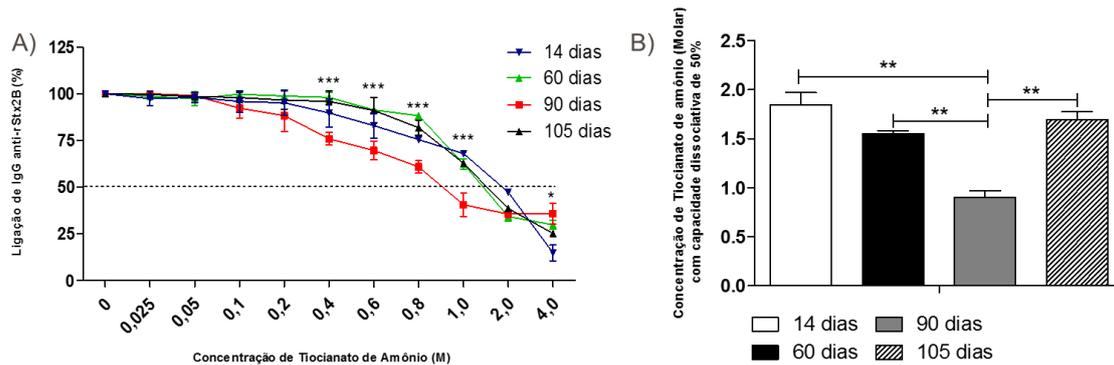


Figura 19 - Avaliação da afinidade dos anticorpos IgG anti-rStx2B. (A) A afinidade dos anticorpos gerados no grupo imunizado com os MLV-rStx2B, obtidos nos dias 14, 60, 90 e 105 após última dose, foi analisada em ensaio de Elisa por dissociação com tiocianato de amônio (conforme descrito em Materiais e Métodos). (B) Representação em barras das concentrações molares de tiocianato necessárias para 50% de dissociação dos anticorpos ligados. Os valores representam a média \pm erro de um ensaio realizado em duplicata. Os valores representam a média \pm erro de um ensaio realizado em duplicata. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's). A análise é referente aos soros de 90 e 105 dias. ** $p < 0,01$; (One-way ANOVA com pos-test Bonferroni's). A análise é referente aos soros de 14, 60, 90 e 105 dias.

4.9 Determinação da dose citotóxica de Stx2 nativa (DC_{50}) e ensaio de soroneutralização *in vitro* com anticorpos gerados em animais imunizados com rStx2B e MLV-rStx2B

Para a continuidade dos experimentos *in vitro*, foi necessário definir a dose de Stx2 nativa requerida para ocasionar o efeito citotóxico em 50% das células. O ensaio demonstrou que 50% das células se mantiverem viáveis diante da concentração de 15 ng/mL de Stx2 (750 pg/poço), a concentração utilizada para os ensaios posteriores (Figura 20-A). Como um correlato de proteção para uma vacina baseada em proteína anti-Stx2, um ensaio de neutralização em células VERO foi realizado com o soro colhido 14 dias após a última dose dos animais imunizados com a proteína rStx2B ou com os MLV-rStx2B e a Stx2. Os anticorpos presentes no soro dos animais imunizados com os MLV-rStx2B demonstraram um maior efeito neutralizante em comparação ao efeito observado nos soros dos animais imunizados apenas com a proteína, resultado em diferenças significativas entre ambos, até a diluição 1:640 dos soros (Figura 20-B). Os soros obtidos 60, 90 e 105 dias após última dose, também foram analisados. Ao longo do tempo de coleta, a capacidade de neutralização da toxina pelos soros dos animais imunizados com os MLV-rStx2B foi reduzida, com retomada da capacidade de neutralização após reexposição ao antígeno (soro 105 dias), porém ainda assim, superior aos resultados obtidos com o soro dos animais imunizados apenas com a proteína. O efeito neutralizante do soro

dos animais imunizados apenas com a proteína rStx2B também demonstrou mesmo efeito observado com os MLV-rStx2B, observado na análise dos soros de 60, 90 e 105 dias (Figura 20-C, D e E).

