ANDRESSA CARAVELLI

Anticorpo recombinante anti-intimina: uma ferramenta para o diagnóstico rápido de *Escherichia coli* enteropatogênica e de *Escherichia coli* enterohemorrágica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

ANDRESSA CARAVELLI

Anticorpo recombinante anti-intimina: uma ferramenta para o diagnóstico rápido de *Escherichia coli* enteropatogênica e de *Escherichia coli* enterohemorrágica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Versão original

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Caravelli, Andressa.
Anticorpo recombinante anti-intimina: uma ferramenta para o diagnóstico rápido *de Escherichia coli* enteropatogênica e de *Escherichia coli* enterohemorrágica / Andressa Caravelli. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Diagnóstico de *Escherichia coli* diarreiogênicas.

Versão do título para o inglês: Anti-intimin recombinant antibody: a tool for rapid diagnosis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

1. *Escherichia coli* 2. Diarreia 3. Anticorpos 4. Diagnóstico I. Piazza, Profa. Dra. Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB025/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

---

Candidato(a): Andressa Caravelli.

Título da Dissertação: Anticorpo recombinante anti-intimina: uma ferramenta para o diagnóstico rápido de *Escherichia coli* enteropatogênica e de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

Orientador(a): Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

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

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

INSTITUTO BUTANTAN

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

São Paulo, 07 de março de 2012.

Protocolo: I-897/12

Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
Laboratório de Bacteriologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Anticorpos recombinantes (scFv-intimina) como ferramenta na detecção precoce das diarreias causadas por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)".

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) informa que o projeto acima referido é isento de análise por parte desta Comissão, pois não faz uso de animais vertebrados em sua execução.

Cordialmente,

Dr. Marcelo Larami Santoro
Coordenador da CEUAIB

“Primeiramente a Deus, que nos deu a vida e as ferramentas para que façamos dela grandes obras...

Aos meus pais, Wagner e Rosana, e ao meu irmão Eric, pela dedicação, incentivo e amor em todos os momentos...

E ao meu querido namorado Thiago pelo apoio e cumplicidade.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e pelos dons a mim oferecidos.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza pela oportunidade, pela orientação, paciência, dedicação, ensinamentos, disposição, compreensão, estímulo e companheirismo.

A Dra. Denise Silvina Piccini Quintas Horton pelos conselhos e assistência sempre que precisei.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Júnior pelo apoio e conselhos científicos.

Aos amigos: Chris Ozaki, Márcio, Natália, Letícia, Anderson, Anna Raquel, Danielle, Daniela, Cynthia, Bruno, Cris Souza, Caio, Keyde, Lívia, Gabrielle, Bruna, Claudia, Renato, Ludmila, Larissa, Demétria, Denise, Tatiane, Francielli, Afonso, Camila, Fernanda, Cris Moda, Hebert, Vanessa, Juliana, pelo apoio, companheirismo, discussões e momentos de descontração.

Aos pesquisadores e técnicos do laboratório de Bacteriologia pelas dicas metodológicas.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia: alunos, ex-alunos e funcionários pela amizade e colaboração.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CAPES.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

“Ser feliz é nunca deixar de sonhar, é sempre ser jovem, é agradecer muito, mesmo se as cosias derem errado. É transformar os erros em lições de vida. É extrair das pequenas coisas grandes emoções, é encontrar todos os dias motivos para sorrir, mesmo se não existirem grandes fatos. É não desistir de quem se ama, é ter amigos para repartir as lágrimas e dividir alegrias. É agradecer a Deus pelo espetáculo da vida.”

Augusto Cury

RESUMO

CARAVELLI, A. **Anticorpo recombinante anti-intimina:** uma ferramenta para o diagnóstico rápido de *Escherichia coli* enteropatogênica e de *Escherichia coli* enterohemorrágica. 2013. 147 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Intimina é o principal fator de virulência envolvido na lesão *attaching/effacing* em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que são responsáveis pela diarreia infantil e colite hemorrágica/síndrome hemolítico-urêmica, respectivamente. Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico desses patógenos ou é demorado e caro, ou não é realizado em laboratórios de rotina. No entanto, a detecção é essencial para definição do tratamento da infecção. O objetivo do presente trabalho foi definir o vetor de expressão mais apropriado e avaliar a sensibilidade e especificidade do scFv-intimina obtido. O gene scFv-intimina anteriormente obtido foi clonado nos vetores de expressão pAE e pSMT3, transformados em uma *E. coli* BL21 (DE3). A expressão foi induzida com 1 mM de IPTG. Em ambos os vetores, a proteína expressa foi direcionada para o citoplasma bacteriano, dessa forma a construção pAE-scFv-intimina foi utilizada na obtenção do anticorpo recombinante. Após cromatografia de afinidade ao níquel o scFv-intimina foi empregado no ensaio de imunofluorescência indireta para definir um teste de ensaio rápido e confiável, analisando-se 199 isolados de *E. coli* e isolados de outras Enterobactérias, dos quais 132 resultaram em isolados *eae*-positivos e 67 isolados *eae*-negativos. O teste de imunofluorescência mostrou a detecção de 132 isolados *eae*-positivos (100% de sensibilidade) e a não detecção de 67 isolados *eae*-negativos (100% especificidade). Assim, o ensaio de imunofluorescência é um método eficaz e rápido, e o scFv-intimina é uma excelente ferramenta para o imunodiagnóstico de EPEC e EHEC.

Palavras-chave: Diarreia. *Escherichia coli* diarreiogênica. Anticorpos recombinantes. scFv-intimina. Diagnóstico.

ABSTRACT

CARAVELLI, A. **Anti-intimin recombinant antibody:** a tool for a rapid diagnosis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 2013. 147 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Intimin is the main virulence factor involved in the *attaching/effacing* lesion of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), which are responsible for infantile diarrhea and hemorrhagic colitis/hemolytic uremic syndrome, respectively. In developing countries, their diagnosis is either time-consuming and expensive or is not done in the routine laboratory. Nevertheless, their detection is essential in defining the infection treatment. The aim of the study was to define the most suitable expression vector and evaluate the sensitivity and specificity of the scFv-intimin obtained. The scFv-intimin gene previously obtained was cloned into pAE and pSMT3 expression vectors and transformed into an *E. coli* BL21 (DE3) strain. Expression was induced with 1 mM IPTG. In both vectors, recombinant protein was expressed as inclusion bodies, so pAE was chosen as the expression vector for nickel affinity chromatography. Once purified, scFv-intimin was employed in an indirect immunofluorescence assay to define a rapid and reliable assay testing 199 *E. coli* strains and other Enterobacteriaceae isolates, of which 132 isolates were *eae*-positive and 67 isolates were *eae*-negative. The immunofluorescence assay showed the detection of 132 *eae*-positive isolates (100% sensitive) and no detection in the 67 *eae*-negative isolates (100% specific). Thus, immunofluorescence is an effective and rapid method and scFv-intimin an excellent tool for the immunodiagnosis of EPEC and EHEC.

Keywords: Diarrhea. Diarrheagenic *E. coli*. Recombinant antibody. scFv-intimin. Diagnosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reatividade do scFv-intimina nos diferentes isolados de *E. coli* e outras enterobactérias.....103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos principais fatores de virulência das categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas 28

Figura 2 - Lesão *attaching and effacing* (A/E) 31

Figura 3 - Translocação de proteínas secretadas pela EPEC através do sistema de secreção tipo III 32

Figura 4 - Representação esquemática dos fatores de virulência de EPEC, codificados em LEE e no plasmídeo EAF 33

Figura 5 - Interação entre intimina e seu receptor Tir presente na membrana da célula hospedeira 38

Figura 6 - Estrutura de uma molécula de anticorpo 41

Figura 7 - Regiões hipervariável e *framework* nas moléculas de Igs.....42

Figura 8 - Fragmentos proteolíticos de uma molécula de IgG 44

Figura 9 - Fragmentação da molécula de IgG em menores pedaços.....45

Figura 10 - Ilustração de uma molécula de IgG e seu derivado, scFv 48

Figura 11 - Organograma das principais etapas de desenvolvimento do projeto.....55

Figura 12 - Esquema resumido do processo de clonagem 58

Figura 13 - Perfil eletroforético da extração de RNA total de células dos hibridomas produtores de anticorpos anti-intimina 81

Figura 14 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das V_L dos anticorpos anti-intimina.....82

Figura 15 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das V_L dos anticorpos anti-intimina.....83

Figura 16 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das V_L dos anticorpos anti-intimina.....84

Figura 17 - Análise das sequências de V_H e do *linker* de anti-intimina, pelo programa BioEdit.....86

Figura 18 - Análise das sequências de V_L de anti-intimina, pelo programa BioEdit. 87

Figura 19 - Desenho do gene sintético ScFv-intimina mostrando os sítios de restrições e a cauda de histidina 89

Figura 20 - Representação esquemática do mapa da construção do gene sintético ScFv-intimina no vetor pPIG16.....89

Figura 21 - Representação esquemática do mapa da construção do gene sintético ScFv-intimina no vetor pAE 90

Figura 22 - Representação esquemática do mapa da construção do gene sintético ScFv-intimina no vetor pSMT3 90

Figura 23 - Perfil eletroforético da digestão dos vetores pSMT3, pPIG16 e pAE com as enzimas SacI e HindIII para pSMT3, XmaI e EcoRI para pPIG16 e BamHI e HindIII para pAE 91

Figura 24 - Perfil eletroforético da digestão dos genes sintéticos scFv-intimina com as enzimas SacI e HindIII para pSMT3, XmaI e EcoRI para pPIG16 e BamHI e HindIII para pAE 92

Figura 25 - Perfil eletroforético da digestão dos clones pAE scFv-intimina com as enzimas BamHI e HindIII, pPIG16 scFv-intimina com as enzimas XmaI e EcoRI e pSMT3 scFv-intimina com as enzimas SacI e HindIII 93

Figura 26 - Perfil eletroforético do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones 1, 2 e 3 de pAE scFv-intimina 95

Figura 27 - Perfil eletroforético do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones 1, 2 e 3 de pSMT3 scFv-intimina 95

Figura 28 - Perfil eletroforético do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones 1 de pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina 96

Figura 29 - Imunodetecção dos anticorpos recombinantes pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina.....97

Figura 30 - Perfil eletroforético da purificação do anticorpo recombinante pAE scFv-intimina após indução por IPTG.....98

Figura 31 - Imunodetecção do anticorpo recombinante pAE scFv-intimina após indução por IPTG.....99

Figura 32 - Perfil eletroforético da purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG.....100

Figura 33 - Imunodetecção anti-His da purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG.....100

Figura 34 - Reatividade do scFv-intimina frente aos controles, por ensaio de imunofluorescência indireta.....102

Figura 35 - Painel representativo da reatividade, ou não do scFv-intimina por imunofluorescência indireta.....104

.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição global de causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade, 2010..... 23

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista dos iniciadores utilizados para obtenção de cadeia leve dos anticorpos.....60

Quadro 2 – Instruções para a identificação dos CDRs das cadeias variáveis leves e pesadas.....63

Quadro 3 - Primeira etapa das reações de digestão dos vetores pAE, pSMT3 e pPIG16 para a análise de restrição..... 67

Quadro 4 - Segunda etapa da reação de digestão do vetor pPIG16 para a análise de restrição.....68

Quadro 5 - Padronização da indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina.....72

Quadro 6 - Sequência de nucleotídeos referente à CP, *linker* e CL da fração variável do anticorpo anti-intimina 85

Quadro 7 - Sequência predita de aminoácidos referente à CP, *linker* e CL da fração variável do anticorpo anti-intimina sem a presença de códons de terminação 85

Quadro 8 - Dados obtidos do *blast* no *Expasy param* dos clones pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina.....94

Quadro A.1 - Isolados bacterianos utilizados no presente estudo.....139

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Absorbância

A/E - A*ttaching and effacement*

aEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

Amp - Gene de resistência à ampicilina

APS - Persulfato de amônio

Arp 2/3 - *Actin-related protein 2/3*

BCIP - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*

BFP - *Bundle-forming pilus*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

C - Controle

C-terminal - Extremidade carboxi-terminal

Can - Gene de resistência à canamicina

CH - Colite Hemorrágica

Da - *Dalton*

DAB - Diaminobenzidina

DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente

DEC - *Escherichia coli* diarreiogênica

DNA - *Ácido desoxirribonucléico*

DO - Densidade óptica

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF - EPEC *adherence factor*

E. coli - *Escherichia coli*

ECP - *E. coli common pilus*

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

Ehly - *Enterohemolysin*

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

Esp - *E. coli secreted protein*

EspA - *E. coli secreted protein A*

EspB - *E. coli secreted protein B*

EspD - *E. coli secreted protein D*

EspF - *E. coli secreted protein F*

EspP - *Extracellular serine protease, plasmid encoded*

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

Fab - Fragmento de anticorpo de ligação ao antígeno

Fc - Fragmento cristalizável de anticorpo (porção constante)

Fv - Fragmento variável do anticorpo

°C - Graus Celsius

g - Grama

h - Hora

HIS - Cauda de histidina

Ig - Imunoglobulina

IPTG - *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

K_D - Constante de dissociação

kDa - K*ilodalton*

L - *Litro*

LabBact/IBu - Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan

LB - Lúria Bertani

LEE - *Locus of enterocyte effacement*

Ler - LEE-encoded regulator

LPF - *Long Polar Fimbriae*

LPS - Lipopolissacarídeo

LT - Termo lábil

M - *Molar*

Map - *Mitocondrial associated protein*

Mg - *miligrama*

mM - Milimolar

µg - Micrograma

µL - *Microlitro*

ML - *Mililitro*

Min - Minuto

MAb - *Monoclonal Antibody* (Anticorpo Monoclonal)

MV - Microvilosidades

Ng - *Nanograma*

NMEC - *E. coli* causadora de meningite neonatal

Nck - Proteína adaptadora

N-WASP - *neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*

NT - Não tipável

N-terminal - Estremidade amino-terminal

OPD - σ-fenilenodiamino

pB - Pares de base

PAb - *Polyclonal Antibody* (Anticorpo Policlonal)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão salina-fosfato)

PBST - Tampão salina-fosfato com detergente *Tween 20*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PEG - Polietilenoglicol

Pet - *plamid-encoded toxin*

PO - Peroxidase

RIA - *Radioimmunoassay*

RNA - *Ácido ribonucléico*

RNAse - *Ribonuclease*

rpm - Rotações por minuto

scFv - *Fragmento variável de anticorpo de cadeia única*

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB - Soro fetal bovino

SHU - Síndrome hemolítico-urêmica

SSTT - Sistema de Secreção do Tipo III

ST - Termo estável

STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

Stx - Toxina de Shiga

Stx1 - Toxina de Shiga 1

Stx2 - Toxina de Shiga *2*

Sub. A - Subunidade A

Sub. B - Subunidade B

T- Teste

Temed - *Tetrametil etinodimetilamina*

TBS - Tampão borato salina

tEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica típica

Tir - *Translocated intimin receptor*

TSB - *Trypticase Soy Broth* (caldo triptona de soja)

UV - *Ultravioleta*

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

V_H - Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo

V_L - Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

VTEC - Verotoxin – producing *E. coli*

WHO - *WORLD HEALTH ORGANIZATION*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....23
1.1 Diarreia.....23
1.2 *Escherichia coli* 25
1.3 *Escherichia coli* diarreiogênica.....26
1.3.1 E. coli enteropatogênica *(EPEC)*.....28
1.3.2 Escherichia coli produtora da toxina de shiga (STEC) e sua subcategoria Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) 29
1.3.3 Mecanismo de Patogenicidade de E. coli enteropatogênica (EPEC) e E. coli enterohemorrágica (EHEC) 30
1.3.4 Epidemiologia de EPEC e EHEC 34
1.4 Detecção de intimina.....37
1.5 Anticorpos 39
1.6 Tecnologia de anticorpos recombinantes.....46
1.6.1 Anticorpos de cadeia única (scFv) 47
2 JUSTIFICATIVA.....52
3 OBJETIVO 54
4 PLANO DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO 55
5 MATERIAL E MÉTODOS 56
5.1 Meios de cultura e soluções.....56
5.2 Amostras bacterianas.....56
5.3 Vetores 56
5.4 Células eucarióticas.....57
5.4.1Hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-intimina 57
5.4.2 Clonagem do fragmento variável do anticorpo IgG2b anti-intimina.....57
5.4.3 Cultivo de hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-intimina dos hibridomas anti-intimina 58
5.4.4 Extração de RNA total dos hibridomas anti-intimina 59
5.4.5 Eletroforese em gel de agarose 59
5.4.6 Síntese de cDNA.....59

5.4.7 Amplificação da cadeia leve da porção variável do anticorpo anti-intimina pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) 61
5.4.8 Análise das sequências dos fragmentos obtidos 62
5.4.9 Identificação dos CDRs (regiões determinantes de complementariedade) das cadeias obtidas 62
5.5 Construção do gene sintético scFv-intimina 66
5.5.1 Extração Plasmidial 66
5.5.2 Análise de restrição dos plasmídios extraídos 67
5.5.3 Genes sintéticos scFv-intimina 68
5.5.4 Quimiotransformação - transformação bacteriana por choque térmico 68
5.5.5 Extração plasmidial 69
5.5.6 Análise de restrição dos genes sintéticos scFv-intimina 69
5.5.7 Purificação dos vetores e do inserto após corrida eletroforética 69
5.5.8 Clonagem do fragmento scFv-intimina aos vetores de expressão pAE, pSMT3 e pPIG16 69
5.5.9 Extração plasmidial 70
5.5.10 Análise de restrição para a confirmação dos clones 71
5.5.11 Sequenciamento e análise de DNA 71
5.6 Padronização da indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina 72
5.6.1 Pré-análise da indução da expressão dos clones pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina 72
5.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 73
5.6.3 Western-blot 74
5.6.4 Immunoblotting 74
5.7 Purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina obtido a partir da indução de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pAE scFv-intimina 75
5.7.1Indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina por IPTG, para purificação 75