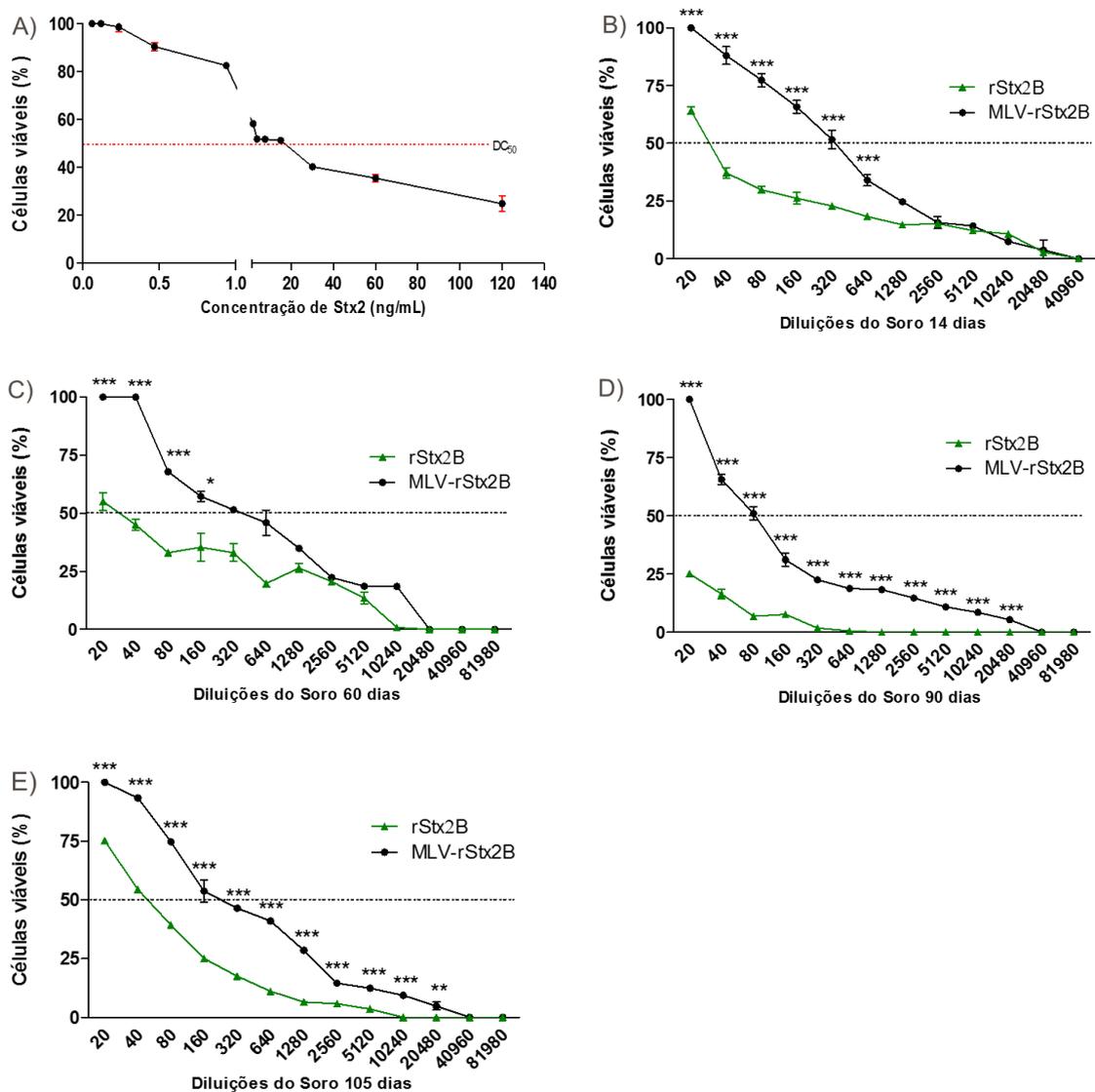


Figura 20 - Determinação da dose citotóxica média (DC₅₀) da toxina nativa Stx2 *in vitro* e atividade neutralizante sobre a Stx2 nativa do soro anti-rStx2B. (A) O efeito citotóxico da toxina nativa Stx2 foi avaliado em cultura de célula VERO com diferentes concentrações da Stx2 para definição da DC₅₀. A dose de toxina necessária para se obter 50% de efeito citotóxico foi determinada de acordo ao descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam a média \pm erro padrão de um ensaio realizado em duplicata. **(B)** Ensaio de soroneutralização com os soros obtidos 14 dias após a administração da última dose vacinal. **(C, D, E)** Ensaio de soroneutralização com os soros coletados com 60, 90 e 105 dias após a administração da última dose vacinal. Para estes ensaios, diferentes diluições dos soros imunes foram pré-adsorvidos com 1 DC₅₀ de Stx2 nativa e, posteriormente, incubados com monocamadas de células VERO (detalhado em materiais e métodos). Os valores representam a média \pm erro padrão de dois ensaios realizados em duplicata. *** $p < 0,001$. (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.10 Avaliação da produção de anticorpos IgG sérico específico anti-rStx2B em uma segunda imunização

Após a análise dos títulos de anticorpos de IgG totais e subclasses obtidos através da imunização para definição da cinética de dose-resposta nos camundongos imunizados com a proteína rStx2B e os MLV-rStx2B, foi possível determinar um regime vacinal eficiente para a indução de uma resposta imunológica humoral. Uma nova imunização foi realizada, contendo 3 doses, por via subcutânea e intervalo de 14 dias entre a administração das doses. Um dia antes de cada dose os soros dos animais foram coletados para dosagem dos títulos de IgG total e subclasses e 21 dias após a última dose os animais foram desafiados via endovenosa com a toxina Stx2 nativa (Figura 21-A). Esta nova imunização contou com a inserção de um novo grupo experimental, este contendo a proteína rStx2B administrada junto ao lipídio A monofosforilado (rStx2B-LipA). Na análise dos títulos obtidos após cada uma das doses vacinais administradas, os do grupo imunizado com os MLV-rStx2B demonstraram-se superiores aos outros grupos experimentais estudados, apresentando diferenças entre si a cada dose administrada e em relação a terceira dose dos outros dois grupos experimentais (Figura 21-B). No ensaio para analisar as subclasses de IgG, assim como na primeira imunização, os títulos obtidos para IgG1 e IgG2a do soro após terceira dose no grupo imunizado com os MLV, se apresentaram superiores aos demais grupos experimentais, tendo o IgG1 apresentado título superior a IgG2a (Figura 21-C), fornecendo um indicativo do tipo de resposta modulado pelos MLVs.

Os soros obtidos após a terceira dose de cada grupo foi utilizado em ensaio de soroneutralização com a toxina Stx2 (DC_{50}). Os anticorpos presentes no soro do grupo imunizado como os MLV-rStx2B, demonstraram efeito neutralizante superior ao grupo imunizado apenas com a proteína. Em análise comparativa dos dados obtidos dos grupos imunizados com os MLV-rStx2B e a proteína associada ao lipídio A, não apresentaram diferenças significativas apenas nas diluições 1:60, 1:20480 e 1:40960. (Figura 21-D). Estes resultados em conjunto demonstraram a eficiência deste sistema de entrega de antígenos e seu potencial adjuvante, além da necessidade da presença do lipídio A na composição dos MLVs, e não apenas administrado junto ao antígeno.

Analisamos a avidéz dos anticorpos anti-rStx2B, gerados nesta segunda imunização, em relação à ligação ao antígeno recombinante, por meio de ensaio de ELISA e em diferentes concentrações de tiocianato de amônio. Assim como, na primeira imunização, empregamos as amostras de soros colhidos dos animais imunizados com os MLV-rStx2B, pois foram aqueles que apresentaram os títulos adequados ao ensaio. Os anticorpos presentes na amostra de soro de 14 dias necessitaram de uma concentração de 1,822 M de tiocianato para a dissociação de 50% dos anticorpos ligados ao antígeno (dados não mostrados), próximo ao observado no soro de 14 dias da primeira imunização.

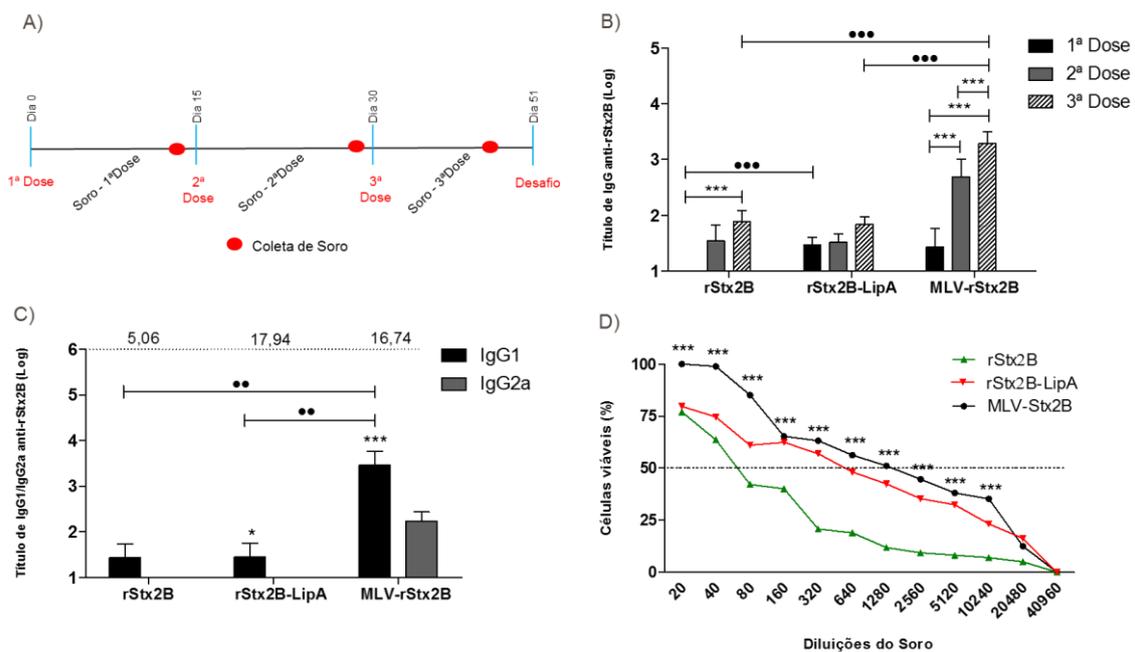


Figura 21 - Análise da resposta humoral específica anti-rStx2B e capacidade de neutralização da toxina Stx2 dos soros obtidos em uma segunda imunização. (A) Camundongos Balb/c fêmeas (n=10/grupo) foram imunizadas com 3 doses, por via subcutânea de rStx2B (25 µg), rStx2B-Lipídio A (25 µg-50 ng/animal), MLV-rStx2B (25 µg) e MLVs vazios (volume igual ao utilizado para preparo dos MLVs). Os animais foram desafiados com a toxina Stx2 nativa via intravenoso 21 dias após última dose (n=10 animais/grupo). (B e C) Determinação dos títulos de IgG específico anti-rStx2B total e subclasses dos soros de 14 dias após cada dose. Na análise de subclasses, IgG1 e IgG2a foram detectados. Como controle negativo utilizou-se os MLV vazios e a média dos títulos obtidos descontado da média dos grupos restantes. As barras foram determinadas a partir da média dos títulos calculados individualmente em duplicata. Os valores representam a média ± erro de um ensaio realizado em duplicata. ***p < 0,001; *p < 0,05 (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's). *** p < 0,001; ** p < 0,01 (Test T). (D) Títulos neutralizantes contra Stx2. Os soros de 14 dias após última dose dos animais imunizados em diferentes diluições, foram incubados *in vitro* com 1 DC₅₀ de Stx2 nativa e adicionados sob as células VERO (detalhado em materiais e métodos). Os valores representam a média de um ensaio com medidas feitas em duplicata. *** p < 0,001. (Two-way ANOVA com pos-test Bonferroni's).

4.11 Imunidade protetora conferida aos animais imunizados com rStx2B

Os animais que receberam as formulações vacinais foram desafiados com a toxina Stx2 nativa por via endovenosa. Para isto, foi necessária a determinação da

dose letal para 100% dos animais (DL_{100}). Camundongos Balb/c, fêmeas de 6 a 8 semanas foram inoculadas com diferentes concentrações da toxina via endovenosa (plexo retro-orbital) e acompanhadas por 7 dias. Apenas os animais que receberam a partir de 3 ng da toxina não sobreviveram. Diante deste resultado, estipulou-se a dose de 3 ng/animal para o ensaio desafio dos animais imunizados com as formulações vacinais testadas (Figura 22-A).

Os animais dos grupos experimentais que receberam o antígeno assim como o grupo controle (apenas os MLVs vazios), foram desafiados no vigésimo primeiro dia após a administração da última dose, por via endovenosa (plexo retro-orbital), com 3 ng da toxina Stx2 nativa e acompanhados por uma semana. Dos animais vacinados com a formulação composta pelos MLV-rStx2B, 60% ficaram protegidos do desafio letal com a toxina nativa. Nas mesmas condições experimentais no terceiro dia após a inoculação da toxina, nenhum animal dos grupos imunizados apenas com a proteína rStx2B, rStx2B junto ao lipídio A e a MLV vazia sobreviveram ao desafio com a dose letal de Stx2 nativa.

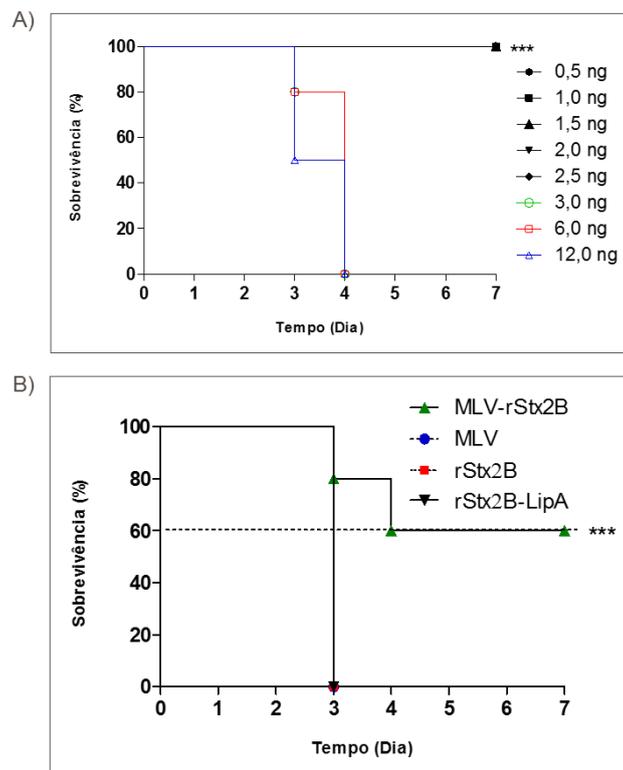


Figura 22 - Determinação da DL_{100} e proteção dos camundongos imunizados contra atividade tóxica da Stx2 nativa. (A) Determinação da DL_{100} com diferentes concentrações da toxina nativa Stx2. Inoculou-se Stx2 em camundongos Balb/c fêmeas ($n=3$ animais/concentração) via intravenosa (plexo retro-orbital), concentrações de 0,5 ng a 12 ng por animal, acompanhando-os por 7 dias. A partir de 3 ng observou-se a morte de todos os animais do grupo. (B) Neutralização *in vivo* da toxicidade de Stx2. Camundongos imunizados com rStx2B, rStx2B-lipídioA, MLV-rStx2B e MLV vazia, foram desafiados com 1 DL_{100} , 21 dias após última dose ($n=10$ animais/grupo). *** $p<0,001$ (Teste de Mantel-Cox).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho buscou-se avaliar, em condições experimentais, o desempenho de uma formulação vacinal baseada em proteínas recombinantes derivadas da toxina Stx2 de STEC, incorporadas em lipossomas multilamelares (MLVs). Com essas formulações buscou-se a indução de resposta imunológica humoral antígeno específica e com capacidade de neutralizar a toxina Stx2 nativa, após a inoculação de camundongos por via subcutânea, sem a promoção de efeitos adversos. Os antígenos escolhidos para compor as formulações, as proteínas recombinantes Stx2B e Stx2 Δ AB, correspondem à subunidade B e à subunidade B acrescida da porção A₂ da subunidade A, respectivamente. Para obtenção desses antígenos recombinantes seguiu-se procedimentos padronizados em trabalhos anteriores realizados pelo grupo. No entanto, após diversas tentativas e procedimentos testados, as proteínas obtidas geraram agregados proteicos que inviabilizariam a incorporação nos MLVs. Ao final de várias tentativas, apenas a proteína Stx2 Δ AB foi obtida na forma de monômero da subunidade B. Desta forma, optamos por utilizar a proteína recombinante obtida, que corresponde ao monômero da subunidade B da toxina Stx2, que denominamos rStx2B nos testes de incorporação em MLVs e de imunização.

Os resultados obtidos revelaram a geração de resposta de anticorpos séricos antígeno-específica, acompanhada de modulação do perfil de subclasses de IgG, aumento da afinidade dos anticorpos ao antígeno alvo, capacidade de neutralização da toxina *in vitro* e indução de proteção parcial, mas superior ao obtidos em animais imunizados apenas com a proteína, a desafio com dose letal de Stx2. Além disso, demonstramos a ausência de efeitos deletérios associados às formulações vacinais. Desta forma, o conjunto dos resultados obtidos neste trabalho demonstrou, de forma inédita, que a combinação de lipídios e adjuvante empregada (DOPC, DPPG, DGS-NTA (Ni), lipídio A e colesterol em combinação com a proteína recombinante rStx2B, incorporada no interior dos lipossomas e acoplada em seu exterior, representa uma estratégia vacinal promissora, e segura, para a prevenção da SHU associada à produção de Stx2 por linhagens de EHEC.