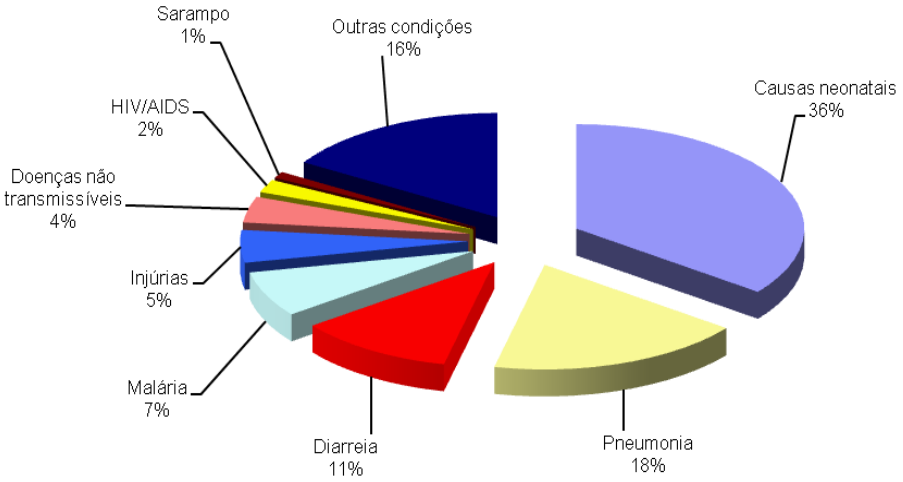
5.7.2 Obtenção da fração insolúvel do anticorpo recombinante scFv-intimina.....76
5.7.3 Cromatografia de afinidade ao Níquel Ni^{2+}.....76
5.7.4 Renaturação do anticorpo recombinante scFv-intimina após purificação 77
5.8 Purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina, obtido a partir da indução de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pSMT3 scFv-intimina.....77
5.8.1 Indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina por IPTG, para purificação.....77
5.8.2 Purificação do anticorpo recombinante pSMT3 scFv-intimina pelo sistema batch Ni^{2+}.....78
5.9 Análise da atividade funcional do anticorpo recombinante scFv-intimina..79
5.9.1 Detecção da intimina purificada, por imunofluorescência indireta, utilizando o anticorpo recombinante scFv-intimina.....79
6 RESULTADOS.....81
6.1 Clonagem do scFv-intimina.....81
6.2 Expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina e análise funcional ..94
6.2.1 Purificação em coluna de afinidade a Ni^{2+} do anticorpo recombinante pAE scFv-intimina.....97
6.2.2 Purificação do anticorpo recombinante pSMT3 scFv-intimina por batch Ni^{2+}.....99
6.3 Análise funcional do anticorpo recombinante scFv-intimina.....101
6.3.1 Reatividade do scFv-intimina por imunofluorescência indireta.....101
6.3.2 Validação do scFv-intimina.....102
7 DISCUSSÃO 108
8 CONCLUSÃO.....119
REFERÊNCIAS.....120
ANEXOS 138
ANEXO A – Isolados bacterianos.....139
APÊNDICES 145
APÊNDICE A – Artigo de periódico.....146
APÊNDICE B – Artigos no prelo 147

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diarreia

Aproximadamente oito milhões de crianças menores de cinco anos morrem anualmente no mundo todo. A maioria dessas mortes (85%) ocorre principalmente nas áreas rurais dos países da África e Sudeste Asiático (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND, UNICEF, 2012). Dentre as principais causas desta mortalidade, a diarreia é responsável por 800.000 mortes (11%), sendo superada apenas pela pneumonia (18%) (WORLD HEALTH ORGANIZAION, WHO, 2012; WORLD HEALTH STATISTICS, 2011; WHO, UNICEF, 2009) (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 - Distribuição global de causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade, 2010.



Fonte: WHO (2012).

A diarreia é uma manifestação comum de doenças infecciosas intestinais, que pode ser causada por vírus, bactérias e parasitas, de forma aguda e/ou persistente. Os agentes infecciosos bacterianos frequentemente isolados em surtos de diarreia

são *Escherichia coli*, *Shigella* spp.,*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholerae*.

O modo de transmissão da maioria desses patógenos ocorre via fecal-oral, e a alta incidência de surtos diarreicos está diretamente associada a fatores sócio-ambientais, como a falta de saneamento básico, condições sanitárias precárias, além da contaminação de água e a higiene inadequada dos alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2009).

Além da melhora nas condições de higiene, a terapia de reidratação oral tem levado à diminuição da morbidade e mortalidade de crianças com diarreia aguda, relacionada à perda de fluídos e eletrólitos. Entretanto, a diarreia persistente emergiu como causa comum de morte. Por ser prolongada, persiste por mais de 14 dias, podendo resultar em várias infecções consecutivas ou mal resolvidas, má absorção ou gastroenterite (OCHOA et al., 2008).

No Brasil, as políticas de saneamento básico, implantadas a partir de 1970, aliadas a medidas como terapias de reidratação oral, diminuição da desnutrição infantil e melhora no acesso a serviços de saúde levaram a uma queda significativa da mortalidade infantil por diarreia. As doenças infecciosas intestinais representavam 6% da mortalidade em 1996 e 3% em 2004 (TABNET.DATASUS, 2010).

Todavia, em algumas partes do país há grandes diferenças na proporção entre os índices de declínio. Por exemplo, em 2004, na Região Nordeste a taxa de mortalidade por doenças infecciosas intestinais foi de 5,4% enquanto na Região Sudeste foi de 1,7%. O que mostra que, apesar do decréscimo, a diarreia ainda representa um relevante problema de saúde pública (TABNET.DATASUS, 2010).

Oliveira e Latorre (2010), estudando as tendências de internação e mortalidade infantil por diarreia em crianças menores de um ano, no período de 1995 a 2005 no Brasil, verificaram uma redução desses índices em 13 capitais, porém oito capitais apresentaram redução da mortalidade, enquanto três tiveram queda apenas nas taxas de internação. A análise combinada desses indicadores mostrou queda no Brasil como um todo e em quatro capitais.

Recentemente (2011), os maiores índices de internações por diarreia nas unidades hospitalares participantes do Sistema Único de Saúde (SUS) (públicas ou

particulares conveniadas) ocorreram na região nordeste e norte, principalmente nos meses de clima quente (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS, DATASUS, 2012). Apesar das regiões norte e sudeste possuirem números de internações semelhantes, estes representam 0,21% da população da região norte, contra 0,04% da população da região sudeste, indicando que proporcionalmente, as populações das regiões norte e nordeste (0,17%) ainda carecem de ações de promoção à saúde (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2012).

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) foi descrita em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich, que notou sua alta prevalência na microbiota intestinal de crianças após 24 h do nascimento e a denominou *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885).

E. coli é componente da microbiota do trato gastrointestinal, considerada benéfica e não patogênica, porém pode assumir características patogênicas. É um bacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, componente da família *Enterobacteriaceae,* que coloniza a mucosa intestinal de humanos e outros animais poucas horas após o nascimento (KAPER et al., 2004; LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998; ØRSKOV; ØRSKOV,1992).

Alguns estudos demonstram que a composição de *E. coli* no intestino humano geralmente consiste de três ou quatro linhagens, sendo que uma delas é denominada residente, permanecendo no organismo do hospedeiro por meses, e as outras são transitórias, e duram algumas semanas (SEARS; BROWNLEE; UCHIYAMA, 1950).

E. coli normalmente permanece inofensiva confinada ao lúmen intestinal, entretanto, mesmo as cepas de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção quando o hospedeiro encontra-se debilitado, imunodeprimido ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas. Ao longo do tempo, cepas de *E. coli* patogênicas vêm adquirindo fatores de virulência específicos, conferindo um aumento na habilidade de se adaptar a novos nichos causando um amplo espectro de doenças em indivíduos saudáveis (KAPER et al., 2004). Três síndromes clínicas podem resultar da infecção

por estes patotipos: meningite neonatal, sepse e infecções do trato urinário. Além desses, há os patotipos associados a doenças entéricas conhecidos como *E. coli* diarreiogênica (DEC) (KAPER et al., 2004).

1.3 *Escherichia coli* diarreiogênica

Isolados de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) têm grande importância médica e epidemiológica, pois representam o patógeno bacteriano mais comumente associado às formas endêmicas de diarreia (CLARK et al., 2003).

Isolados de DEC são classificadas de acordo com mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam e os aspectos epidemiológicos em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que apresenta padrão de adesão difusa (DAEC), (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EPEC tem sido identificada como o principal agente de diarreia aguda em crianças menores de dois anos de idade nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). Isolados de EPEC causam um efeito histopatológico característico em biópsias intestinais, bem como em culturas celulares, conhecido como lesão *attachment and effacement* (A/E) (MOON et al.,1983).

STEC compreende todas as amostras de *Escherichia coli* que produzem as toxinas de Shiga Stx, e estão associadas à colite hemorrágica e à síndrome hemolítica urêmica (AGBODAZE, 1999). Este patógeno representa o mais importante agente etiológico de surtos diarréicos causados por alimentos, sendo prevalente principalmente em países desenvolvidos (PATON; PATON, 1998). Dentro deste patotipo está o subgrupo das EHEC que além da expressão das toxinas de Shiga, causa a lesão A/E, como as EPEC.

ETEC é um importante patógeno causador da diarreia aguda, sendo o primeiro em que os fatores de virulência foram descritos (TORRES et al., 2005). É principal causa de morbidade e mortalidade entre crianças de um a cinco anos de idade em países em desenvolvimento (QADRI et al., 2005). Além disso, está associado à

diarreia dos viajantes que acomete turistas e militares oriundos de países desenvolvidos em visita à regiões tropicais e subtropicais endêmicas. Estes organismos produzem a toxina termo estável (ST) e/ou a toxina termo lábil (LT) (SEARS; KAPER, 1996).

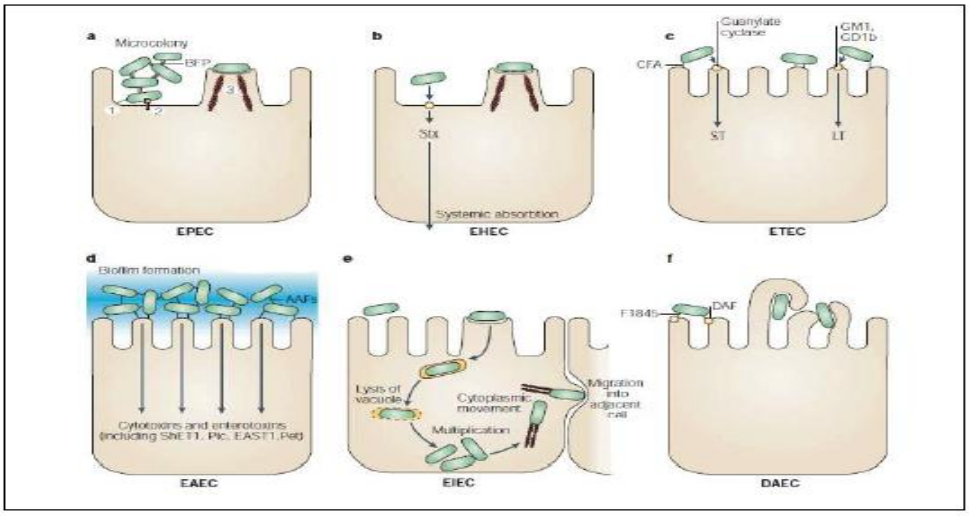
EAEC é caracterizada por aderir às células epiteliais cultivadas no padrão denominado de adesão agregativa (NATARO et al., 1987). Este patotipo está associado à diarreia aguda e persistente tanto em países em desenvolvimento, quanto em países industrializazdos (KAPER et al., 2004; TORRES et al., 2005).

EIEC apresenta a capacidade de invadir e de se multiplicar em células epiteliais, causando diarreia aquosa e disenteria no homem (TORRES et al., 2005). Quando a infecção é severa pode causar colite inflamatória, assim como a *Shigella* spp. (LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998).

DAEC é a categoria de *E. coli* diarreiogênica que apresenta um padrão de adesão difusa em células epiteliais em cultura. Neste padrão de adesão as bactérias encontram-se aderidas de forma difusa sobre toda a superfície celular (ELLIOTT; NATARO, 1995). Sua patogenicidade ainda é desconhecida, uma vez que amostras de DAEC são isoladas tanto de amostras diarréicas como de fezes não diarréicas, sendo mais brandas do que as diarréias causadas pelas categorias anteriores (KAPER et al., 2004; TORRES et al., 2005).

Os principais mecanismos de ação, os tipos de interação com células epiteliais *in vitro*, assim como os fatores de virulência específicos de cada uma da seis categorias de DEC, encontram-se esquematizados na **figura 1**.

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos principais fatores de virulência das categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas.



Fonte: Kaper, Nataro e Mobley (2004).

1.3.1 E. coli enteropatogênica (EPEC)

O termo *E. coli* enteropatogênica foi criado em 1955 por Erwin Neter para designar um grupo de cepas de *E. coli* associados à diarreia infantil, distinguindo-se assim das demais cepas encontradas em indivíduos normais ou em pacientes com processo de infecção extraintestinal (NETER et al., 1955).

O patotipo EPEC é subdividido em dois grupos distintos, EPEC típicas (tEPEC) e EPEC atípicas (aEPEC). Diferentemente das tEPEC, que têm como hospedeiro somente o homem, as aEPEC podem ter como hospedeiros tanto homens como animais. Por muitos anos tEPEC foram consideradas a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento sendo raras nos países industrializados. No entanto, os dados atuais sugerem que aEPEC são mais frequentes que as tEPEC tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento tendo surgido como patógeno emergente, relacionado à diarreia prolongada em crianças de até cinco anos de idade (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; OCHOA et al., 2008; SCALETSKY et al., 1999; SMITH et al., 1996; TRABULSI et al., 2002). As tEPEC distinguem-se das aEPEC pela presença do plasmídio EAF

(EPEC *adherence factor*) e expressão da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) (ABE et al., 2009; NARA et al., 2010; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Durante décadas, os mecanismos pelos quais as EPEC causavam diarreia ainda eram desconhecidos, e este patotipo só era identificado com base no sorotipo O:H. Em 1987, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu doze sorogrupos de EPEC, denominados O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O148 (WHO, 1987), os quais também são conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

1.3.2 Escherichia coli produtora da toxina de shiga (STEC) e sua subcategoria Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)

STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*) ou VTEC (*Verotoxin-producing E. coli*) foi primeiramente descrita por Konowalchuk, Speirs e Stavric (1977) por sua atividade citotóxica em células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano) surgindo então o termo verotoxina ou verocitotoxina (KONOWALCHUK et al., 1977).

Na década de 1980, foi descrito o primeiro isolamento de STEC do sorotipo O157:H7 em um surto de diarreia sanguinolenta, o qual foi associado à ingestão de carne de hambúrguer contaminada e mal-cozida (RILEY et al., 1983).

A ingestão de STEC pode causar um espectro de doenças agudas, que vão desde diarreias não complicadas, a diarreias sanguinolentas (colite hemorrágica) e até a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (CHINEN et al., 2009; KARMALI, 1985, 1989). SHU é caracterizada pelo aparecimento de trombocitopenia, anemia hemolítica e nefropatia aguda, deficiências do sistema nervoso e até morte. Aproximadamente até 15% dos pacientes desenvolvem SHU, especialmente crianças menores de 10 anos infectadas por *E. coli* O157:H7, que é o sorotipo predominante (GRIFFIN; TAUXE, 1991).

As Stx incluem dois subgrupos principais, Stx1 e Stx2, que possuem aproximadamente 55% de homologia de aminoácidos. Linhagens de STEC podem produzir Stx1 ou Stx2 ou ambas toxinas, ou ainda variantes dessas toxinas (GYLES et al., 2007). Essas toxinas são do tipo A_1B_5, apresentando uma subunidade A com

35 kDa e 5 subunidades B com 7,5 kDa (GYLES, 2007; NATARO; KAPER, 1998). Linhagens isoladas de pacientes com SHU produzem principalmente Stx2 (FRIEDRICH et al., 2002).

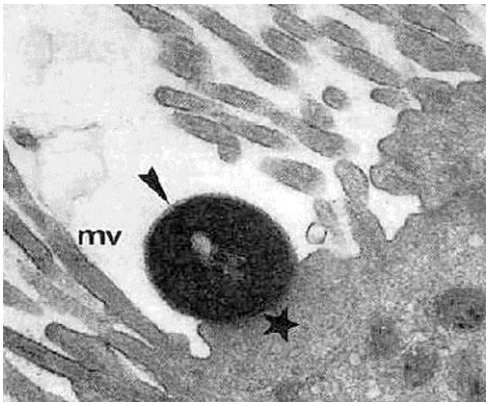
Além das toxinas de Shiga, existem outros fatores capazes de aumentar ou colaborar na patogenicidade de STEC, como a adesina intimina, produto do gene *eae* presente em EPEC e EHEC, a enterohemolisina (Ehly) e uma protease (EspP/PssA) de codificação plasmidial como fatores de virulência (GOOSNEY et al., 2000; NATARO; KAPER, 1998).

1.3.3 Mecanismo de Patogenicidade de E. coli enteropatogênica (EPEC) e E. coli enterohemorrágica (EHEC)

O mecanismo central da patogênese de EPEC, assim como nas EHEC, é a lesão histopatológica denominada *attaching and effacing* (lesão A/E), a qual é caracterizada pela adesão da bactéria ao epitélio intestinal, desencadeando uma cascata de sinais transmembrânicos e intracelulares que levam à destruição das microvilosidades locais e ao acúmulo de actina polimerizada e componentes do citoesqueleto no local de contato entre a célula epitelial e a bactéria, formando então uma estrutura semelhante à um pedestal com a bactéria em sua superfície (MOON et al., 1983) (**Figura 2**).

Esse mecanismo está dividido didaticamente em três estágios: (1) aderência inicial à célula hospedeira, (2) produção e translocação das proteínas bacterianas por uma agulha formada pelo complexo de secreção do tipo III (SSTT) e (3) ligação da intimina ao receptor Tir (*translocated intimin receptor*) com a formação do pedestal (GARMENDIA et al., 2005; GIRARD, 2005; NATARO; KAPER, 1998; VALLANCE; FINLAY, 2000).

Figura 2 - Lesão *attaching and effacing* (A/E).



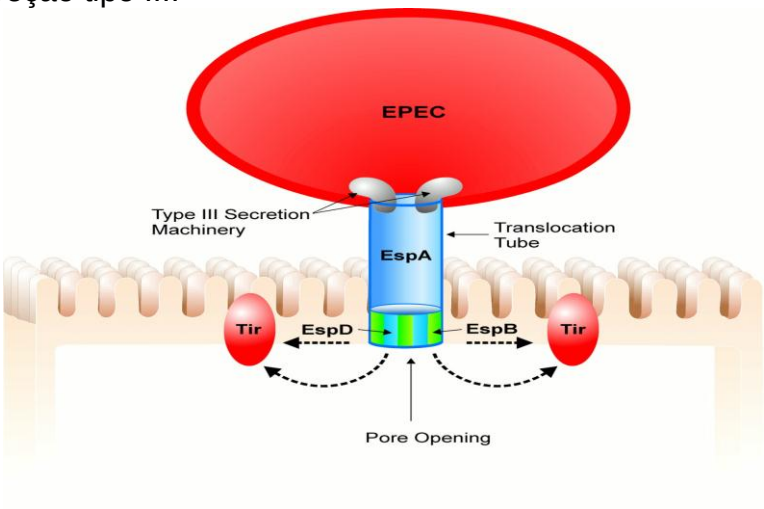
Apagamento das microvilosidades (mv) e pedestal (estrela) com adesão de EPEC (seta).
Fonte: Pedroso et al. (1993).

A primeira fase da infecção é superficial e não íntima e os fatores de virulência responsáveis pela adesão podem ser as fímbrias BFP (HYLAND et al., 2008) e *E. coli common pilus* (ECP) (RENDON et al., 2007), filamentos EspA (*E. coli secreted protein A*) (CLEARY et al., 2004) e também o flagelo (RAMOS et al., 2004). No entanto, sabe-se que esta fase é multifatorial e dependente de uma variedade de condições (HUMPHRIES; ARMSTRONG, 2010).

Após a adesão inicial, o complexo transportador SSTT é montado. Essa estrutura se assemelha à uma seringa e se estende desde a membrana interna da bactéria até o meio extracelular, formando um canal transmembrânico, através do qual, várias proteínas são secretadas (GARMENDIA et al., 2005). Os filamentos de EspA promovem o contato inicial ao enterócito (KNUTTON et al., 1998), possibilitando a translocação das proteínas estruturais EspB (*E. coli secreted protein B*) e EspD (*E. coli secreted protein D*), responsáveis por direcionar EspA e formar um poro na membrana da célula hospedeira (**Figura 3**) (DANIEL et al., 2001). O SSTT formado injeta para o interior da célula um número indeterminado de moléculas efetoras, como Tir, Esps (*EPEC secreted proteins*) e Map (*mitocondrial associated protein*); essas transmitem sinais causando alterações no citoplasma do hospedeiro. Após ser translocado, nas EPEC, Tir é fosforilado no resíduo de tirosina-474 por quinases específicas do enterócito e inserido na membrana da célula epitelial, com suas extremidades orientadas para o citoplasma e sua porção média localizada externamente à membrana, assumindo um formato de grampo e atuando

como receptor para a intimina; já nas EHEC, a proteína Tir não apresenta o resíduo de tirosina-474 e, portanto, não é fosforilada (LUO et al., 2000).

Figura 3 - Translocação de proteínas secretadas pela EPEC através do sistema de secreção tipo III.



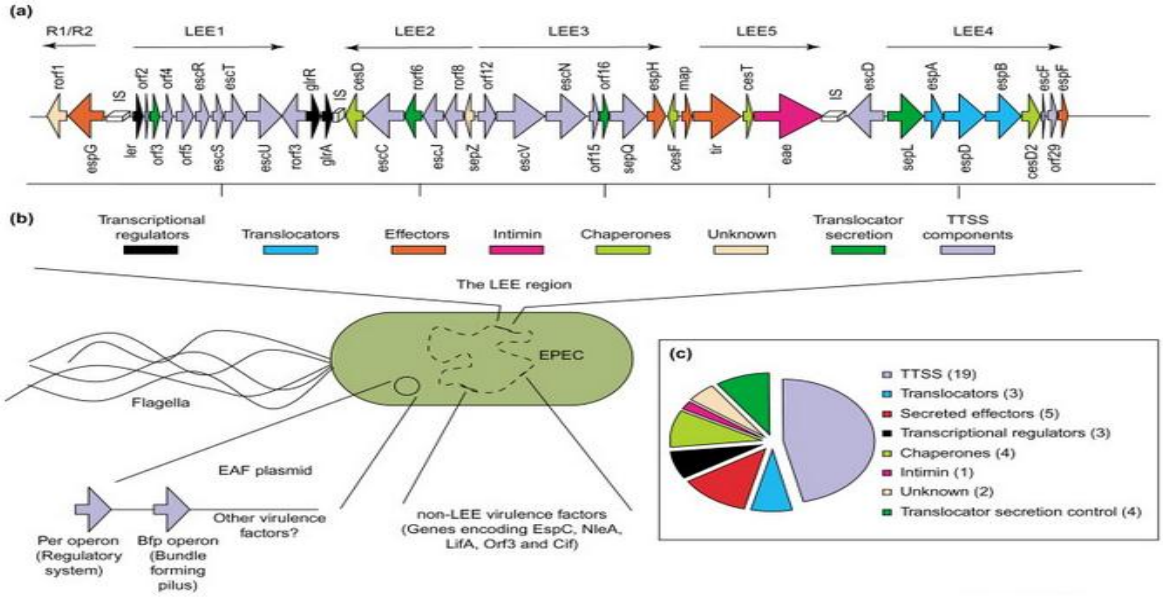
Uma vez translocada para fora da bactéria, as EspA formam um filamento, EspB e EspD são inseridas na membrana celular do hospedeiro, formando a estrutura do poro, para a passagem de proteínas efetoras, como Tir.
Fonte: Adaptado de Vallance e Finlay (2000).

Finalmente, a adesina intimina liga-se à porção central, extracelular, de Tir resultando na adesão íntima entre a bactéria e o enterócito. A interação entre intimina e Tir induz uma cascata de sinalização intracelular (DEAN et al., 2005), com o recrutamento da proteína adaptadora Nck (CAMPELLONE et al., 2002; GRUENHEID et al., 2001), a qual se liga diretamente ao domínio SH2 da proteína N-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*). O complexo Nck/N-WASP recruta e ativa diretamente as proteínas Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) culminando na mobilização de diferentes proteínas do citoesqueleto e dos microfilamentos de actina que se condensam logo abaixo do sítio de adesão da bactéria, resultando na formação de pedestal característica da lesão A/E (KALMAN et al., 1999; LOMMEL et al., 2001).

O fenótipo da lesão A/E é codificado por genes contidos em uma ilha de patogenicidade cromossomal de 35,5 Kb, denominada *locus of enterocyte effacement* (região LEE) (McDANIEL et al., 1995). Conforme mostrado na **figura 4**, os genes que fazem parte da região LEE estão organizados em cinco principais

operons LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (MELLIES et al., 1999; SANCHES-SANMARTIN et al., 2001).

Figura 4 - Representação esquemática dos fatores de virulência de EPEC, codificados em LEE e no plasmídeo EAF.



Fonte: Dean, Maresca e Kenny (2005).

Os operons LEE1, LEE2 e LEE3 contêm os genes *esc* e *sep* que codificam componentes do SSTT além do gene *ler*, que regula positivamente os genes localizados em LEE (ELLIOTT et al., 2000). LEE4 é a região codificadora das proteínas Esps, secretadas pelo SSTT como: EspA, EspB, EspD e EspF (SANCHES-SANMARTIN et al., 2001). O operon LEE5 contém o gene *eae* (*E. coli attachment effacement)*, o gene *tir* (*translocated intimin receptor*) e *cesT*, os quais codificam respectivamente, a intimina, uma adesina de membrana externa de 94 kDa responsável pela adesão íntima da bactéria à célula epitelial (FRANKEL et al., 1994; JERSE et al., 1990); o seu receptor Tir, o qual é translocado para o interior da célula epitelial através do SSTT (KENNY; WARAWA, 2001) e CesT a chaperonina das proteínas Tir e Map (SANCHES-SANMARTIN et al., 2001).

Muitas linhagens de EPEC produzem um padrão de aderência característico, em cultura de células epiteliais chamado adesão localizada (AL). Neste padrão, as bactérias ligam-se em áreas localizadas da superfície celular, formando

microcolônias compactas (grupos bacterianos), que podem ser visualizadas após o contato da bactéria com as células epiteliais por 3 horas. Esse fenômeno está associado à presença do plasmídeo EAF (pEAF), que carrega a sequência chamada EAF (fator de aderência de EPEC). Esse plasmídeo é o fator de virulência extra LEE mais bem estudado, presente apenas nas EPEC típicas, e ausentes, nas amostras de EPEC atípicas. Em EAF encontra–se o operon *bfp* (*bundle forming pilus*) que codifica a fímbria BFP, cujo fenótipo é evidenciado pelo padrão AL em células epiteliais cultivadas *in vitro* (GIRON et al., 1991; TRABULSI et al., 2002).

A fímbria BFP, além de possibilitar a agregação bacteriana em microcolônias, também está envolvida no evento de dispersão (KNUTTON et al., 1999), auxiliando na infecção de outros sítios e tornando a colonização mais eficiente. Além disso, EAF possui três ORF`s denominadas *perA*, *perB* e *perC* (*plasmid-encoded regulator*), cujas proteínas codificadas formam um complexo regulador capaz de ativar a transcrição de alguns genes de LEE, através do gene *ler* (*LEE-encoded regulator*), bem como do operon *bfp* no próprio plasmídeo EAF.

1.3.4 Epidemiologia de EPEC e EHEC

E. coli é responsável por até 30% do número total de patógenos diarréicos em alguns países, com elevado índice de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade (BAKHSHI et al., 2012).

As vias de transmissão destes patógenos estão associadas à ingestão de água e alimentos contaminados e ao contato com pessoas ou animais infectados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Embora EPEC tenha sido a primeira categoria de *E. coli* diarreiogênica a ser identificada, seu potencial patogênico só foi confirmado e amplamente aceito após estudos realizados com voluntários, onde cepas de EPEC foram ingeridas, confirmando-se os sintomas evidentes de diarreia (LEVINE et al., 1978).

Até meados da década de 90, tEPEC era considerada o principal agente etiológico da diarreia infantil no Brasil (GOMES et al., 1991; ROSA et al., 1998; SCALETSKY et al., 1999; TOLEDO et al., 1983; TRABULSI et al., 1961, 1985) e em

outros países em desenvolvimento, embora fosse rara em países desenvolvidos (NATARO; KAPER, 1998).

A categoria das EPEC é a principal causa de diarreia aguda em crianças menores de dois anos nos países em desenvolvimento onde este patotipo é endêmico (OCHOA et al., 2008). Em uma revisão sistemática de 266 estudos publicados entre 1990 e 2002 sobre causas de diarreia em crianças de até quatro anos de idade, EPEC foi identificada como responsável por uma média de 15,6% das internações por diarreia (LANATA et al., 2002).

Estudos mostraram que houve uma aparente diminuição de tEPEC e uma emergência da aEPEC tanto em países em desenvolvimento como em países industrializados (CLEMENTS et al., 2012; HERNANDES et al., 2009; TRABULSI et al., 2002). Em países desenvolvidos, como a Austrália, aEPEC representou 71% dentre as DEC isoladas em crianças abaixo de 14 anos com diarreia persistente (NGUYEN et al., 2006). Assim, também na Noruega, em um estudo realizado em crianças menores de dois anos de idade, EPEC foi isolada em 44 de um total de 440 pacientes, sendo apenas em um deles identificada como tEPEC (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003).

Embora alguns estudos mostrem que pacientes infectados com aEPEC têm uma diarreia suave, não desidratante e não inflamatória (NGUYEN et al., 2006), a duração da enfermidade é significativamente mais longa e duradoura do que aquelas causadas por outros patógenos, sendo um indicativo de que aEPEC tem a característica de persistir no intestino por um maior período do que outras *E. coli* diarreiogênicas (OCHOA et al., 2008).

No Brasil pesquisas relataram a preseça de EPEC em: 15,7% em Teresina (NUNES et al., 2012); 10% em crianças saudáveis de Campinas (SP) (de MOURA et al., 2012); 12,9% do grupo controle e 8% dos pacientes com diarreia no Rio de Janeiro (REGUA-MANGIA et al., 2004); 9,4% de aEPEC em Salvador (BUERIS et al., 2007); 9,3% de aEPEC e 1,7% de tEPEC em João Pessoa (MORENO et al., 2010); 5,4% de aEPEC em São Paulo (ARAÚJO et al., 2007); 4% de aEPEC e 2,1% de tEPEC em Porto Velho (ORLANDI et al., 2006).

No período de um ano, amostras de crianças pré-escolares de uma tribo na Índia com diarreia aguda foram analisadas, e as DEC representaram 41% de todos os patógenos isolados. Dentre as DEC, as EPEC tiveram uma prevalência de 26,2% e as EHEC de 1,9% (ANVIKAR et al., 2008). Em outra investigação, em amostras de crianças com diarreia aguda no Irã foi encontrada 12,6% de prevalência de EPEC (JAFARI et al., 2009).

Atualmente, STEC representam um dos mais importantes grupos de patógenos alimentares do mundo. O consumo de alimentos como salsichas, leites não pasteurizados, alface, melão cantaloupe, suco de maçã, brotos de rabanete, espinafre tem sido associado a surtos, sendo a dose infectante estimada como inferior a 100 células (KAPER et al., 2004). O principal reservatório de STEC é o trato intestinal bovino e a existência de grandes rebanhos bovinos é um fator que favorece a disseminação dessas bactérias. A taxa de isolamento de STEC em bovinos nas diferentes regiões do Brasil variou de 10 a 83% (CERQUEIRA, 1999; FARAH et al., 2007; IRINO et al., 2005; LEOMIL et al., 2003; TIMM et al., 2007). Dados recentes mostram que o gado brasileiro não é somente um reservatório de STEC incluindo as EHEC, mas também uma fonte de infecção para humanos já que alguns sorotipos associados com doenças severas foram isolados destes (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; KÜHNE, 2004).

Guth et al. (2002) e Irino et al. (2002) descreveram diversos casos de infecções por STEC no Brasil principalmente em crianças. Ainda, Vaz et al. (2004), realizaram um estudo retrospectivo em 2607 amostras isoladas de casos diarréicos entre 1976 e 1999 de crianças menores de cinco anos e adultos imunocomprometidos, no estado de São Paulo, em que foi isolado 1,1% de STEC. Aidar-Ugrinovich et al. (2007) relataram a ocorrência de STEC em 10% de 546 amostras fecais de gado em São Paulo, não sendo encontrado o sorotipo O157:H7.

O sorotipo mais estudado das EHEC é o O157:H7, sendo considerado o mais virulento e frequente (RILEY et al., 1983). No entanto, o grupo das STEC compreende quase 250 sorotipos diferentes e aproximadamente 100 destes, são associados a doenças (JOHNSON et al., 2006). Alguns como O157:NM, O26:H11, O111:NM, O121:H19, O145:NM, O111:H8 e O113:H21 possuem potencial

patogênico similar à O157:H7. Outros sorogrupos também associados são O55, O91, O103 e O119 (CAPRIOLI et al., 2005; PATON; PATON, 1998; VAZ et al., 2004;).

EHEC constitui-se hoje como um dos principais problemas de saúde pública em vários países, dentre eles Argentina, Estados Unidos, Canadá e Japão, além de vários países da Europa, e existem vários relatos de casos na América Latina, principalmente Uruguai e Chile (BEUTIN, 2006; KAPER; O´BRIEN, 1998). Na Argentina, por exemplo, o índice de SHU é extremamente elevado, em torno de 12,2 casos a cada 100.000 crianças menores de cinco anos em 2002 (OGURA et al., 2007), sendo *E. coli* O157:H7 o principal sorotipo causador dessa síndrome.