As proteínas Stx2 Δ AB e Stx2B, propostas como antígenos neste trabalho, foram expressas em modelo procarioto (*E. coli*) e concentraram-se na fração solúvel do extrato bacteriano. Ambas foram purificadas e apresentaram-se na forma de agregados proteicos. Diferentes fatores, como: interações hidrofóbicas, iônicas, com íons metálicos, pontes de sulfeto, pontes de hidrogênio, baixo pH, altas temperaturas, modificações pós-traducionais e estresse oxidativo, podem levar à agregação proteica durante a expressão da proteína e sua subsequente purificação, armazenamento e manipulação (92,93). A superexpressão de proteínas heterólogas em *E. coli* apresenta a desvantagem de, eventualmente, gerar corpúsculos de inclusão ou agregados. Esse fenômeno é influenciado por diversos fatores, como condições de cultivo e as propriedades físico-químicas da proteína alvo (94). A temperatura do cultivo bacteriano influencia o metabolismo celular exercendo ação sobre macromoléculas, como proteínas, que podem perder sua funcionalidade. Na tentativa de superar a formação de agregados proteicos foram testadas duas estratégias experimentais para obtenção da proteína: a expressão em temperatura reduzida e a extração da proteína a partir do material citoplasmático e do periplasma. No entanto, nenhuma das condições testadas mostrou-se adequada para as linhagens de *E.coli*-DEIIIStx2B e *E.coli*-pLysSStx2 Δ AB.

A estabilidade proteica pode ser afetada por alterações estruturais ocorridas durante a expressão heteróloga, mas compostos iônicos, como alguns sais, podem contribuir para a manutenção da conformação nativa e, conseqüentemente, a estabilidade de proteínas. Alguns íons interagem com proteínas por interações eletrostáticas não específicas, o que leva à neutralização de cargas elétricas, aumento da interação com moléculas de água, o que favorece a sua estabilidade. Contudo, sais que se ligam fortemente a proteínas tendem a diminuir sua interação com as moléculas de água, levando à sua desestabilização (95). A extração do material periplasmático na presença de 50 mM de NaCl, influenciou positivamente na estabilidade da proteína Stx2 Δ AB expressa pela linhagem de *E.coli*-pLysS, diminuindo as interações proteicas, mas a proteína foi obtida na forma monomérica. Para a proteína Stx2B, expressa na linhagem *E.coli*-DEIII, os procedimentos testados não foram suficientes para desfazer os agregados proteicos. Como as mesmas condições foram aplicadas para as duas proteínas, que diferem apenas na presença da subunidade A₂ (Stx2 Δ AB), não foram esclarecidos os motivos dos resultados

discrepantes encontrados. Diante deste fato, optamos por não dar continuidade à obtenção da proteína Stx2B, proteína que seria utilizada para analisarmos a influência da porção A₂ na resposta imunológica gerada.

A montagem da toxina Stx2 em linhagens de *E. coli*, ocorre no periplasma bacteriano. Após a tradução das duas subunidades no citoplasma, as subunidades A e B são direcionadas para o periplasma. Essa movimentação ocorre pela presença de um peptídeo sinal na região N-terminal da sequência de nucleotídeos codificador para cada subunidade. Após a formação do anel pentamérico, a subunidade A é ancorada pela porção A₂ na subunidade B responsável pela ligação em receptores Gb₃ (69,96). As sequências codificadoras da proteína Stx2ΔAB são traduzidas separadamente, mas a cauda de histidina, utilizada no processo de purificação, se encontra apenas na porção C-terminal da sequência codificadora para a subunidade B (70). A análise das sequências codificadoras para a porção A₂ (32 a.a.) e a subunidade B (89 a.a.), demonstram que, sem a formação do pentâmero, a porção A₂ não se associa à subunidade B. De fato, nossos dados confirmaram a ausência do fragmento A₂ no monômero de Stx2B. No entanto, decidimos dar prosseguimento ao trabalho, e a proteína recombinante foi denominada rStx2B.

A fim de otimizarmos o rendimento no processo de obtenção da proteína recombinante rStx2B, testamos a expressão de rStx2B na linhagem de *E. coli* Arctic Express uma vez que o rendimento final obtido com outras linhagens mostrou-se insuficiente para os experimentos a serem feitos. Os resultados obtidos demonstraram que houve aumento expressivo no rendimento final da proteína, mas a proteína continuou a ser expressa na forma monomérica. Esse resultado confirma observações da literatura em que a estabilidade do pentâmero mostra-se dependente de uma concentração de monômeros no periplasma na ordem de 4 a 8 μM, o que aparentemente não foi alcançado mesmo com o emprego da linhagem *E. coli* Arctic (97,98). Neste caso, a ausência da subunidade A₂ poderia aumentar o limiar de concentração de monômeros necessário à formação de pentâmeros (70).

Apesar da não formação de pentâmeros, a proteína rStx2B foi capaz de ligar-se a receptores presentes em células de mamíferos. O monômero de Stx2B possui três sítios de ligação ao receptor Gb₃. O fato da proteína recombinante se ligar eficientemente a esse receptor indica que epítomos conformacionais e lineares presentes na subunidade B nativa foram preservados na forma monomérica. Tal

propriedade, em conjunto com a preservação da antigenicidade frente a anticorpos gerados contra a toxina nativa, demonstrou que o antígeno recombinante mantinha propriedades adequadas ao seu uso como antígeno vacinal.

Na segunda etapa do projeto, partimos para o preparo dos lipossomas multilamelares, os MLVs. As características físico-químicas dos lipossomas devem ser levadas em consideração, assim como sua composição lipídica e a presença de adjuvantes, quando se utiliza esse tipo de sistema de entrega para antígenos vacinais. Em particular, o tamanho das partículas influencia no tráfego, processamento e apresentação dos antígenos às APCs e influencia nas repostas imunológicas a serem obtidas com a formulação administrada (79–81,83).

Neste trabalho, utilizamos MLVs a partir de observações anteriores baseadas em trabalhos que utilizaram ICMVs (do inglês *inter bilayer-cross-linked multilamellar lipid vesicles*), cujas características físico-químicas levam à agregação das partículas, ocasionando o efeito de deposição no sítio de inoculação e liberação controlada do antígeno incorporado (99,100). Esse efeito resulta em maior atração de APCs ao local de inoculação e sua posterior ativação pela presença de adjuvantes incorporados à formulação (82,101).

O MLV utilizado no presente estudo foi desenvolvido com o intuito de ocasionar o efeito de deposição no sítio de inoculação. Para isto, foi incorporado o lipídio aniônico DPPG que permite a formação de ligações de hidrogênio em sua porção polar. O tamanho observado destas partículas também deve contribuir para esse efeito, uma vez que partículas de 70 a 170 nm exibem um nível de retenção intermediário em estudo que investigou vesículas compostas por diferentes lipídios aniônicos e neutros (102). O MLV empregado foi acrescida de lipídio A monofosforilado (MPL-Monophosphoryl Lipid A), um adjuvante vacinal licenciado para uso em humanos e amplamente utilizado em estratégias vacinais em estudos de fase clínica I, II e III e presente em duas vacinas licenciadas (76,103,104). Os MLV utilizados mostraram-se capazes de realizar o efeito de agregação, o que foi sugerido pela observação de um precipitado ao fim de seu preparo, resultando em partículas de 115 nm, que, sob agitação, se desfaziam (Figura 2).

Os MLVs obtidas foram inicialmente testadas quanto à capacidade de interação com a proteína OVA, empregada como proteína de referência. Os títulos de anticorpos de IgG OVA-específicos, obtidos nos animais imunizados com três doses dos MLV-OVA, assim como na análise da memória imunológica, foram

significativamente superiores aos títulos de anticorpos específicos gerados em animais que receberam apenas a proteína. Esses resultados confirmaram a eficiência do sistema na entrega de antígenos vacinais.