1.4 Detecção de intimina

Em 1985, uma proteína de membrana externa (OMP) presente em EPEC e não em ETEC, foi descrita como uma adesina de 94 kDa. Achava-se que essa proteína era produto do plasmídeo EAF, pois era consistentemente observada em isolados de EPEC que continham o plasmídeo, e não em isolados curados do plasmídeo (LEVINE et al., 1985).

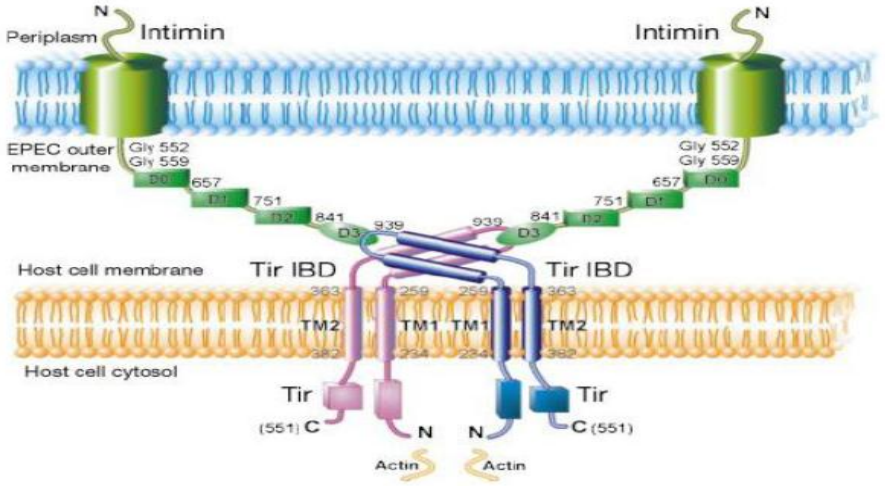
Em 1990, o gene *eae* foi identificado, e havia a hipótese de seu envolvimento na lesão A/E, pois mutantes desse gene perderam a capacidade de produzir a lesão em cultivo celular (JERSE et al., 1990). Em 1991, Jerse e Kaper identificaram uma proteína de 94 kDa como produto do gene *eae* utilizando um antissoro que reconheceu essa proteína nos isolados E2348/69 [cepa protótipo de tEPEC (O127:H6)] e JPN15 (E2348/69 curado do plasmídeo EAF) e não em mutantes do gene *eae*.

Um grande locus cromossomal chamado LEE que codifica as proteínas envolvidas na lesão A/E foi descrito (McDANIEL et al., 1995), e mostrou que esta região é conservada em patógenos intestinais, que produzem esta lesão (EPEC, EHEC, *E. coli* diarreiogênica de coelhos (RDEC-1), *Escherichia albertii* e *Citrobacter freundii* biotipo 4280).

Por conseguinte, Agin e Wolf (1997) obtiveram um antissoro em coelhos imunizados com a porção C-terminal da intimina de RDEC-1 clonada e expressa em *E. coli*, utilizando iniciadores específicos descritos por Frankel et al. (1994). O antissoro mostrou reatividade por *immunoblotting* contra extratos totais de isolados de EPEC (O111) e EHEC (O26), menos para E2348/69 e O157:H7, que mostrou baixa identidade com a porção C-terminal da intimina de RDEC-1. Este estudo sugeriu que poderia existir diferentes famílias de intimina e que essas diferenças não estariam correlacionadas com sorogrupo nem hospedeiro.

Assim, o gene *eae* de diversos isolados de EPEC e STEC já foi clonado, seqüenciado e apresenta uma região 5'-terminal altamente conservada, que compreende os aminoácidos 388-667 (Int $_{388\text{-}667}$). Entretanto, a região 3'-terminal desta proteína apresenta uma composição variável, o que define os tipos e subtipos de intimina conhecidos pelas letras do alfabeto grego como α, α2, β1 a –3, γ1, γ2, δ, ε, ε2 a–4, ζ, η, η2, θ, ι, ι2, κ, λ, ν, ξ, ο, π, ρ e σ (ADU-BOBIE et al., 1998; AGIN; WOLF, 1997; BATCHELOR et al., 1999; BEUTIN et al., 2004; BLANCO et al., 2004, 2006; CHINA et al., 1999; FRANKEL et al., 1994; OSWALD et al., 2000; RAMACHANDRAN et al., 2003; REID et al., 1999; ZHANG et al., 2002;), (**Figura 5**).

Figura 5 - Interação entre intimina e seu receptor Tir presente na membrana da célula hospedeira.



Intimina está representada em verde com os resíduos da porção C-terminal numerados. Os domínios tipo imunoglobulina (D0, D1 e D2) estão representados em retângulos, e o domínio tipo lecitina (D3) responsável pela ligação ao Tir em oval. Tir está representado como dímero (em azul escuro e rosa), com o domínio de ligação a intimina (IBD) extracelular e as porções N e C-terminais intracelulares. Fonte: adaptado de Luo et al. (2000).

1.5 Anticorpos

Historicamente, imunidade significava proteção contra doenças, em particular contra doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico, e a sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O sistema imune é um sistema de defesa versátil, responsável pela proteção contra a invasão de micro-organismos patogênicos. Pode ser dividido em imunidade inata e adquirida, componente menos específico e mais específico, respectivamente. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra os micro-organismos e consiste de peptídeos antimicrobianos, fagócitos, células *killer* e sistema complemento, o qual age rapidamente frente a uma determinada infecção; enquanto a imunidade adquirida consiste na resposta humoral e celular, mediadas por linfócitos B e T, respectivamente e é caracterizada pela grande especificidade frente as distintas moléculas, além da capacidade de responder vigorosamente a repetidas exposições ao mesmo antígeno (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Considerando-se a imunidade humoral, essa especificidade se deve à interação dos antígenos com os receptores presentes nas membranas dos linfócitos B, que inicia uma cascata de sinalização culminando com o desenvolvimento destas células em plasmócitos, células produtoras de anticorpos, moléculas chaves do reconhecimento antigênico (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Anticorpos são moléculas protéicas produzidas por linfócitos B que reconhecem substâncias estranhas ao organismo. A estrutura geral de um anticorpo consiste em uma molécula bifuncional, que compreende dois sítios de ligação ao antígeno (Fab), e um sítio efetor (Fc) no outro lado da molécula (ALZARI et al., 1988). Enquanto o sítio efetor é altamente constante, o sítio de ligação ao antígeno é bastante diverso, devido à recombinação somática e mutagênese, constituindo, portanto, as regiões variáveis (AMIT et al., 1986). As regiões constantes são necessárias para a oligomerização nos sítios de ligação ao antígeno, aumentando a avidez do anticorpo pelo antígeno (BURTON; WOOF, 1992).

Analisando o DNA, estima-se que um organismo humano utilize cerca de 150 mil proteínas diferentes em sua constituição; em comparação, calcula-se que entre 10 a 100 milhões de anticorpos diferentes possam ser produzidos por um só indivíduo (ABBAS et al., 1994). Há, portanto, cerca de 100 mil vezes mais variedades de anticorpos do que os outros componentes protéicos juntos.

Todas as imunoglobulinas têm uma estrutura de quatro cadeias como unidade básica. Elas são compostas de duas cadeias leves idênticas (24 kDa) e duas cadeias pesadas idênticas (55-70 kDa) (ABBAS; LICHTEMAN, 2005). As cadeias são unidas por pontes dissulfeto e por uma extensa rede de interações moleculares intra e inter-cadeias (ROITT, 1987).

Depois que as sequências de aminoácidos de muitas cadeias pesadas e leves diferentes foram comparadas, ficou claro que ambas as cadeias pesadas e leves poderiam ser divididas em duas regiões baseando-se na variabilidade da sequência de aminoácidos (**Figura 6).**

Tanto as cadeias leves quanto as cadeias pesadas das imunoglobulinas possuem regiões aminoterminais variáveis e carboxiterminais constantes. As cadeias leves são compostas por uma região variável (V_L) e uma região constante (C_L), enquanto as cadeias pesadas são compostas por uma região variável (V_H) e três ou quatro regiões constantes (C_H) (GOLDSBY et al., 2000). A justaposição das regiões variáveis de ambas as cadeias formam dois sítios de ligação ao antígeno (região Fab), enquanto as regiões constantes são separadas do local de ligação ao antígeno e não participam do seu reconhecimento. Apesar dos domínios constantes das cadeias leves não participarem das funções efetoras dos anticorpos e não se ligarem às membranas celulares, os domínios constantes das cadeias pesadas (porção Fc) interagem com outras moléculas efetoras e células do sistema imune, participando como mediadores da maioria das funções biológicas dos anticorpos.

A região da dobradiça é a região com a qual os braços da molécula de anticorpo formam um Y. É chamada de região da dobradiça porque há uma flexibilidade na molécula nesse ponto, fazendo a junção das porções Fab com a porção Fc da molécula de anticorpo (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ROITT et al, 2001).

Figura 6 - Estrutura de uma molécula de anticorpo.

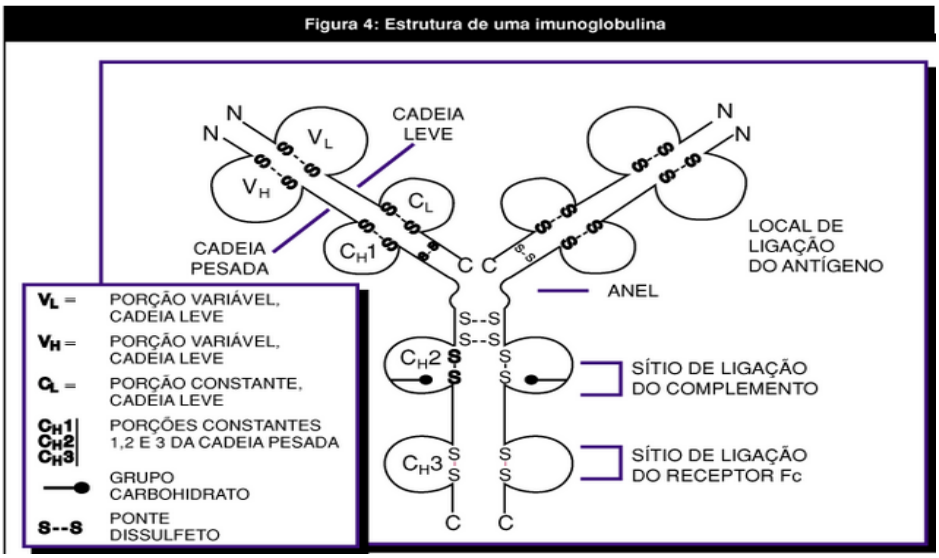


Diagrama de uma molécula de IgG. As regiões de ligação de antígenos são formadas pela justaposição dos domínios variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH). As regiões C das cadeias pesadas terminam em uma cauda. A localização das regiões de ligação do complemento e do receptor Fc nas regiões constantes das cadeias pesadas é uma estimativa.
Fonte: Abbas et al., (1994).

A maior parte das diferenças nas sequências entre os diversos anticorpos está confinada a três pequenas extensões nas regiões variáveis (V) das cadeias pesadas e leves, chamadas de segmentos hipervariáveis. Estas regiões contêm aproximadamente 10 aminoácidos e são mantidas no lugar por uma estrutura de sequências mais conservadas que forma o domínio Ig da região variável. Na molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis do domínio V_L e do domínio V_H se aproximam, na sua estrutura tridimensional, para formar uma superfície de ligação a antígenos. Como essa sequência é complementar à estrutura tridimensional do antígeno que é ligado, estas regiões também são conhecidas como regiões determinantes de complementariedade (CDRs) (**Figura 7**). As regiões entre os CDRs que exibem menos variabilidade na região variável são chamadas de regiões *frameworks* (FRs), ou regiões do arcabouço, e atuam como se fossem andaimes que suportam as três voltas que constituem as CDRs (ABBAS; LICHTMAN, 2005; GOLDSBY et al., 2000; MAK; SAUNDERS, 2008).

Figura 7 - Regiões hipervariável e *framework* nas moléculas de Ig.

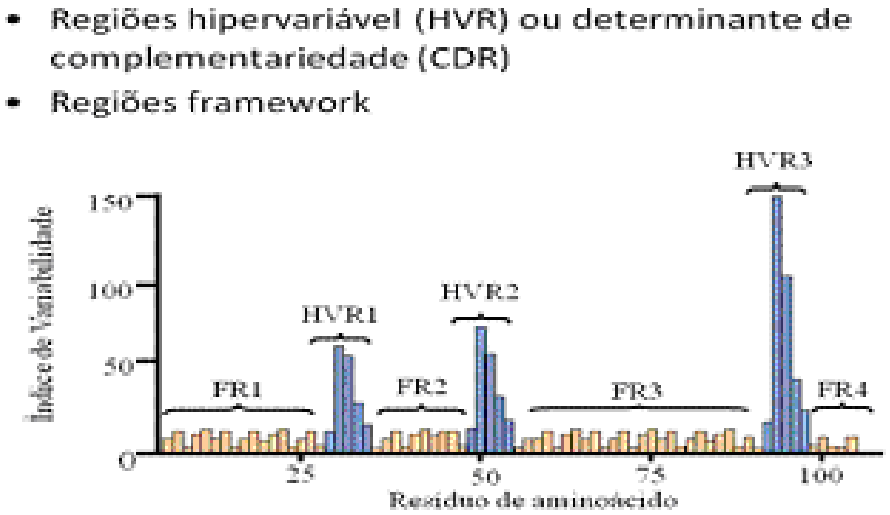


Gráfico da variabilidade de aminoácidos nas moléculas de Ig. Os histogramas demonstram a extensão da variabilidade definida como o número de diferenças em cada aminoácido em várias cadeias leves sequenciadas de forma independente em relação ao número do aminoácido medido a partir da porção aminoterminal.
Fonte: Mayer (2000).

A região constante apresenta pequenas variações na sua sequência de aminoácidos, diferentemente da região variável. Essas variações são responsáveis pela determinação das classes ou isotipos dos anticorpos, interferindo no tamanho, carga, além da solubilidade, na distribuição e funções que desempenham. As cadeias pesadas são classificadas em cinco tipos, designadas por letras gregas: *gamma (γ), mu (μ) , delta (δ), alpha (α) e epsilon (ε)*, podendo ser combinadas com qualquer um dos dois tipos de cadeias leves *kappa (k)* ou *l amda* (λ) (ABBAS; LICHTMAN , 2005; MAK; SAUNDERS, 2008).

As moléculas de anticorpos podem ser divididas em classes e subclasses distintas com base nas diferenças na estrutura das regiões C das cadeias pesadas (ABBAS; LICHTMAN , 2005; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2008).

As classes de anticorpos também são chamadas de isótipos e são denominadas IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Nos seres humanos os isótipos IgA e IgG podem ainda ser subdivididos em subclasses, ou subtipos, intimamente relacionados, o que não ocorre com as classes IgM, IgD e IgE.

Fragmentos de anticorpos produzidos por digestão proteolítica têm-se mostrado úteis na elucidação das relações de estrutura e função em imunoglobulinas (ELGERT, 2009).

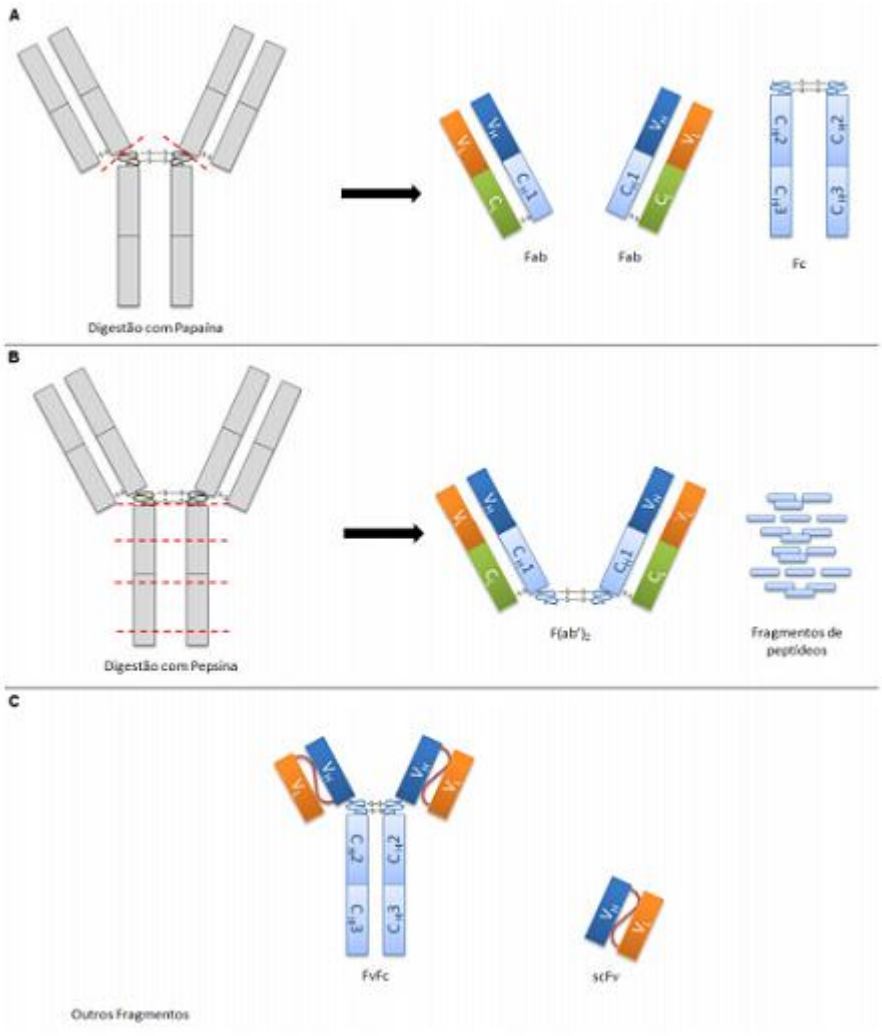
A molécula de anticorpo pode ser fragmentada proteoliticamente. Nas moléculas de IgG, a dobradiça entre C_H1 e C_H2 das cadeias pesadas é a região mais suscetível à clivagem proteolítica. Quando a IgG é tratada com a enzima papaína, a enzima age na região de dobradiça e cliva a IgG em três pedaços separados: dois Fabs inteiros, e a região Fc (**Figura 8a**). Quando se usa a pepsina para clivar a IgG, a proteólise é restrita à porção carboxi-terminal da região de dobradiça, gerando um fragmento que liga ao antígeno (Fab) e que contém a dobradiça e as pontes de dissulfeto entre as cadeias instactas. Fragmentos Fab que retêm a região da dobradiça são chamados de Fab', quando as pontes de dissulfeto entre as cadeias são preservadas, os dois fragmentos Fab' permanecem ligados em uma forma conhecida como $F(ab')_2$ (**Figura 8b**).

Os fragmentos Fab' e $F(ab')_2$ são ferramentas experimentais úteis, uma vez que podem se ligar ao antígeno sem ativar os mecanismos efetores dependentes do fragmento Fc (HAYDEN et al, 1997; HOLLIGER; HUDSON, 2005; VAZ; FARIA, 1993).

Outros fragmentos de anticorpos podem ser obtidos sem perder sua função biológica. O fragmento scFv (*single chain variable fragment)* composto pelas cadeias variáveis leve e pesada pode ser obtido na forma recombinante (**Figura 8c).** Esse fragmento, assim como os dois tipos de Fab retêm a atividade ligante ao antígeno e não tem função efetora. Esses fragmentos têm sido a forma mais corrente e podem ser expressos em bactérias e em eucariotos inferiores (CHOI et al., 2004; CUNHA et al., 2004).

Outras variações de fragmentos também podem ser expressas em sistemas microbianos, como por exemplo o FvFc, que constitui-se em um scFv unido aos domínios C_H2 e C_H3 de IgG (**Figura 8c),** retendo a capacidade de ligação ao antígeno e a atividade efetora. A afinidade desse fragmento é comparável com o anticorpo monoclonal parental (ANDRADE et al., 2000, 2005; MARANHÃO; BRÍGIDO, 2000).

Figura 8 - Fragmentos proteolíticos de uma molécula de IgG.



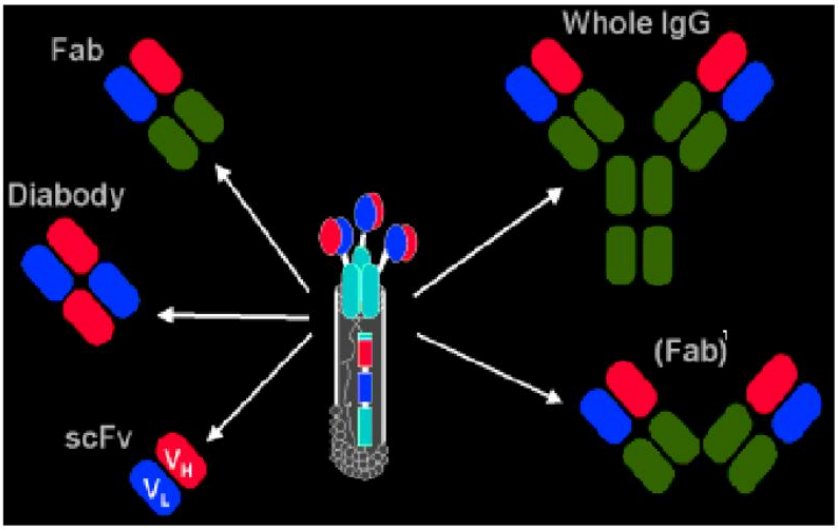
Molécula de IgG é clivada pelas enzimas papaína (A) e pepsina (B) no local indicado pelas linhas tracejadas. A digestão pela papaína permite a sepração de duas regiões que ligam antígenos (fragmentos Fab) da porção da molécula de IgG que liga o complemento e os receptores Fc (fragmento Fc). A pepsina gera um único fragmento bivalente que liga antígenos, $F(ab')_2$. Em (C) está representado outros fragmentos que podem ser obtidos por engenharia de anticorpos. Um fragmentos FvFc que possui a região de ligação ao antígeno e a e a efetora, e o scFv de ligação ao antígeno. O fragmento scFv possui um peptídeo conector ou *linker* (vermelho) que liga as cadeias variáveis leve e pesada.
Fonte: Adaptado de Lipman et al. (2005).

A estrutura dos domínios da molécula de um anticorpo é particularmente acessível à engenharia de proteínas. Uma vez que anticorpos completos são moléculas grandes (150 kDa), pequenos fragmentos derivados de IgG podem ser construídos para reter a atividade de ligação ao antígeno (Fab, Fv) ou a função efetora (Fc). Estes anticorpos pequenos (12-50 kDa) podem ser acoplados a

radioisótopos ou outros marcadores e podem ser usados para localizar o antígeno alvo ou usados em terapia. Estes fragmentos são de grande importância farmacêutica para o uso *"in vivo"*, pois apresentam alta capacidade de difusão e penetração em tecidos. A **figura 9** exemplifica a fragmentação da molécula de IgG em pedaços menores que podem ser usados em diferentes abordagens.

Técnicas de biologia molecular, como a utilização da PCR (Polymerase Chain Reaction), propocionaram a amplificação de genes de imunoglobulinas (BORREBAECK, 1995; BRUNT, 1990; LARRICK et al., 1989; MALMBORG;) visando-se substituir o uso de animais na produção de anticorpos por uma nova metodologia de produção *in vitro.*

Figura 9 - Fragmentação da molécula de IgG em menores pedaços.



Fonte: Nery (2006).

Os métodos atualmente usados para clonagem de genes que codificam as regiões variáveis das cadeias leve e pesada, baseiam-se na tecnologia de anticorpos monoclonais, onde uma população de células idênticas produz anticorpos homogêneos e específicos (LAGERKVIST et al., 1995), ou de anticorpos policlonais, obtidos por tipos diferentes de células produtoras de anticorpos em animais, ou de pacientes imunizados (BARBAS et al., 1991) ou até mesmo de anticorpos recombinantes que será descrito adiante (HAGEMEYER et al., 2009).

1.6 Tecnologia de anticorpos recombinantes

Anticorpos gerados a partir da resposta imune natural ou através de imunização (policlonais) apresentam-se como uma mistura de moléculas com diferentes afinidades e especificidades, sendo produzidos em quantidades limitadas (MURPHY et al., 2008). Em contraste aos anticorpos policlonais, os monoclonais apresentam homogeneidade, alta especificidade e são produzidos ilimitadamente, através da cultura de células especializadas e um extensivo envolvimento de tempo e trabalho (SVENNERHOLM et al., 1986).

A tecnologia do DNA recombinante permite o desenvolvimento de construções que mantenham ou aperfeiçoem as propriedades funcionais de um anticorpo. Atualmente é possível a produção de fragmentos de anticorpos, como proteínas recombinantes, utilizando diferentes sistemas de expressão (HAGEMEYER et al., 2009).

Diversas técnicas para a aplicação de anticorpos recombinantes e seus fragmentos foram introduzidas, dentre elas alguns refinamentos na estrutura das moléculas como a conversão de anticorpos murinos em humanos por meio da humanização de anticorpos (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002); geração de anticorpos quiméricos (metade humano e metade murino) substituindo a porção Fc do anticorpo por um Fc humano apresentando um certo grau de imunogenicidade e a apresentação de anticorpos na superfície de fagos filamentosos, técnica comumente conhecida como *Phage Display*, permitindo a geração de milhões de diferentes variantes de peptídeos ou proteínas, sendo sua principal aplicação no isolamento de anticorpos monoclonais usando uma biblioteca de anticorpos bem representativa apresentada em fagos (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Dentre as diferentes construções baseadas na estrutura do anticorpo, podemos citar os fragmentos variáveis em cadeia única (*single chain Fragments variable* ou scFv). O scFv é o menor fragmento de anticorpo que ainda retém a capacidade de se combinar com o antígeno. Esses fragmentos são constituídos dos domínios variáveis (V), mas não dos domínios constantes (C) da molécula de anticorpo (GIVOL, 1991).

1.6.1 Anticorpos de cadeia única (scFv)

Pequenos fragmentos de anticorpos recombinantes estão na vanguarda de diagnóstico in vivo e terapia. Essas unidades possuem uma melhor distribuição e depuração mais rápida do que as moléculas maiores. Entre estes, os fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) estão emergindo como alternativas credíveis. Estas proteínas mostraram que têm as mesmas especificidades e afinidades para os seus antígenos, como o anticorpo monoclonal (MAb) (RAJAWAT et al., 2011).

Os fragmentos Fv (Fração variável) não são covalentemente ligados, desta forma os heterodímeros dos domínios V_H e V_L podem dissociar facilmente (BRINKMANN et al., 1997). No entanto, fragmentos Fv podem ser construídos de forma a não se dissociarem. Isto porque fragmentos Fv podem ter seus domínios variáveis (V_H e V_L) unidos por um pequeno peptídio hidrofílico e flexível, criando um fragmento Fv de cadeia única- scFv (ABRAHAM et al., 1995; GOCHSHUBER et al., 1990).

Os genes que codificam para esses domínios podem ser especificamente amplificados, clonados individualmente, e posteriormente sub-clonados para a formação deste segmento único de DNA, constituído de cerca de 740 pares de bases (HUSTON et al., 1988).

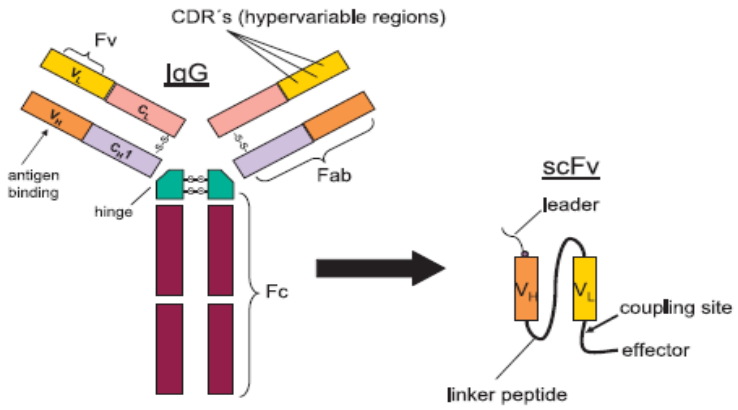
Para formar o segmento único de DNA, o domínio variável da cadeia pesada (V_H) é ligado ao domínio variável da cadeia leve (V_L), através de uma sequência que codifica para um polipeptídeo de ligação flexível (*linker*). Esse polipeptídeo pode apresentar tamanho e composição variável, prevenindo a dissociação entre os domínios, além de influenciar na estrutura e valência do scFv. A inserção do polipeptídeo ligante permite o distanciamento entre a porção C-terminal de um domínio e a porção N-terminal do outro domínio (HOLLIGER; HUDSON, 2005; LEONG; CHEN, 2008)

Dessa forma, o "linker" proporciona estabilidade conformacional à proteína, garantindo afinidade, normalmente sendo formado por aminoácidos que garantem flexibilidade, como glicinas e serinas.

Entretanto, estudos demonstraram que ao modificar o linker, tornando-se seus aminoácidos centrais distribuídos ao acaso, obteve-se um anticorpo na população gerada, com significativo aumento na produção do mesmo, sem alterar sua afinidade pelo antígeno ou aumentar a toxicidade para a bactéria (TURNER et al., 1997).

Na **Figura 10** observar-se a ilustração de uma molécula de IgG e seu derivado, um fragmento variável em cadeia única (scFv).

Figura 10 - Ilustração de uma molécula de IgG e seu derivado, scFv.



Fonte: Adaptado de Hagemeyer et al. (2009).

Diferentes sistemas de expressão estão disponíveis para a produção de scFv, podendo-se optar entre células procarióticas ou eucarióticas, desde que seja mantida a funcionalidade dessa molécula. Verma e colaboradores (1998) analisaram comparativamente os sistemas de expressão em bactérias, leveduras, células de inseto e células de mamíferos e concluíram que o sistema de expressão de anticorpos (ou seus fragmentos) deve ser escolhido caso a caso, levando em consideração alguns fatores como: a infra-estrutura e experiência do laboratório; a variante do anticorpo a ser explorada e sua citotoxicidade; a necessidade de modificações pós-traducionais, bem como seu grau de complexidade; o rendimento e o grau de purezas desejados; aspectos regulatórios e de segurança; os custos esperados e, por fim os resultados de ensaios preliminares. Além disso, diversos fatores como solubilidade, estabilidade, tamanho e a sequência primária dos

aminoácidos também podem influenciar diretamente no rendimento e na atividade biológica da proteína.

Dentre as bactérias utilizadas como sistema de expressão, a *Escherichia coli* é o sistema de escolha para expressão de proteínas recombinantes, devido a facilidade de seu manuseio, baixo custo e rápido crescimento. Diversos trabalhos têm descrito alto rendimento da expressão de fragmentos de anticorpos nesta espécie bacteriana, chegando a 2 g/L (CARTER et al., 1992; RODRIGUES et al., 1992). A principal indicação da utilização deste sistema é para expressão de fragmentos de anticorpos desprovidos de modificações pós-traducionais. Duas estratégias são utilizadas para obtenção de scFv em *E. coli*: (i) Produção do fragmento no citoplasma bacteriano, na forma de corpúsculos de inclusão, seguida de *refolding* para recuperação de moléculas biologicamente ativas; (ii) Expressão da proteína recombinante fusionada a um peptídeo sinal, que propiciaria a sua secreção para o espaço periplasmático da célula bacteriana, no qual seria processada na conformação correta e na forma solúvel. Entretanto, a utilização de peptídeos sinais não garante a solubilidade da proteína, já que esta tende a se acumular no espaço periplasmático na forma de corpúsculos de inclusão, quando expressa em grandes quantidades. O sucesso para o processamento correto do fragmento do anticorpo no espaço periplasmático parece estar relacionado com a sequência primária dos aminoácidos nos domínios variáveis (KIPRIYANOV; LE GALL, 2004).

Os scFvs podem ser expressos em fusão a outras proteínas como a GST (*Glutathione S-Transferase*), a MBP (*Maltose-binding protein)* e a SUMO (*small ubiquitin-related modifier),* sem a intenção de beneficiar a atividade biológia destas para terapia, mas simplesmente para experimentos de imunoensaio (KERSCHBAUMER et al., 1997) ou então, para facilitar a metodologia de purificação (CHOUMET et al., 1999). Essas proteínas de fusão parecem apresentar atividade de chaperoninas, protegendo a proteína de interesse a elas fusionadas da degradação proteolítica, aumentando a solubilidade e o dobramento, e diminuindo significativamente a formação de corpos de inclusão. Em contraste, uma limitação desta metodologia, é a clivagem destas proteínas de fusão que pode ser ineficiente (ARBABI-GHAHROUDI; MACKENZIE, 2005).

Os scFvs têm sido usados em terapias (CARTER et al., 1992; CHESTER; HAWKIM, 1995) e diagnósticos, apresentando vantagens sobre anticorpos convencionais e anticorpos monoclonais, como biofármacos, atribuídas ao tamanho reduzido e a ausência da porção Fc (LEONG; CHEN, 2008; LORIMER et al., 1996; MILENIC et al, 1991; TURNER et al., 1997).

Constatou-se que estas moléculas possuem rápida circulação sanguínea, pois pacientes tratados com scFv apresentaram boa localização destes em apenas uma hora após a injeção (GEORGE et al., 1996). Também apresentam boa penetração em tecidos, teoricamente baixa imunogenicidade, baixa retenção nos rins e outros órgãos não-alvos, melhor penetração em tumores e são construídos facilmente. Possuem baixo custo comercial em larga escala, existindo a possibilidade reestruturá-los em função de melhorar sua atividade e produção (MILENIC et al, 1991). Além disso, devido a seu curto tempo de circulação e rápida eliminação do organismo, pode ser administrada em radioimunoterapias e desintoxicação de drogas (LEONG; CHEN, 2008; TURNER et al., 1997).

Diversas abordagens vem sendo utilizadas para a produção de moléculas de scFv, bem como a possibilidade de interação destas moléculas com outras proteínas para tratamento e diagnóstico de doenças como o câncer, podem eficientemente localizar tumores e diminuir massas tumorais por bloquear estes antígenos para qual sua especificidade foi desenhada (BATRA et al., 1992; KETTELEBOROUGH et al., 1994; LEONG; CHEN, 2008; LORIMER et al., 1996; MAHGOUB et al., 2012; WEISSER; HALL, 2009).

Moléculas de scFvs também foram desenvolvidas para a detecção de antígenos de diversas categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas.

Ozaki (2011), obteve o scFvLT, o qual foi capaz de reconhecer a toxina LT através de ensaios imunossorológicos, mas incapaz de neutralizar a atividade citotóxica da toxina, provando ser uma ferramenta com potencial para o diagnóstico de ETEC. Já Chung et al. (2008) produziram scFvs obtidos de uma biblioteca de fagos selecionados pela subunidade B de LT de ETEC. A subunidade B foi utilizada na forma monomérica e na forma pentamérica. Os anticorpos recombinantes

mostraram diferentes especificidades na reatividade com as diferentes formas da subunidade B de LT.