Sabe-se que vacinas baseadas em antígenos recombinantes podem possuir baixa imunogenicidade, o que indica a necessidade do uso de adjuvantes, capazes de potencializar as respostas imunológicas (105,106). A proteção imunológica contra infecções por linhagens de *E.coli* que expressam a Stx está correlacionada a altos níveis de anticorpos séricos com capacidade de diminuir ou neutralizar a ligação da toxina ao receptor (45). Neste contexto, algumas estratégias vacinais, utilizando como antígeno a subunidade B de Stx, fazem associação da proteína recombinante a adjuvantes em função da baixa imunogenicidade da proteína (107). Por exemplo, aumentos substanciais de títulos de anticorpos específicos são observados na presença do adjuvante completo ou incompleto de Freund's (CFA/IFA) (61–64). O adjuvante de Freund's é restrito a condições experimentais, sendo seu uso proibido em seres humanos. Esse fato demonstra a importância da busca por novos adjuvantes que possam ser utilizados em seres humanos. Assim, as vesículas lipídicas associadas ao lipídio A, surgem como uma alternativa segura para uso em diversas estratégias vacinais profiláticas ou terapêuticas (108–110). Nossos resultados demonstraram que a formulação vacinal contendo os MLV-rStx2B se mostrou segura, como avaliado pela ausência de efeito citotóxico em células VERO.

A imunização com a vacina composta pelos MLV-rStx2B desencadeou resposta de anticorpos IgG sérico rStx2B-específica que se mostrou estatisticamente maior que as respostas obtidas em animais que receberam apenas a proteína. Essa diferença foi evidenciada a partir segunda dose e se manteve até o último dia avaliado no ensaio para acompanhar a longevidade da resposta. Adicionalmente observamos que o lipídio A, quando apenas administrado junto à proteína não exerceu efeito imunoestimulador comparável, resultando em títulos de anticorpos específicos semelhantes aos observados em animais que receberam a proteína. Esse resultado indica que o potencial adjuvante da formulação está relacionado à combinação sinérgica do lipídio A com os MLVs e não apenas a uma ação aditiva de cada elemento. Os títulos obtidos nestas imunizações mostraram-se superiores aos encontrados em abordagens anteriores utilizando o antígeno Stx2 Δ AB, em vacina de DNA e em linhagem de *Salmonella* expressando o antígeno (42,70), o que confirma

a eficiência da formulação vacinal composta pelo antígeno rStx2B associado aos MLVs para a potencialização da resposta imune humoral contra a Stx2.

Uma resposta imune humoral ou celular é desencadeada após ativação de células T CD4⁺ naive pelas APCs, fazendo a mediação da resposta inata para adaptativa. A natureza do antígeno e adjuvante influenciam no perfil de resposta modulado, que pode ser do tipo 1 (Th1) ou tipo 2 (Th2) (111,112). Na administração por via subcutânea dos MLV-rStx2B títulos de IgG1 e IgG2a foram observados, indicando a indução de um perfil misto de resposta, mas esta, se mostrou mais polarizada para IgG1 específico rStx2B, sugerindo a ativação de um perfil de resposta do tipo Th2. Nossos resultados corroboram estudos prévios com a subunidade B de Stx e sobre o potencial adjuvante das vesículas lipídicas. Esses estudos demonstraram que a ativação das células dendríticas com esse antígeno promove a ativação de linfócitos T CD4⁺ que ao auxiliarem à maturação de linfócitos B, modulam a afinidade dos anticorpos antígenos-específicos, bem como os níveis e o perfil de subclasses das imunoglobulinas (68,79,80,96,113).

A subunidade B de Stx que medeia a ligação da toxina a receptores de membrana, surge como um importante alvo, tanto para estratégias profiláticas quanto terapêuticas. A ativação das APCs, como células dendríticas e linfócitos B por StxB resulta no aumento de respostas imunes antígeno específicas (96,114,115). Essa característica permite a utilização dessa proteína como carregador de diferentes antígenos. A StxB também é utilizada em estratégias de terapias anticâncer, em função de seu potencial atóxico e a capacidade de entrega e biodistribuição a APCs (116–118).

O controle dos sintomas associados à toxina Stx, está relacionado aos níveis de anticorpos séricos anti-Stx e afinidade e capacidade de neutralização da toxina (63,64). Nesse contexto, a utilização de anticorpos monoclonais direcionados à subunidade B de Stx2B demonstrou ser eficiente na atividade neutralizante da toxina Stx2 em ensaios *in vitro* e *in vivo* (46,48,119).

Como uma nova opção para diagnóstico e terapia para os primeiros sintomas associados à SHU, anticorpos produzidos em camelídeos, compostos pelo domínio variável da cadeia pesada contra a subunidade B de Stx2, foram gerados. Demonstrou-se que tais anticorpos são eficientes na inibição da ligação da toxina a receptores celulares e promovem a rápida eliminação da toxina. Mas sem induzir resposta de memória (49,120). Em nosso trabalho, os anticorpos obtidos nos animais

imunizados com os MLV-rStx2B, apresentaram diminuição na avidéz da ligação ao antígeno ao longo dos dias analisados, com uma retomada após a reexposição ao antígeno no ensaio *in vitro*. O mesmo resultado foi observado com anticorpos obtidos após imunização com a rStx2B ao longo dos dias analisados. Estes resultados confirmam a dependência dos níveis de anticorpos para eficiência na afinidade e efeito neutralizante.

Na avaliação *in vivo* os anticorpos rStx2B-específicos, a imunização dos animais, conferiu proteção parcial ao desafio com dose letal de Stx2. Os animais que apresentarem maiores títulos de anticorpos foram protegidos, enquanto os animais dos demais grupos experimentais sucumbiram a infecção. Esses resultados confirmam a importância em alcançar altos títulos de anticorpos específicos para que se atinja a proteção vacinal almejada.

Os resultados observados neste trabalho demonstram o potencial promissor dessa estratégia vacinal, uma vez que a formulação contendo apenas o antígeno na forma monomérica carregado pelos MLVs, conferiu proteção parcial significativa, próxima as observadas em trabalhos que utilizaram a subunidade B em sua conformação pentamérica. Sendo assim, um próximo passo deverá contar com a otimização do protocolo para obtenção da proteína Stx2B na sua forma nativa pentamérica, juntamente com a análise de diferentes concentrações de lipídio A na composição dos MLVs de forma a gerar títulos mais elevados de anticorpos nos animais imunizados.

6 CONCLUSÕES

- A proteína recombinante rStx2B foi expressa em linha de *Escherichia coli*, em quantidade e qualidade para a realização dos ensaios in vitro e in vivo.
- A imunização por via subcutânea com a formulação vacinal MLV-rStx2B se demonstrou promissora para o uso de vacinas de subunidades baseada em uma forma recombinante atóxica de Stx, sendo capaz de induzir anticorpos StxB-específicos com afinidade e capacidade de neutralização da toxina nativa.
- A proteção parcial conferida pela vacina abre perspectivas para estudos futuros com os MLVs em associação à subunidade B da Stx, bem como outras formas recombinantes de Stx, como estratégias de prevenção da SHU gerada pela infecção com linhagens de EHEC.