Bhaskaran et al. (2005) produziram scFv contra fímbria F5 de ETEC, que é um dos fatores de virulência para adesão no enterócito animal, utilizando o sistema pCANTAB obtendo scFv solúvel em *E coli* HB2151.

A partir de um anticorpo monoclonal anti-Stx2, Ma et al. (2008) construíram um scFv, que foi clonado em pCANTAB modificado (contendo 6 resíduos de histidina) sendo sugeridos pelos autores que este scFv anti-Stx2 poderá ser usado na prevenção e terapia de doenças causadas por EHEC.

Anticorpos recombinantes que reconhecem EspA e intimina de EHEC O157:H7 foram produzidos e selecionados a partir de células do baço de coelhos imunizados com a porção C-Terminal de intimina de O157:H7 e a molécula integral de EspA (KÜHNE et al., 2004), que reconheceu fracamente isolados dos sorogrupos O157 e O111 testados.

Menezes et al. (2011) obtiveram o scFv-intimina, o qual reconhece a proteína intimina presente no isolado protótipo de tEPEC e a proteína recombinante intimina purificada.

2 JUSTIFICATIVA

Como mencionado na introdução desse trabalho a intimina é uma adesina de 94 kDa presente na membrana externa da célula bacteriana nos diferentes sorotipos de EPEC e EHEC, o gene *eae* responsável pela transcrição dessa proteína já foi clonado e sequenciado e apresenta uma região 5'-terminal altamente conservada, e uma região 3'-terminal com uma composição variável (BATCHELOR et al., 1999).

Sendo assim, a região conservada da intimina que compreende os aminoácidos 388-667 (Int $_{388-667}$) pode ser considerada um excelente alvo para detecção de patógenos microbianos que causam a lesão A/E (BATCHELOR et al., 1999; KOGA et al., 2003). Nesse sentido, soros policlonais anti-intimina obtidos em coelhos contra esta região mostraram reatividade com alguns isolados de EPEC típica tanto por *immunoblotting*, imunofluorescência, imunomarcação com ouro coloidal ou por ensaio de *slot-blot* (BATCHELOR et al., 1999; KOGA et al., 2003).

Apesar disso, algumas tentativas de padronização de ensaios imunoenzimáticos com esses antissoros mostraram que, a conformação da parte conservada da intimina, que fica inserida na membrana externa da bactéria, com uma pequena porção exteriorizada, impede a perfeita interação do anticorpo a intimina na bactéria *in natura*.

Sabe-se, que anticorpos monoclonais são ferramentas importantes na detecção de diversos patógenos. Um anticorpo monoclonal anti-intimina foi caracterizado como IgG2b e 1 μg desse anticorpo reconheceu, por ELISA, 0,6 μg de intimina purificada com uma constante de dissociação de 1.3×10^{-8} M. No entanto, por *immunoblotting* de extratos bacterianos de isolados de EPEC e EHEC sua reatividade foi de 68,6%, reatividade essa muito inferior à observada com os anticorpos policlonais previamente descritos (MENEZES et al., 2010).

Essa menor reatividade do anticorpo monoclonal levou esses autores a produzir um anticorpo recombinante anti-intimina obtidos a partir da clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia única (scFv) que reconheceu tanto a intimina purificada, como a intimina expressa pelo isolado protótipo de EPEC típica (MENEZES et al., 2011).

A obtenção do scFv-intimina pela tecnologia de anticorpos recombinantes mostrou-se uma metodologia viável, pois a produção de anticorpos em um sistema tradicionalmente utilizado para a produção de proteínas heterólogas, possibilita a obtenção de moléculas específicas e sensíveis, com baixo custo e em elevadas concentrações. Essas características levaram ao objetivo do presente trabalho que foi a avaliação da reatividade do scFv-intimina para a sua utilização como método de diagnóstico rápido de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

3 OBJETIVO

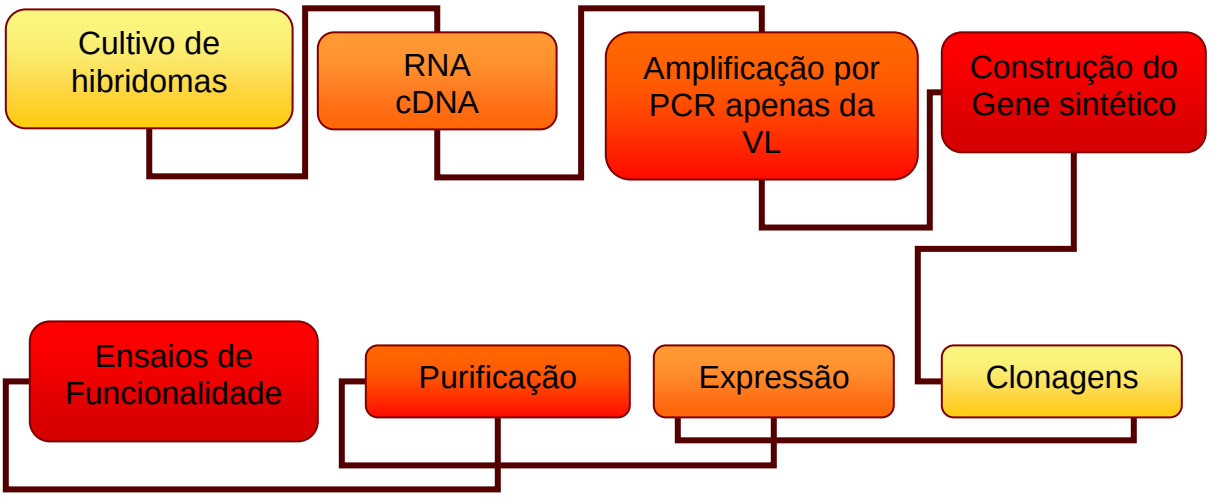
O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da reatividade do anticorpo recombinante (scFv) intimina para sua utilização no diagnóstico rápido de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC).

4 PLANO DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Na presente dissertação de mestrado, algumas etapas foram delineadas para o cumprimento dos ensaios descritos no organograma abaixo (**Figura 11**): (1) construção de um gene sintético scFv-intimina partindo do clone obtido previamente (MENEZES et al., 2011); (2) expressão e purificação do scFv-intimina; (3) análise da natureza das cadeias leve e pesada; (4) obtenção de uma nova cadeia leve; (5) construção de outro gene sintético utilizando a nova sequência da cadeia leve, em conjunto com a sequência do *linker* e da cadeia pesada já obtidas previamente (MENEZES et al., 2011); (6) confirmação das sequências de aminoácidos das cadeias leve e pesada, bem como do ligante peptídico; (7) Expressão e purificação do anticorpo e (8) análise da especificidade e reatividade por imunofluorescência indireta do scFv-intimina.

Portanto, apresentou-se neste trabalho, a avaliação do anticorpo recombinante (scFv) intimina e sua utilização no diagnóstico rápido de linhagens de EPEC e de EHEC.

Figura 11- Organograma das principais etapas de desenvolvimento do projeto.



5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Meios de cultura e soluções

Os meios de cultura empregados, assim como as soluções utilizadas nas técnicas de manipulação e análise de DNA descritas a seguir, foram realizados de acordo com Sambrook et al. (1989), exceto quando indicado. Os diversos reagentes foram de procedência Merck (Merck S.A., Darmstadt., Alemanha), Sigma (Sigma., St. Louis., Missouri., EUA) ou Synth (Synth S.A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil).

5.2 Amostras bacterianas

A linhagem bacteriana de *Escherichia coli* DH5α (DURFEE et al., 2008) foi utilizada para a propagação dos plasmídios recombinantes, enquanto a linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Merck), (MIROUX; WALKER, 1996) foi utilizada para expressão do anticorpo recombinante.

Os testes funcionais do anticorpo recombinante scFv-intimina foram padronizados com os cultivos bacterianos dos isolados E2348/69 (tEPEC) (LEVINE et al., 1985) e H10407 (ETEC) (EVANS; EVANS, 1973) em caldo LB, na ausência de antibiótico, a 37 ºC, 250 rpm por 16 h, sendo utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente, diante dos diversos isolados testados (**Quadro A.1** do **Anexo A).**

5.3 Vetores

Os vetores utilizados nas etapas de clonagem e expressão deste estudo foram:

- pAE (RAMOS et al., 2004): vetor de expressão com 2900 pb, que contém o gene de resistência à ampicilina, com sítio múltiplo de clonagem e promotor T7. A cauda de histidina é codificada na porção C-terminal da proteína recombinante.

- pSMT3 (BUTT et al., 2005): vetor de expressão com 5633 pb, que contém o gene de resistência à canamicina, com sítio múltiplo de clonagem e promotor T7. A cauda de histidina e a proteína de fusão SUMO são codificadas na porção N-terminal da proteína recombinante. Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Geraldo Santana Magalhães, do Laboratório de Imunopatologia, do Instituto Butantan.
- pPIG16 (BRIGIDO et al., 1993): vetor de expressão com 3170 pb, que contém o gene de resistência à ampicilina, com sítio múltiplo de clonagem e promotor T7. A cauda de histidina é codificada na porção N-terminal da proteína recombinante. Este vetor foi gentilmente cedido pela Dra. Andrea Maranhão da Universidade de Brasília.

5.4 Células eucarióticas

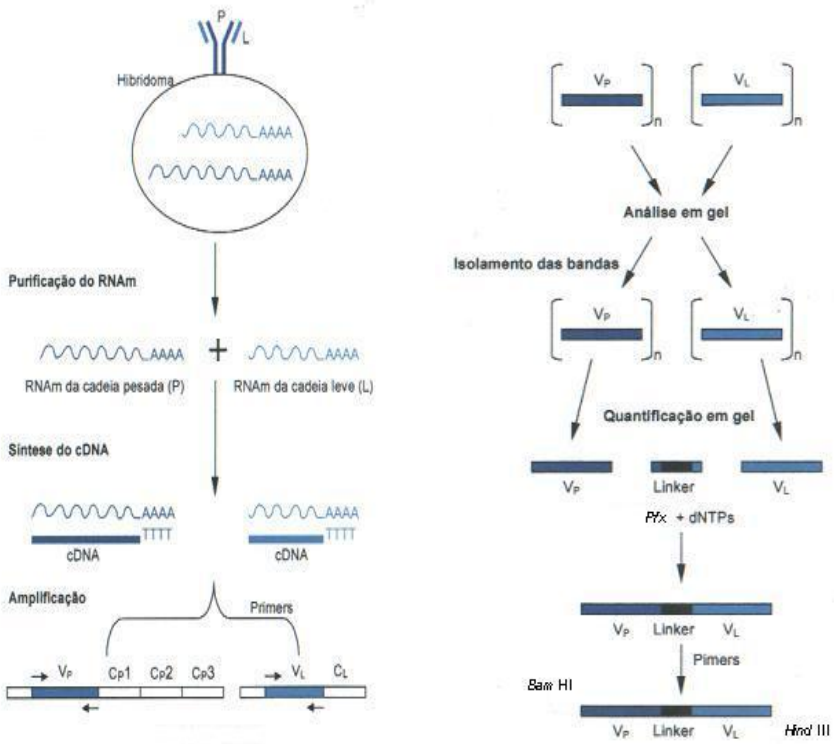
5.4.1 Hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-intimina

Os hibridomas produtores de anticorpos anti-intimina (IgG2b), foram obtidos por Koga (2003) e Menezes (2010).

5.4.2 Clonagem do fragmento variável do anticorpo IgG2b anti-intimina

As técnicas de biologia molecular que foram empregadas neste estudo estão descritas no manual do fabricante do kit *Recombinant Phage Antibody System* (GE Healthcare., Salt Lake., EUA) e por Sambrook et al. (1989). A **figura 12** apresenta esquematicamente as etapas de amplificação das cadeias leve e pesada do fragmento variável do anticorpo monoclonal anti-intimina para posterior clonagem no vetor de expressão (MENEZES et al., 2011).

Figura 12 - Esquema resumido do processo de clonagem.



Extração do mRNA a partir de hibridoma anti-intimina; síntese de cDNA; amplificação das cadeias pesada e leve da fração variável do anticorpo; isolamento e amplificação das bandas; ligação das bandas ao *linker* para a formação do scFv, contendo os sítios de restrição *Bam* HI e *Hind* III.
Fonte: Adaptado de *Recombinant Phage Antibody System Booklet* (2002).

5.4.3 Cultivo dos hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-intimina

Células dos hibridomas anti-intimina (IgG2b) foram descongeladas e cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75 cm^2 (TPP, Suíça) a 37 ^oC com 5% de CO_2 contendo meio RPMI (GibcoBRL., Itapevi., S.P., Brasil) acrescido de aminoácidos não essenciais (Sigma), piruvato de sódio (Sigma) e 10% de soro fetal bovino. Após a determinação do número total de células através da contagem em câmara de Neubauer, as mesmas foram distribuídas em alíquotas de 1 mL e centrifugadas a 259 x *g*, a 4 ºC (Centrifuge 5804 R – Eppendorf, Alemanha) para a formação do precipitado. Após a retirada do meio de cultura, as células precipitadas foram armazenadas a –80 ºC para posterior extração de RNA total.

5.4.4 Extração de RNA total dos hibridomas anti-intimina

O RNA total das células dos hibridomas anti-intimina foi extraído utilizando o número de células inferior a 3-4 X 10^6 células/mL, através do kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Após a eluição do RNA total com água *DNAse* e *RNAse free* (GibcoBRL., Itapevi., S.P., Brasil), o volume obtido foi fracionado em alíquotas de 20 μL, que foram armazenadas a –80 ºC. A análise da integridade do RNA foi realizada em gel de agarose 1,0% em tampão TBE (1 M de tris-base; 0,9 M de ácido bórico anidro e 10 mM de EDTA), corado com gelRed 1:50000.

5.4.5 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos obtidos por PCR, extrações plasmidiais e análises de restrição foram analisados em géis de agarose, preparados em diferentes concentrações, conforme indicado, dissolvendo-se a agarose (GE Healthcare) por aquecimento em tampão TAE (40 mM de tris-acetato; 2 mM de ácido etilenodiaminotetracético), e após o resfriamento da agarose foi adicionado um corante fluorescente de ácidos nucleicos ultra-sensível (GelRed™) na proporção de 1:50000. Uma alíquota de 5 μL das amostras a serem analisadas foi homogeneizada com 1 μL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%), submetida à migração sob corrente constante de 90 V juntamente com padrão molecular de 1 Kb DNA Ladder ou 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). O gel foi fotografado no sistema de captação de imagem AlphaImager™ 2200 (Alpha Innotech, EUA).

5.4.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído das células dos hibridomas anti-intimina, com a utilização do kit *First-Strand cDNA Synthesis* (Invitrogen., Dynal AS., Oslo., Norway), dos iniciadores *random primer* ou oligo (dT) ou ainda os iniciadores de cadeia constante leve K18 (**Quadro 1**), segundo as

recomendações do fabricante. Um volume de 20 μL de RNA total foi aquecido a 65 ºC por 10 min e resfriado em gelo por 2 min. A seguir, foram adicionados 11 μL do *Bulk first-strand mix*, 1 μL de solução de DTT e 1 μL de iniciadores totalizando um volume final de 33 μL. Após a homogeneização, a reação foi incubada a 37 ºC por 1 h.

Quadro 1 - Lista dos iniciadores utilizados para obtenção de cadeia leve dos anticorpos.

TIPO DE CADEIA	NOME	SEQUÊNCIA
Cadeia leve constante:	K18	5' TAC AGT TGG TGC AGC ATC 3'
Cadeia leve variável:	353	5' GAC ATT GTG ATG ACC CAG TCT 3'
	362	5' GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT 3'
	364	5' GAT ATT GTG ATA ACC CAG 3'
	365	5' GAC ATT GTG CTG ACC CAA TCT 3'
	390	5' GAT ATT GTG CTA ACT CAG TCT 3'
	391	5' GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT 3'
	392	5' GAC ATC CAG CTG ACT CAG TCT 3'
	393	5' CAA ATT GTT CTC ACC CAG TCT 3'
	394	5' CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA 3'

5.4.7 Amplificação da cadeia leve da porção variável do anticorpo monoclonal anti-intimina pela Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

Uma vez realizada a síntese de cDNA, este foi utilizado como molde para a amplificação da cadeia leve da porção variável do anticorpo monoclonal anti-intimina.

Para a amplificação do cDNA por PCR a partir da extremidade 5', foi utilizada uma biblioteca constituída de 9 oligonucleotídeos, e para a amplificação a partir da extremidade 3' foi utilizado o oligonucleotídeo K18 como mostrado no quadro 1. Nesta reação foram utilizados 2 μL do cDNA, 0,2 μM de cada oligonucleotídeo (quadro 1), 1 μL de dNTPs 10 mM, 2 μL de $MgCl_2$ 50 mM, 5 μL de tampão de reação da enzima e 0,5 μL da enzima *Taq polimerase* (5 U/μL) para um volume final de 50 μL.

Realizou-se as reações de PCR empregando um ciclo de desnaturação a 94 ^{o}C por 2 min, de anelamento dos oligonucleotídeo a 50 ºC por 1 min, de extensão a 72 ºC por 1 min, seguido por 34 ciclos de desnaturação a 94 ^{o}C por 1 min, anelamento dos oligonucleotídeos a 50 ºC, extensão a 72 ^{o}C por 1 min, finalizando com 50 ºC por 1 min e 72 ºC por 5 min.