REFERÊNCIAS*

- 1- Palermo MS, Exeni R a, Fernández GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2009;7(6):697–707. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/eri.09.49>
- 2- Karmali M a. Host and pathogen determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl*. 2009;75(112):S4–7.
- 3- Terrell DR, Williams LA, Vesely SK, Lämmle B, Hovinga JAK, George JN. The incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: All patients, idiopathic patients, and patients with severe ADAMTS-13 deficiency. *J Thromb Haemost*. 2005;3(7):1432–6.
- 4- Cleary TG. The role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004;15(4):260–5.
- 5- Mayer CL, Leibowitz CS, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ. Shiga toxins and the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome in humans and animals. *Toxins (Basel)*. 2012;4(11):1261–87.
- 6- Banatvala N, Griffin PM, Greene KD, Barrett TJ, Bibb WF, Green JH, et al. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis*. 2001;183:1063–70.
- 7- Centers for Disease Control and Prevention. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60(22):749–55.
- 8- Kanayama A, Yahata Y, Arima Y, Takahashi T, Saitoh T, Kanou K, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreaks related to childcare facilities in Japan, 2010-2013. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 Nov 20 [cited 2016 Oct 20];15:539. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26589805>
- 9- Rivas, M; Exeni R, Jansen PS. Síndrome Urémico Hemolítico. Manifestaciones clínicas. Tratamiento. 2006;66.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 10- Friedrich AWW, Bielaszewska M, Zhang WW, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis [Internet]. 2002;185(1):74–84. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/338115>
- 11- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, et al. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem. 2004;279(26):27511–7.
- 12- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2011;11(9):671–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70165-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70165-7)
- 13- Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E, et al. Enteroaggregative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 1998;36(3):840–2.
- 14- Dallman T, Smith GP, O'Brien B, Chattaway MA, Finlay D, Grant KA, et al. Characterization of a verocytotoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O111:H21 strain associated with a household outbreak in Northern Ireland. J Clin Microbiol. 2012;50(12):4116–9.
- 15- Guth BEC, Lopes De Souza R, Vaz TMI, Irino K. First Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolate from a Patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. Emerg Infect Dis [Internet]. 2002;8(5):535–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3310449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 16- Irino K, Kato MAMF, Vaz TMI, Ramos II, Souza MAC, Cruz AS, et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. Vet Microbiol. 2005;105(1):29–36.
- 17- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1998;11(1):142–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457432> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC121379>
- 18- Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977;18(3):775–9.
- 19- Tyler JS, Mills MJ, Friedman DI. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. J Bacteriol. 2004;186(22):7670–9.

- 20- Zhang X, McDaniel a D, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis.* 2000;181:664–70.
- 21- Johannes L, Römer W. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(2):105–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2279>
- 22- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2951–63.
- 23- Jackson MP, Neill RJ, O'Brien AD, Holmes RK, Newland JW. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1987;44:109–14.
- 24- Okuda T, Tokuda N, Numata SI, Ito M, Ohta M, Kawamura K, et al. Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10230–5.
- 25- Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat Med* [Internet]. 2000;6(3):265–70. Available from: [internal-pdf://3829176385/nm0300_265.pdf\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700227](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700227)
- 26- Sandvig K, Van Deurs B. Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 2002;529(1):49–53.
- 27- Tam PJ, Lingwood CA. Membrane-cytosolic translocation of verotoxin A1 subunit in target cells. *Microbiology.* 2007;153(8):2700–10.
- 28- Sheng H, Lim JY, Knecht HJ, Li J, Hovde CJ. Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infect Immun.* 2006;74(8):4685–93.
- 29- Nunes AP, Lorenzon CS, Paulista UE. *Escherichia Coli* , Produtoras De Shigatoxinas. 2010;567–73.
- 30- Guirro M, Piazza RMF, de Souza RL, Guth BEC, M. G, R.M.F. P, et al. Humoral immune response to Shiga Toxin 2 (Stx2) among Brazilian urban children with hemolytic uremic syndrome and healthy controls. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14(1):320. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=24919599\nhttp://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/320\nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=2014412957\nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=J>

- 31- Offner G, Brodehl J, Galaske R, Rutt T. prognostic features after treatment with acute dialysis. 1986;482–6.
- 32- Bielaszewska M, Clarke I, Karmali MA, Petric M. Localization of intravenously administered verocytotoxins (shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. *Infect Immun*. 1997;65(7):2509–16.
- 33- Ojeda JM, Kohout I, Cuestas E. Dehydration upon admission is a risk factor for incomplete recovery of renal function in children with haemolytic uremic syndrome. *Nefrologia* [Internet]. 2013;33(3):372–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640118>
- 34- Yüksel S, Evrengül H, Özçakar ZB, Becerir T, Yalçın N, Korkmaz E, et al. First-Line, Early and Long-Term Eculizumab Therapy in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Case Series in Pediatric Patients. *Pediatr Drugs* [Internet]. 2016 Sep 19 [cited 2016 Oct 4]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40272-016-0194-0>
- 35- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Jun 29 [cited 2016 Oct 4];342(26):1930–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874060>
- 36- Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, Boster DR, et al. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2012 Jul [cited 2016 Oct 4];55(1):33–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431799>
- 37- Amorim JH, Del Cogliano ME, Fernandez-Brando RJ, Bilen MF, Jesus MR, Luiz WB, et al. Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches. *F1000Research* [Internet]. 2014 [cited 2016 Oct 4];3:74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25580222>
- 38- Mohawk KL, O'Brien AD. Mouse Models of *Escherichia coli* O157:H7 Infection and Shiga Toxin Injection. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011;2011:1–17. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/258185/>
- 39- Paton JC, Rogers TJ, Morona R, Paton AW. Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2001;69(3):1389–93.
- 40- Lubitz P, Mayr UB, Lubitz W. Applications of bacterial ghosts in biomedicine. *Adv Exp Med Biol*. 2009;655:159–70.

- 41- Gomes P a. DP, Bentancor LV, Pancez JD, Sbrogio-Almeida ME, Palermo MS, Ferreira RCC, et al. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Brazilian J Microbiol.* 2009;40:333–8.
- 42- Rojas RLG, Gomes PADP, Bentancor L V., Sbrogio-Almeida ME, Costa SOP, Massis LM, et al. *Salmonella enterica serovar typhimurium* vaccine strains expressing a nontoxic shiga-like toxin 2 derivative induce partial protective immunity to the toxin expressed by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(4):529–36.
- 43- Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, et al. Protection by a recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Gu??rin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(12):1932–7.
- 44- Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from *espA*, *eae* and *tir* genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine.* 2010;28(42):6923–9.
- 45- Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. Advances in the development of enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. *Vaccine.* 2013;31(32):3229-35.
- 46- Mukherjee J, Chios K, Fishwild D, Hudson D, O'Donnell S, Rich SM, et al. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Feb [cited 2016 Oct 19];70(2):612–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796590>
- 47- Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, Donohue-rolfe A, Trachtman H. Antibody Therapy in the Management of Shiga Toxin-Induced Hemolytic Uremic Syndrome. *Society.* 2004;17(4):926–41.
- 48- Luz D, Chen G, Maranhão AQ, Rocha LB, Sidhu S, Piazza RMF. Development and characterization of recombinant antibody fragments that recognize and neutralize in vitro Stx2 toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2016 Oct 19];10(3):e0120481. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25790467>
- 49- Mejias MP, Hiriart Y, Lauche C, Fernandez-Brando RJ, Pardo R, Bruballa A, et al. Development of camelid single chain antibodies against Shiga toxin type 2 (Stx2) with therapeutic potential against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(April):24913. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=pem&N EWS=N&AN=27118524>

- 50- Bernedo-Navarro RA, Miyachiro MM, Da Silva MJ, Reis CF, Conceição RA, Gatti MS V, et al. Peptides derived from phage display libraries as potential neutralizers of Shiga toxin-induced cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *J Appl Microbiol*. 2014;116(5):1322–33.
- 51- Takeda T, Yoshino K, Adachi E, Sato Y, Yamagata K. In vitro assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. *Microbiol Immunol* [Internet]. 1999;43(4):331–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385199>
- 52- Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis*. 2004;189(3):355–9.
- 53- Legendre CM, Licht C, Muus P, Greenbaum LA, Babu S, Bedrosian C, et al. Terminal Complement Inhibitor Eculizumab in Atypical Hemolytic–Uremic Syndrome. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Jun 6 [cited 2016 Oct 19];368(23):2169–81. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1208981>
- 54- Licht C, Greenbaum L, Muus P, Babu S, Bedrosian CL, Cohen DJ, et al. Efficacy and safety of eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome from 2-year extensions of phase 2 studies. *Kidney Int* [Internet]. 2015;87(5):1061–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4424817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 55- Thomson N, Ulrickson M. Maintenance eculizumab dose adjustment in the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome: a case report and review of the literature. *Clin case reports* [Internet]. 2016 Aug [cited 2016 Oct 19];4(8):773–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27525082>
- 56- Ludwig K, Karmali MA, Smith CR, Petric M. Cross-protection against challenge by intravenous *Escherichia coli* verocytotoxin 1 (VT1) in rabbits immunized with VT2 toxoid. *Can J Microbiol* [Internet]. 2002;48(1):99–103. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11888169
- 57- Capozzo AVE, Creydt VP, Dran G, Ferna G, Bentancor L V, Rubel C, et al. Development of DNA Vaccines against Hemolytic-Uremic Syndrome in a Murine Model. *Society*. 2003;71(7):3971–8.
- 58- Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga Toxin B-Subunit-Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccine Protects Mice from Shigatoxemia Recombinant Shiga Toxin B-Subunit – Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccine Protects Mice from Shigatoxemia. *Infect Immun*. 2005;73(10):6523–9.

- 59- Torres AG. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Vaccines Biodefense Emerg Neglected Dis.* 2009;1013–29.
- 60- Smith MJ, Teel LD, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine.* 2006;24(19):4122–9.
- 61- Gao X, Cai K, Shi J, Liu H, Hou X, Tu W, et al. Immunogenicity of a novel Stx2B-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine.* 2009;27(14):2070–6.
- 62- Cai K, Gao X, Li T, Wang Q, Hou X, Tu W, et al. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(5):946–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.035>
- 63- Mejias MP, Ghersi G, Craig PO, Panek CA, Bentancor L V, Baschkier A, et al. Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and *Brucella* lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(5):2403–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918978>
- 64- Mejias MP, Cabrera G, Fernández-Brando RJ, Baschkier A, Ghersi G, Abrey-Recalde MJ, et al. Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a *Brucella* lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera. *Infect Immun.* 2014;82(4):1491–9.
- 65- Johannes L, Decaudin D. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther.* 2005;12(18):1360–8.
- 66- Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, et al. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. *Vaccine.* 2008;26(17):2092–9.
- 67- Gu J, Liu Y, Yu S, Wang H, Wang Q, Yi Y, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. *Microbes Infect* [Internet]. 2009;11(10–11):835–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.024>
- 68- Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, et al. Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. *Vaccine* [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Oct 7];29(45):8094–100. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11012710>

- 69- Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* [Internet]. 2006;15(11):2558–67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2242418&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 70- Bentancor L V., Bilen M, Brando RJF, Ramos MV, Ferreira LCS, Ghiringhelli PD, et al. A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to shiga toxin challenge in the murine model. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(5):712–8.
- 71- Gomes, PADP. Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC). [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013
- 72- Afrin F, Anam K, Ali N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. *J Parasitol* [Internet]. 2000;86(4):730–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958448>
- 73- Migliaccio V, Santos FR, Ciancaglini P, Ramalho-Pinto FJ. Use of proteoliposome as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Chem Phys Lipids*. 2008;152(2):86–94.
- 74- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(11):592–9.
- 75- Simão AMS, Yadav MC, Narisawa S, Bolean M, Pizauro JM, Hoylaerts MF, et al. Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicle biomimetics. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7598–609.
- 76- Schmidt ST, Foged C, Korsholm KS, Rades T, Christensen D. Liposome-based adjuvants for subunit vaccines: Formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. *Pharmaceutics*. 2016;8(1):1–22.
- 77- Bhowmick S, Mazumdar T, Sinha R, Ali N. Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against *Leishmania donovani*. *J Control Release* [Internet]. 2010;141(2):199–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.09.018>
- 78- Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145–60.
- 79- Brewer JM, Tetley L, Richmond J, Liew FY, Alexander J. Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. *J Immunol*. 1998;161(8):4000–7.

- 80- Brewer JM, Pollock KGJ, Tetley L, Russell DG. Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *J Immunol*. 2004;173(10):6143–50.
- 81- Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* [Internet]. 2012;30(13):2256–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X12001089>
- 82- Smith DM, Simon JK, Baker JR. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(8):592–605. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri3488>
- 83- Alinaghi A, Rouini MR, Johari Daha F, Moghimi HR. The influence of lipid composition and surface charge on biodistribution of intact liposomes releasing from hydrogel-embedded vesicles. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;459(1–2):30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.011>
- 84- Ignatius R, Mahnke K, Rivera M, Hong K, Isdell F, Steinman RM, et al. Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo. *Blood*. 2000;96(10):3505–13.
- 85- Huang B, Sohail M, Luo S, Um SH, Khant H. NIH Public Access. 2011;10(3):243–51.
- 86- Papahadjopoulos D, Nir S, Düzgünes N. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. *J Bioenerg Biomembr*. 1990;22(2):157–79.
- 87- Foged C, Arigita C, Sundblad A, Jiskoot W, Storm G, Frokjaer S. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: Effect of bilayer composition. *Vaccine*. 2004;22(15–16):1903–13.
- 88- Fukuda T, Kimiya T, Takahashi M, Arakawa Y, Ami Y, Suzaki Y, et al. Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mice by shiga-like toxin-liposome conjugate. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1998;116(4):313–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9693282
- 89- Suzaki Y, Ami Y, Nagata N, Naito S, Kato H, Taneichi M, et al. Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 2002;127(4):294–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021548>

- 90- Tana, Watarai S, Isogai E, Oguma K. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(3):135–9.
- 91- MacDonald RA, Hosking CS, Jones CL. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*. 1988;106(2):191–4.
- 92- Bondos SE, Bicknell A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal Biochem*. 2003;316(2):223–31.
- 93- Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm*. 2005;289(1–2):1–30.
- 94- Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2004;22(11):1399–408. Available from: <http://www.nature.com/nbt/journal/v22/n11/full/nbt1029.html> \n <http://www.nature.com/nbt/journal/v22/n11/pdf/nbt1029.pdf>
- 95- Timasheff SN. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem* [Internet]. 1998;51:355–432. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60656-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60656-7)
- 96- Vingert B, Adotevi O, Patin D, Jung S, Shrikant P, Freyburger L, et al. The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* [Internet]. 2006 May [cited 2016 Oct 9];36(5):1124–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568496>
- 97- Pina DG, Gómez J, Villar E, Johannes L, Shnyrov VL. Thermodynamic analysis of the structural stability of the Shiga toxin B-subunit. *Biochemistry*. 2003;42(31):9498–506.
- 98- Conrady DG, Flagler MJ, Friedmann DR, Vander Wielen BD, Kovall RA, Weiss AA, et al. Molecular basis of differential B-pentamer stability of Shiga toxins 1 and 2. *PLoS One*. 2010;5(12):1–9.
- 99- DeMuth PC, Moon JJ, Suh H, Hammond PT, Irvine DJ. Releasable layer-by-layer assembly of stabilized lipid nanocapsules on microneedles for enhanced transcutaneous vaccine delivery. *ACS Nano* [Internet]. 2012 Sep 25 [cited 2016 Oct 13];6(9):8041–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920601>