Após as reações, avaliou-se os fragmentos em gel de agarose 0,8 % corados com gelRed 1:50000, e se considerou positivos os fragmentos de tamanhos entre 300 a 350 pb para cadeia leve.

Purificou-se do gel os fragmentos com tamanhos adequados pelo Kit *QIAquick®Gel Extraction Kit* (Qiagen., São Paulo., S.P., Brasil) e seus produtos foram sequenciados com o objetivo de confirmar se as sequências eram de cadeias variáveis leves.

Os sequenciamentos dos fragmentos foram realizados no Centro de Genoma do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, utilizando-se o *ABI 3730 DNA Analyser.* As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* e as corridas foram realizadas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. As sequências foram então analisadas pelo software *Sequencing Analysis* utilizando o *Base Caller KB*. As reações de sequênciamento alcançam em média 600 a 700 bases.

5.4.8 Análise das sequências dos fragmentos obtidos

Analisou-se os fragmentos sequenciados para confirmar se eram realmente correspondentes às sequências de cadeias variáveis leves de IgG de camundongos. Para isso, comparou-se as sequências obtidas com as sequências de IgG germinal de camundongos, utilizando o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) específico desenvolvido pelo departamento de Biologia Molecular da Universidade de Brasília disponível no site (http://helix.biomol.unb.br/blast/blast.html). Neste programa também confirmou-se a amplificação da cadeia variável leve normal e não aberrante, podendo-se dessa forma, identificar as regiões determinantes de complementariedade.

5.4.9 Identificação dos CDRs (regiões determinantes de complementariedade) das cadeias obtidas

Confirmou-se novamente as sequências obtidas pelo sequenciamento dos fragmentos correspondentes às sequências de cadeias variáveis leves de IgG de camundongos pelo BLAST com IgG germinal e então passou-se para o programa BioEdit *Sequence Alignment Editor* (www.bioedit.com) para analisar as sequências de aminoácidos e fazer um mapa de restrição, a partir do qual se desenharia o gene sintético do anticorpo recombinante. Este gene foi composto pela cadeia leve da porção variável do anticorpo obtido até o momento, ligado à cadeia pesada da porção variável do anticorpo por um *linker* peptídico obtidos por Menezes et al. (2011). Com essas sequências identificou-se os CDRs de cada cadeia, inclusive da cadeia pesada já obtida. Os CDRs foram identificados utilizando as instruções disponíveis no site (http://vsites.unb.br/ib/cel/imol/descricao_CDR), como mostrado (**Quadro 2)** abaixo:

Quadro 2 - Instruções para a identificação dos CDRs das cadeias variáveis leves e pesadas.

Cadeia Leve		
CDR-L1	Começa	Aproximadamente no resíduo 24
	Resíduos anteriores	Sempre uma Cisteína (C)
	Resíduos posteriores	Sempre um Triptofano (W), tipicamente triptofano-tirosina-glutamina (W-Y-Q), mas também, triptofano-leucina-glutamina (W-L-Q), triptofano-fenilalanina-glutamina (W-F-Q) ou triptofano-tirosina-leucina (W-Y-L).
	Tamanho	De 10 a 17 resíduos
CDR – L2	Começa	Sempre 16 resíduos depois do fim da CDR-L1
	Resíduos anteriores	Não tem
	Resíduos posteriores	Geralmente Isoleucina-tirosina (I-Y), mas também valina-tirosina (V-Y), isoleucina-lisina (I-K) ou isoleucina-fenilalanina (I-F)
	Tamanho	Sempre 7 resíduos (exceto o qual tem uma deleção nessa região)

CDR-L3	Começa	Sempre 23 resíduos depois do fim da CDR-L2 (exceto novo 7FAB o qual tem uma deleção em L2)
	Resíduos anteriores	Sempre uma cisteína (C)
	Resíduos posteriores	Sempre Fenilalanina-glicina-XXX-glicina (F-G-XXX-G)
	Tamanho	De 7 a 11 resíduos
Cadeia Pesada		
CDR-H1	Começa	Aproximadamente 26 resíduos (sempre 4 resíduos depois de uma cisteína (C), pela definição de Chonthia/AbM, na definição Kabat começa 5 resíduos depois)
	Resíduos anteriores	Sempre Cisteína-XXX-XXX-XXX (C-XXX-XXX-XXX)
	Resíduos posteriores	Sempre um triptofano (W). Tipicamente triptofano-valina (W-V), mas também triptofano-isoleucina (W-I) ou triptofano-alanina (W-A)
	Tamanho	De 10 a 12 resíduos pela definição AbM, pela definição Chonthia os últimos 4 resíduos são excluídos

CDR-H2	Começa	Sempre 15 resíduos depois do final de CDR-H1 definidos por Kabat/AbM
	Resíduos anteriores	Tipicamente Leucina-glutamato-triptofano-isoleucina-glicina (L-E-W-I), mas com inúmeras variações
	Resíduos posteriores	Lisina/Arginina (L/R)- Leucina/Isoleucina/Valina/ Fenilalanina/Treonina/Alanina (L/I/V/F/T/A)- Treonina/Serina/Isoleucina/Alanina (T/S/I/A)
	Tamanho	Segundo a definição Kabat de 16 a 19 resíduos, pela difinição AbM (e recente Chonthia) termina 7 resíduos antes.
CDR-H3	Começa	Sempre 33 resíduos depois do fim de CDR-H2 (sempre 2 resíduos antes de uma cisteína (C)
	Resíduos anteriores	Sempre Cisteína-XXX-XXX (C-XXX-XXX) tipicamente Cisteína-alanina-arginina (C-A-R)
	Resíduos posteriores	Sempre Triptofano-Glicina-XXX-glicina (W-G-XXX-G
	Tamanho	De 3 a 25 resíduos, mas é muito variável.

Fonte: Maranhão (2012).

5.5 Construção do gene sintético scFv-intimina

Confirmadas as sequências, e em colaboração com a Dra Andrea Maranhão da Universidade de Brasilia, desenhou-se o gene sintético do anticorpo recombinante com otimização de códon para sua expressão em *E. coli.* Códons ótimos de *E. coli* foram definidos pelo site www.kazusa.or.jp/codon e otimizados utilizando o programa online "Emboss Explorer", *backtranseq* (emboss.bioinformatics.nl). O conteúdo de GC para expressão em *E. coli* também foi otimizado, ajustou-se para 0.52 mudando alguns códons manualmente, o conteúdo de GC foi obtido pelo programa *GeeCee* no Emboss Explorer. Os vetores escolhidos para a expressão foram: pSMT3 (BUTT et al., 2005), pAE (RAMOS et al., 2004) e pPIG16 (BRIGIDO et al., 1993) que trabalham com diferentes estratégias de expressão, fusionando o ScFv a uma proteína que permite sua solubidade, expressando no citoplasma e no periplasma respectivamente, com objetivo de abordar várias possibilidades para a obtenção da proteína heteróloga. Os sítios de restrição utilizados foram SacI e HindIII para pSMT3, BamHI e HindIII para pAE e XmaI e EcoRI para pPIG16, em seguida, inseriu-se todos os sítios no desenho do gene. No programa BioEdit (Tom Hall, Ibis Bioscience, Carsbad, CA) verificou-se a correta inserção do inserto nos vetores, os sítios de restrição (para avaliar duplicidade de sítios) e se o inserto ficaria na fase correta do vetor. Após o desenho, enviou-se o gene para a síntese pela empresa GenScript (Piscataway, NJ, USA) (www.genscript.com).

5.5.1 Extração Plasmidial

A extração plasmidial foi realizada a partir da cultura de quatro colônias, escolhidas aleatoriamente, provenientes do crescimento da transformação das células *E. coli* DH5α. Estas colônias foram crescidas em meio LB com ampicilina 100 µg/mL (vetores pPIG16 e pAE) ou com canamicina 50 µg/mL (pSMT3), a 37 ºC, por 18 h e agitação de 150 rpm (C25 *Incubator Shaker – New Brunswick Scientific, EUA*), sendo utilizado para extração plasmidial o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante.

Em seguida, um gel de agarose 0,8% em TAE, foi realizado para observar a concentração das minipreparações realizadas.

5.5.2 Análise de restrição dos plasmídios extraídos

Para verificar se os plasmídios extraídos apresentavam o fragmento de interesse, estes foram digeridos com as enzimas de restrição SacI e HindIII para pSMT3, BamHI e HindIII para pAE e XmaI e EcoRI para pPIG16 (Fermentas) conforme descrito nos **quadros 3** e **4**. As digestões foram analisadas após corrida eletroforética, conforme descrito na seção item 5*.4.5.*

Quadro 3 - Primeira etapa das reações de digestão dos vetores pAE, pSMT3 e pPIG16 para a análise de restrição.

	pAE	**pSMT3**	**pPIG16**
DNA plasmidial	5 µL	5 µL	5 µL
Buffer	1 µL Buffer BamHI	1 µL Buffer Tango	1 µL Buffer XmaI
Enzima 1	1 µL BamHI	2 µL SacI	1 µL XmaI
Enzima 2	2 µL HindIII	2 µL HindIII	-
H_2O MilliQ	1 µL	-	3 µL
Total	10 µL	10 µL	10 µL

Foram realizadas cinco reações de digestão para cada vetor como descrito no **quadro 3**. As reações de digestão para os vetores pAE e pSMT3 foram incubadas a 37 °C por 2 h, e as reações de digestão para o vetor pPIG16 foram incubadas a 37 °C por 16 h, seguidas de uma segunda reação.

Quadro 4 - Segunda etapa da reação de digestão do vetor pPIG16 para a análise de restrição.

Buffer	1,5 µL Buffer EcoRI
Enzima	2 µL EcoRI
H_2O MilliQ	1,5 µL
Total	15 Ml

As reações de digestão do vetor pPIG16 foram incubadas a 37 °C por 2 h.

5.5.3 Genes sintéticos scFv-intimina

Os genes sintéticos vieram inseridos em um vetor de clonagem PUC57 (marcador de resistência - ampicilina 100 µg/mL) de 2710 pares de bases, isolado da linhagem DH5α de *Escherichia coli,* com os respectivos sítios de restrição e otimização do gene conforme descrito na seção 5.5, e nos foram entregues dois criotubos liofilizados para o posterior manuseio. A característica que diferenciava o gene selvagem do mutante era a inserção de uma cauda de seis histidinas:

- scFv-intimina sem a adição de his-tag: gene selvagem, o qual os vetores pSMT3 e pAE inserem a causa de histidinas.

- scFv-intimina com adição de his-tag: gene mutado, pois o vetor pPIG16 não insere a cauda de histidinas.

Os genes de aproximadamente 4 µg foram ressuspendidos em 20 µL de água ultrapura estéril para solubilizar o DNA. Em seguida, foi realizada uma transformação bacteriana por choque térmico, para posterior realização das reações de digestão do gene conforme descrito na seção 5*.5.2.*

5.5.4 Quimiotransformação - transformação bacteriana por choque térmico

As células da linhagem DH5α competentes foram incubadas em banho de gelo por 10 min. Adicionou-se 2 µL do gene sintético a 20 ng/µL, seguida de incubação no gelo por 30 min e uma posterior incubação a 42 ^{o}C, por 2 min seguida de banho de

gelo por mais 10 min. Adicionou-se 1 mL de meio LB e as células foram recuperadas a 37 ^{o}C por 1 h. Os transformantes foram adicionados em placas de LB ágar contendo ampicilina 100 μg/mL ou canamicina 50 μg/mL (Invitrogen).

5.5.5 Extração plasmidial

A extração plasmidial foi realizada a partir da cultura de quatro colônias, escolhidas aleatoriamente, provenientes do crescimento da transformação das células *E. coli* DH5α, conforme descrito na seção 5*.5.4.* As minipreparações foram realizadas e confirmadas conforme descrito na seção 5*.5.1.*

5.5.6 Análise de restrição dos genes sintéticos scFv-intimina

Para verificar se os genes extraídos apresentavam o fragmento de interesse, estes foram digeridos com as enzimas de restrição SacI e HindIII para pSMT3, BamHI e HindIII para pAE e XmaI e EcoRI para pPIG16 (Fermentas) conforme descrito nos **quadros 3** e **4** da seção *5.5.2.* As digestões foram analisadas após corrida eletroforética, conforme descrito na seção 5*.4.5*.

5.5.7 Purificação dos vetores e do inserto após corrida eletroforética

As digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% em TAE, e após a liberação dos fragmentos, estes e os vetores de expressão digeridos foram purificados do gel de agarose com o kit *PureLink^{TM} Quick Gel Extraction* (Invitrogen), segundo recomendações do fabricante.

5.5.8 Clonagem do fragmento scFv-intimina nos vetores de expressão pAE, pSMT3 e pPIG16

Os fragmentos scFv-intimina digeridos e os vetores de expressão pAE, pSMT3 e pPIG16 foram recombinados em reações de ligação com volume final de 15 μL.

Para a reação de ligação com o vetor pAE, utilizando a razão molar inserto:vetor de 3:1, foram utilizados 3 µL de fragmento scFv-intimina correspondente a 40 ng, 7 µL de vetor pAE correspondente a 50 ng, 3 µL de tampão de ligação e 1 µL de *T4 DNA Ligase* 40 U/µL (New England Biolabs, EUA). Na reação de ligação com o vetor pSMT3, foram utilizados 3 µL de fragmento scFv-intimina correspondente a 20,5 ng, 8 µL de vetor pSMT3 correspondente a 50 ng, 3 µL de tampão de ligação e 1 µL de *T4 DNA Ligase* 40 U/µL (New England Biolabs, EUA). E na reação de ligação com o vetor pPIG16, foram utilizados 1,8 µL de fragmento scFv-intimina correspondente a 36,3 ng, 7 µL de vetor pPIG16 correspondente a 50 ng, 3 µL de tampão de ligação e 1 µL de *T4 DNA Ligase* 40 U/µL (New England Biolabs, EUA). Após incubação das reações em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA) a 16 ºC por 18 h, 10 µL do produto das reações de ligação foram utilizados para transformação de células *E. coli* DH5α competentes, por choque térmico, conforme descrito no item 5.4. Um volume de 100 µL da cultura foi adicionado em duplicata em placas de LB ágar com canamicina 50 µg/mL para o vetor pSMT3 (Invitrogen), e em placas de LB ágar com ampicilina 100 µg/mL para os vetores pAE e pPIG16, sendo incubadas a 37 ºC, por 18 h.

5.5.9 Extração plasmidial

A extração plasmidial foi realizada a partir da cultura de quatro colônias, escolhidas aleatoriamente, provenientes do crescimento da transformação das células *E. coli* DH5α, conforme descrito na seção 5*.5.4.* Estas colônias foram cultivadas em meio LB com ampicilina 100 µg/mL (vetor pAE e pPIG16) e canamicina 50 µg/mL (vetor pSMT3) , a 37 ºC, por 18 h e agitação de 150 rpm (C25 *Incubator Shaker – New Brunswick Scientific, EUA*), sendo utilizado para extração plasmidial o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante.

Em seguida, a eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE, foi realizada para confirmar a extração do DNA plasmidial do scFv-intimina nos vetores pAE, pSMT3 e pPIG16.

5.5.10 Análise de restrição para a confirmação dos clones

Uma vez realizada a confirmação dos clones positivos para o gene scFv-intimina por *screening* na presença do marcador de resistência de cada vetor, dois clones sendo um de pAE scFv-intimina e outro de pSMT3 scFv-intimina foram submetidos à análise de restrição. Após extração plasmidial, com o kit *PureLink™ Quick Plasmid Miniprep* (Invitrogen), as reações de digestão foram realizadas conforme descrito na seção 5*.5.2* **quadro 3**. Estas reações foram incubadas a 37 ºC, por 2 h e a análise de restrição foi feita após migração dos produtos da digestão em gel de agarose 0,8 %, conforme descrito na seção 5*.5.6*.

5.5.11 Sequenciamento e análise de DNA

Com a confirmação da presença do inserto de interesse, dois clones sendo um pAE scFv-intimina e outro pSMT3 scFv-intimina foram submetidos a sequenciamento para verificação de fase de leitura e presença de mutações. As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, com a utilização dos iniciadores T7 *forward* e *reverse*, sequenciador *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems, EUA) e kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, conforme instruções do fabricante. As sequências obtidas foram manipuladas com auxílio dos *softwares BioEdit*, e em seguida alinhadas com auxílio do programa ClustalW2 (disponível em: http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2). A conversão da sequência de DNA em proteína foi realizada com o auxílio do programa Generunner®, enquanto os cálculos do ponto isoelétrico e de massa molecular foram feitos por meio da ferramenta *ProtParam*, presente no servidor *ExPasy* (disponível em: http://expasy.org/tools/protparam.html).

5.6 Padronização da indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina

Utilizando-se dois vetores de expressão diferentes, foram adotadas abordagens metodológicas para obtenção do anticorpo recombinante scFv-intimina, conforme descrito no **quadro 5**.