- 100- Luo Y, Liu Z, Zhang X, Huang J, Yu X, Li J, et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 4];11:3111–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471381>
- 101- Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* [Internet]. 2014;2(6):159–82. Available from: <http://tav.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/2051013614541440>
- 102- Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1997;1328(2):261–72.
- 103- Lee S, Nguyen MT. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Netw* [Internet]. 2015;15(2):51–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>
- 104- MacLeod MKL, McKee AS, David A, Wang J, Mason R, Kappler JW, et al. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011;108(19):7914–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518876> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3093483>
- 105- Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm.* 2008;364(2):272–80.
- 106- Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* [Internet]. 2013;19(12):1597–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309663>
- 107- Marcato P, Mulvey G, Read RJ, Vander Helm K, Nation PN, Armstrong GD. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. *J Infect Dis* [Internet]. 2001;183(3):435–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133375>
- 108- Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, Haertle S, Oyakhiromen S, Issifou S, et al. A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS, S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS One.* 2009;4(10).
- 109- Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, et al. Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis.* 2009;200:337–46.

- 110- Montoya J, Solon JA, Cunanan SRC, Acosta L, Bollaerts A, Moris P, et al. A randomized, controlled dose-finding Phase II study of the M72/AS01 candidate tuberculosis vaccine in healthy PPD-positive adults. *J Clin Immunol*. 2013;33(8):1360–75.
- 111- Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains. *Shock* [Internet]. 2004;22(5):460–6. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200411000-00010>
- 112- Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2012;32(6):463–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428224>
- 113- Ohmura-Hoshino M, Yamamoto M, Yuki Y, Takeda Y, Kiyono H. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity. *Vaccine*. 2004;22(27–28):3751–61.
- 114- Haicheur N, Benchetrit F, Amessou M, Leclerc C, Falguières T, Fayolle C, et al. The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization. *Int Immunol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2016 Oct 19];15(10):1161–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679386>
- 115- Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, Yuki Y, Takeda Y, Kiyono H. Nontoxic Shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. *Infect Immun* [Internet]. 2005 Jul [cited 2016 Oct 8];73(7):4088–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972497>
- 116- Kostova V, Dransart E, Azoulay M, Brulle L, Bai SK, Florent JC, et al. Targeted Shiga toxin-drug conjugates prepared via Cu-free click chemistry. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2015;23(22):7150–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.010>
- 117- Batisse C, Dransart E, Ait Sarkouh R, Brulle L, Bai SK, Godefroy S, et al. A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. *Eur J Med Chem*. 2015;95:483–91.
- 118- Couture O, Dransart E, Dehay S, Nemati F, Decaudin D, Johannes L, et al. Tumor Delivery of ultrasound contrast agents using shiga toxin B subunit. *Mol Imaging*. 2011;10(2):135–43.
- 119- Arimitsu H, Sasaki K, Iba Y, Kurosawa Y, Shimizu T, Tsuji T. Isolation of B subunit-specific monoclonal antibody clones that strongly neutralize the toxicity of Shiga toxin 2. *Microbiol Immunol*. 2015;59(2):71–81.

- 120- Tremblay JM, Mukherjee J, Leysath CE, Debatis M, Ofori K, Baldwin K, et al. A single VHH-based toxin-neutralizing agent and an effector antibody protect mice against challenge with Shiga toxins 1 and 2. *Infect Immun.* 2013;81(12):4592–603.
- 121- Tozzoli R, Scheutz F. “Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. In: Stefano, M. (ed.), *Pathogenic Escherichia coli*, Molecular and Cellular Microbiology. Caister Academic Press, Norfolk; 2014. p. 1-18.
- 122- Rivas ME, Padola NL, Luchesiv PMA, Masana M. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. In: Torres, AG (ed), *Pathogenic Escherichia coli* in Latin America. Oak Park, IL; 2010. p. 142-61.
- 123- Karmali MA, Petric M, Fleming PC, Arbus GC, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1985;151 (5):775-82.
- 124- Naito S, Horino A, Komiva T, Fukuda Y, Takahashi M, Ami Y, et. al. Protection against verocytotoxin in mice induced by liposome-coupled verocytotoxin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997;114:293-7.
- 125- Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 2005;36:289-311.
- 126- Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991;13:60-98.
- 127- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* using Calcium Chloride. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 1:1116.
- 128- Rowe PC, Orrbine E, Lior H, Wells GA, Yetisir E, Clulow M, McLaine PN. Risk of hemolytic uremic syndrome after sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: results of a Canadian collaborative study. Investigators of the Canadian Pediatric Kidney Disease Research center. *J. Pediatric.* 1998;132:777-82.
- 129- Exeni, R. Síndrome Urémico Hemolítico. *Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica.* 2001;1:35-56.
- 130- Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HÁ, Masana M. Epidemiology of Argentinean Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: Walk ST, Feng PCH (eds.) *Population genetics of bacteria: a tribute to Thomas S. Whittam*. Washington, DC.; ASM Press; 2011. p. 109-32.

APÊNDICE

A - Amorim JH, Del Cogliano ME, Fernandez-Brando RJ, Bilen MF, Jesus, MJR, Luiz WB et al. Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches. F1000Research [Internet]. 2014;3:74.

RESEARCH NOTE

REVISED Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches [version 2; referees: 2 approved, 1 approved with reservations]

Jaime H. Amorim¹, Manuel E. Del Cogliano², Romina J. Fernandez-Brando⁴, Marcos F. Bilen², Monica R. Jesus¹, Wilson B. Luiz¹, Marina S. Palermo⁴, Rita C.C. Ferreira¹, Esteban G. Servat³, Pablo D. Ghiringhelli², Luis C.S Ferreira¹, ✉ **Leticia V. Bentancor²**

[+ Author affiliations](#)

[+ Grant information](#)

Abstract

Shiga toxin (Stx) is considered the main virulence factor in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) infections. Previously we reported the expression of biologically active Stx by eukaryotic cells *in vitro* and *in vivo* following transfection with plasmids encoding Stx under control of the native bacterial promoter^{1,2}. Since *stx* genes are present in the genome of lysogenic bacteriophages, here we evaluated the relevance of bacteriophages during STEC infection. We used the non-pathogenic *E. coli* C600 strain carrying a lysogenic 933W mutant bacteriophage in which the *stx* operon was replaced by a gene encoding the green fluorescent protein (GFP). Tracking GFP expression using an *In Vivo* Imaging System (IVIS), we detected fluorescence in liver, kidney, and intestine of mice infected with the recombinant *E. coli* strain after treatment with ciprofloxacin, which induces the lytic replication and release of bacteriophages. In addition, we showed that chitosan, a linear polysaccharide composed of d-glucosamine residues and with a number of commercial and biomedical uses, had strong anti-bacteriophage effects, as demonstrated at *in vitro* and *in vivo* conditions. These findings bring promising perspectives for the prevention and treatment of haemolytic uremic syndrome (HUS) cases.



METRICS

 VIEWS
709

 DOWNLOADS
477

 [Get PDF](#)

 [Get XML](#)

 [Cite](#)

 [Export](#)

 [Track](#)

 [Email](#)

 [Share](#)