Quadro 5 - Padronização da indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina.

	pAE scFv-intimina	**pSMT3 scFv-intimina**
[IPTG]	1 mM	0,1 mM
Período e temperatura de incubação	3 h a 37 °C	3 h a 20 °C

5.6.1 Pré-análise da indução da expressão dos clones pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina

Dos diversos clones obtidos a partir da ligação entre os vetores pAE e pSMT3 com o inserto scFv-intimina, três foram escolhidos aleatoriamente para os ensaios iniciais de indução de expressão. Colônias provenientes das transformações das células BL21(DE3) com os plasmídios recombinantes pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina foram utilizadas para ensaios de expressão do anticorpo recombinante. Três colônias provenientes de cada uma das transformações, conforme citado no item 5.*5.4*, foram cultivadas em 3 mL de meio 2YT ou LB com canamicina 50 µg/mL para pSMT3 scFv-intimina (Invitrogen) e meio 2YT ou LB com ampicilina 100 µg/mL (Invitrogen) para pAE, a 37 ºC, sob agitação de 200 rpm, por 18 h (C25 *Incubator Shaker – New Brunswick Scientific*). Uma diluição 1:100 dessas pré-culturas, em 10 mL de meio 2YT na ausência de antibiótico, foi mantida sob agitação de 200 rpm, a 37 ºC, por aproximadamente 3 h (C25 *Incubator Shaker – New Brunswick Scientific*). O crescimento celular foi monitorado através da leitura de densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) (Spectronic 20 – Genesys) até atingir o intervalo entre 0,6 e 0,8. Uma vez nesse intervalo, uma alíquota de 1 mL da cultura (controle não-induzido) foi retirada,

sendo acrescentado IPTG (Isopropil β-D-1 Thiogalactopiranosídeo) (Sigma) em uma concentração final de 1 mM para pAE scFv-intimina e 0,1 mM para pSMT3 scFv-intimina. A cultura foi mantida sob agitação por mais 3 horas a 37 °C para pAE scFv-intimina e a 20 °C para pSMT3 scFv-intimina, sendo 1 mL da cultura (controle induzido) coletada ao final dessa incubação. Os volumes restantes das culturas celulares foram centrifugados e os precipitados ressuspendidos em 1 mL de PBS (137 mM de cloreto de sódio; 2,7 mM de cloreto de potássio; 4,3 mM de fosfato de sódio dibásico; 1,5 mM de fosfato de potássio monobásico – pH 7.4), para lise celular por ondas sonoras de ultra-som (sonicação). Após lise, a suspensão foi centrifugada e as frações solúveis e insolúveis do extrato celular separadas. Os ensaios de expressão do anticorpo recombinante foram analisados através de SDS-PAGE e *immunoblotting*, conforme descrito nas seções *5.6.2* e *5.6.4*, respectivamente.

5.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os ensaios de indução, como também as etapas de purificação da proteína recombinante foram analisadas por SDS-PAGE em condições redutoras, segundo protocolo descrito por Laemmli (1970). Alíquotas de 80 µL das etapas de lavagem e eluição, como também os precipitados dos controles não-induzidos e induzidos ressuspensos em 100 µL de água ultrapura, foram homogeneizados com tampão de amostra (0,25 M de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto; 8% de dodecil sulfato de sódio; 80% de glicerol; 0,04% de azul de bromofenol; 5% de β-mercaptoetanol; pH 6,8). Em seguida foram aquecidas a 100 °C por 10 min e submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE na concentração de 12%. A eletroforese foi efetuada a 80 V, por cerca de 2 h em Tampão Tris-Glicina (3% de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto, 1% de dodecil sulfato de sódio, 14% de glicina), juntamente com o padrão de massa molecular *Protein Mixture* (GE Healthcare). Após eletroforese, os géis foram corados por *Coomassie Blue R-250* (BioRad, EUA) ou *Coomassie Blue Bio Safe* (BioRad, EUA), sob suave agitação, à

temperatura ambiente por 1 h e descorados com tampão descorante (30% de metanol, 7% de ácido acético e água ultrapura q.s.p.) ou água destilada, por 18 h.

5.6.3 Western-blot

As proteínas separadas através de SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-C Extra* (GE Helthcare, EUA), utilizando o aparato de transferência em sistema úmido (BioRad Laboratories, EUA), sob corrente elétrica constante de 150 mA, a 4 ºC, por 18 h em tampão de transferência (250 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto, pH 8,3; 192 mM de glicina; 20% de metanol v/v), segundo Towbin et al., 1979. Uma vez feita a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (Sigma), e em seguida, bloqueadas com solução 10% de leite desnatado (Nestlé, Brasil) em PBS, por 2 h, à temperatura ambiente, sob agitação.

5.6.4 Immunoblotting

Após o bloqueio, a membrana foi submetida à imunodetecção empregando o anticorpo monoclonal IgG anti-histidina (GE Healthcare) diluído 1:3000 em solução de leite desnatado 10%. Após incubação de 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação, a membrana foi 3 vezes lavada, por 5 minutos com 0,05% de PBS-Tween (Synth, EUA). Uma vez lavada, a membrana foi incubada com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Zymed) diluído 1:5000 em solução de leite desnatado 10%, por 1 h, à temperatura ambiente, sob agitação. Antes da revelação com solução de revelação contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Sigma) (5 mg de DAB, 30 mL de PBS, 150 µL de peróxido de hidrogênio) (Merck), o ciclo de lavagem das membranas foi repetido. A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

5.7 Purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina obtido a partir da indução de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pAE scFv-intimina

5.7.1 Indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina por IPTG, para purificação

Para purificação do anticorpo recombinante, a linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3) transformada com plasmídio recombinante pAE scFv-intimina foi cultivada em um pré-inóculo de 12 mL de caldo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina (Invitrogen) e incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) por 18 h. Após incubação, 10 mL do pré-inóculo foram adicionados a 1000 mL de caldo 2YT na ausência de antibiótico, e incubados sob agitação de 250 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por aproximadamente 4 h. O crescimento celular foi monitorado através da leitura de densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) até atingir o intervalo entre 0,6 e 0,8 (Spectronic 20 – Genesys). Uma vez nesse intervalo, uma alíquota de 1 mL da cultura foi retirada para controle da pré-indução. Ao meio foi adicionado 1 mM de IPTG (Sigma), e incubado sob agitação de 250 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por 4 h. Após incubação, outra alíquota foi retirada para o controle da pós-indução. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 10 min (Centrifugue 5402, Eppendorf), e o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para proteína (60 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto; 2% de dodecil sulfato de sódio; 10% de glicerol; 5% de β-mercaptoetanol; 1% de azul de bromofenol). Após indução, a cultura bacteriana foi centrifugada a 13.000 x *g* por 20 min sob refrigeração a 4 °C (Eppendorf 5804-R, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30 mL de tampão de lise (50 mM de Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol – pH 8.0), acrescidos de 1 mM de fluoreto de fenilmetilsufato (PMSF) (Sigma) e 40 µg/mL de Lisozima (Sigma). Em seguida, essa suspensão bacteriana foi armazenada a -20 °C para posteriormente ser submetida à lise celular por ondas sonoras de ultra-som (sonicação).

5.7.2 Obtenção da fração insolúvel do anticorpo recombinante scFv-intimina

Após a lise celular por ondas de ultra-som, o lisado bacteriano foi centrifugado a 13.000 x *g* por 20 min sob refrigeração a 4 °C (Eppendorf 5804-R). Após centrifugação, os sedimentos contendo as proteínas sob a forma insolúvel (corpos de inclusão) foram ressuspensos em 50 mL de tampão de solubilização (50 mM de Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol; 8 M ureia – pH 8.0), e submetidos à solubilização sendo incubados sob leve agitação a 4 °C por 18 h. A solução foi centrifugada a 13.000 x *g* por 30 min sob refrigeração a 4 °C (Eppendorf 5804-R), e o sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm (Millipore, EUA).

5.7.3 Cromatografia de afinidade ao Níquel (Ni^{2+})

A proteína solubilizada foi purificada pelo AKTAprime plus (GE Healthcare), utilizando uma resina Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare) previamente empacotada em uma coluna C10/10 (GE Healthcare). Dessa forma, a coluna foi equilibrada com o tampão de lise (50 mM de Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol; 8 M ureia – pH 8.0), para a subsequente adição da amostra. De acordo com a programação do AKTAprime plus, foram injetados 50 mL de amostra livres de qualquer resíduo ou restos celulares capazes de interromper o processo de purificação. Após a total passagem da amostra, foram coletados os primeiros 15 mL referentes à primeira lavagem da purificação para posteriormente por SDS-PAGE, nos certificarmos de que a amostra realmente ficou aderida à coluna, e assim, o tampão de eluição foi injetado (50 mM Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 8 M ureia; 500 mM de imidazol – pH 8.0) até eluir a proteína de interesse. Os controles pré e pós-indução, sobrenadante e precipitados após a lise, a lavagem e a eluição da purificação foram analisadas em gel de SDS-PAGE a 12%, corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution* (Bio-Rad, EUA) e *immunoblotting* conforme descritos nas seções 5.*6.2* e 5.*6.4*, respectivamente.

5.7.4 Renaturação do anticorpo recombinante scFv-intimina após purificação

O processo de renaturação do scFv-intimina foi realizado pelo método de diálise, com concentrações decrescentes de ureia para retirar de forma gradual o agente desnaturante. A proteína em solução de eluição foi depositada em uma membrana de diálise de 12.000 Da, e esta foi incubada em tampão de renaturação (50 mM de Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 5 mM imidazol – pH 8.0) contendo concentrações decrescentes de ureia (5 M, 3 M, 2 M, 1 M, 0.5 M e sem ureia), com trocas ocorrendo a cada 12 h. Ao tampão de concentração de ureia a 1 M foi adicionado 375 µM de glutationa oxidada (GSSG) para o auxílio da renaturação das pontes de dissulfeto. A última diálise foi realizada com o tampão de renaturação sem ureia, sendo incubada sob leve agitação com a barra magnética por 24 h, para garantir a saída do agente desnaturante. Após a última diálise em tampão de renaturação, o anticorpo recombinante foi concentrado em polietilenoglicol 6000, por 5 h, a 4 ºC e suas concentrações protéicas determinadas com o kit *Micro BCAProtein Assay* (Pierce, EUA), conforme as recomendações do fabricante.

A proteína purificada, renaturada e concentrada foi analisada em gel de SDS-PAGE e *immunoblotting* como descrito nas seções 5*.6.2* e 5*.6.4*, respectivamente.

5.8 Purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina, obtido a partir da indução de células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pSMT3 scFv-intimina

5.8.1 Indução da expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina por IPTG, para purificação

Para purificação do anticorpo recombinante, *Escherichia coli* BL21(DE3) transformada com plasmídio recombinante pSMT3 scFv-intimina foi cultivada em um pré-inóculo de 12 mL de caldo LB contendo 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen) e incubada a 37 °C sob agitação de 250 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) por 18 h. Após incubação, 10 mL do pré-inóculo foram adicionados a 1000

mL de caldo 2YT na ausência de antibiótico, e incubados sob agitação de 250 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 37 °C por aproximadamente 4 h. O crescimento celular foi monitorado através da leitura de densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) até atingir o intervalo entre 0,6 e 0,8 (Spectronic 20 – Genesys). Uma vez nesse intervalo, uma alíquota de 1 mL das culturas foram retiradas para controle da pré-indução. Ao meio foi adicionado 0,1 mM de IPTG (Sigma), e incubado sob agitação de 150 rpm (C25 Incubator Shaker – New Brunswick Scientific) a 20 °C por 4 h. Após incubação, outra alíquota foi retirada para o controle da pós-indução. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 x *g* por 10 min (Centrifugue 5402, Eppendorf), e o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para proteína (60 mM de tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto; 2% de dodecil sulfato de sódio; 10% de glicerol; 5% de β-mercaptoetanol; 1% de azul de bromofenol). Após indução, a cultura bacteriana foi centrifugada a 13.000 x *g* por 20 min sob refrigeração a 4 °C (Eppendorf 5804-R, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 30 mL de tampão de lise (50 mM de Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol – pH 8.0), acrescidos de 1 mM de fluoreto de fenilmetilsufato (PMSF) (Sigma) e 40 µg/mL de Lisozima (Sigma). Em seguida, essa suspensão bacteriana foi armazenada a -20 °C para posteriormente ser submetida à lise celular por ondas sonoras de ultra-som (sonicação).

5.8.2 Purificação do anticorpo recombinante pSMT3 scFv-intimina pelo sistema batch Ni^{2+}

A purificação do anticorpo recombiante scFv-intimina foi realizada após indução da expressão em células BL21(DE3) transformadas com o plasmídio pSMT3 scFv-intimina, conforme descrito no item 5.8, por *Batch*. Um volume de 0,5 mL de resina *Ni Sepharose High Performance* (GE Healthcare) foi mantido com 5 mL de tampão de lise (50 mM de Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 5 mM de imidazol – pH 8.0), por 3 vezes de 10 min cada, para equilíbrio do pH. Após lavagem, a resina foi mantida com 30 mL da fração solúvel do extrato bacteriano, sendo lavada sucessivamente com 5 mL de tampão de lise, contendo diferentes concentrações de

imidazol: 20 mM, 40 mM e 60 mM , por 10 min cada, para eliminação das proteínas contaminantes. A eluição do anticorpo recombinante foi realizada com 2 mL de tampão de eluição (50 mM Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 500 mM de imidazol – pH 8.0), incubando-o com a resina por 1 h. Todas as etapas da purificação foram realizadas em tubo de polipropileno de 50 mL, sob agitação suave, a 4 ºC, tendo suas frações coletadas após centrifugação a 700 x *g*, a 4 ºC por 4 min em centrífuga *Eppendorf 5804-R*. O processo de purificação foi analisado através de SDS-PAGE e *Immunobloting*, conforme descrito nas seções 5*.6.2* e *5.6.4*, respectivamente.

5.9 Análise da atividade funcional do anticorpo recombinante scFv-intimina

A atividade funcional do anticorpo recombinante foi analisada por meio de testes de imunofluorescência indireta.

5.9.1 Detecção da intimina purificada, por imunofluorescência indireta, utilizando o anticorpo recombinante scFv-intimina

O teste de imunofluorescência indireta foi padronizado utilizando-se os isolados controles positivo tEPEC E2348/60 e negativo ETEC H10407, com o intuito de se observar o reconhecimento da porção conservada da intimina pelo anticorpo recombinante scFv-intimina. Foram analisados 72 isolados de aEPEC, 37 isolados de tEPEC, 23 isolados de EHEC, 10 isolados de ETEC, 10 isolados de EAEC, 10 isolados de EIEC, 10 isolados de DAEC, 5 isolados de STEC, 10 isolados de *E. coli* sem fator de virulência e 10 isolados de outras enterobactérias, totalizando 199 isolados incluindo-se os isolados controles. Cada isolado foi cultivado em 3 mL de caldo LB, por 16 h, a 37 °C, a 250 rpm. Após, uma alíquota de 0,5 mL de cada isolado foi centrifugada a 4.500 x *g*, 4 °C, por 5 min (*Eppendorf 5804-R*),. O precipitado foi ressuspendido em 0,5 mL de PBS/BSA (1%) e centrifugado novamente a 4.500 x *g*, 4 °C, por 5 min (*Eppendorf 5804-R*). Este processo de lavagem foi repetido por mais duas vezes, totalizando três lavagens. Após as

lavagens, as alíquotas foram permeabilizadas utilizando Triton-X-100 (Sigma) a 4%, por 10 min. Após a permeabilização, as alíquotas foram incubadas com formaldeído (Sigma) a 1%, por 20 min, seguidas de uma incubação com Glicina (Sigma) 1% por 10 min. Posteriormente os precipitados foram ressuspendidos com o scFv-intimina na concentração 30 µg/mL, seguida da incubação com anticorpo monoclonal IgG anti-histidina diluído 1:2000 (Sigma). Após, foi adicionado o soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceina (FITC) (Sigma) em uma diluição de 1:100. Todas as incubações foram realizadas por 1 h à temperatura ambiente, em um volume final de 0,3 mL, precedida de três lavagens com PBS/BSA (1%), sendo cada uma de 5 min, sob agitação mínima e constante. Uma gota da suspensão bacteriana foi colocada a uma lâmina de vidro e observada em microscópio de fluorescência (Axioskop – Zeiss, Alemanha) em aumento de 1000 X.

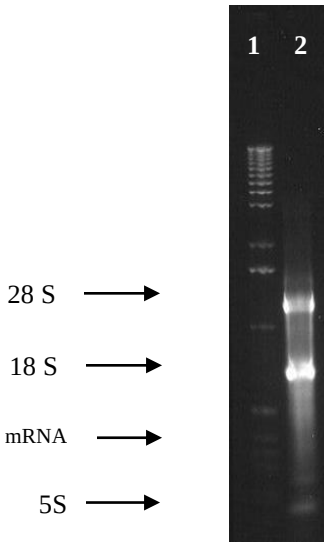
6 RESULTADOS

Os hibridomas K1 4H anti-intimina (IgG2b), utilizados no presente trabalho foram previamente obtidos e caracterizados por Koga (2003) e Menezes et al. (2010), respectivamente. Para o isolamento da cadeia necessária, cultivou-se estes hibridomas e utilizou-se 2,75 X 10^6 células, número esse, adequado para as extrações de RNA.

6.1 Clonagem do scFv-intimina

O RNA total das células dos hibridomas foi extraído de maneira pura e eficiente. A qualidade da extração pode ser observada na **figura 13**, onde se podem diferenciar as bandas do RNA ribossomal, o que confirma a integridade da amostra, o rastro de RNA mensageiro, e a visualização da amostra concentrada.

Figura 13 - Perfil eletroforético da extração de RNA total de células dos hibridomas produtores de anticorpos anti-intimina.



Gel de agarose 1% corado com GelRed (1:50000) e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. **1-** 1kb Plus (Invitrogen); **2-** RNA K1 4H anti-intimina (IgG2b). As setas indicam as bandas correspondentes aos fragmentos dos RNAs ribossômicos e o RNA memsageiro.

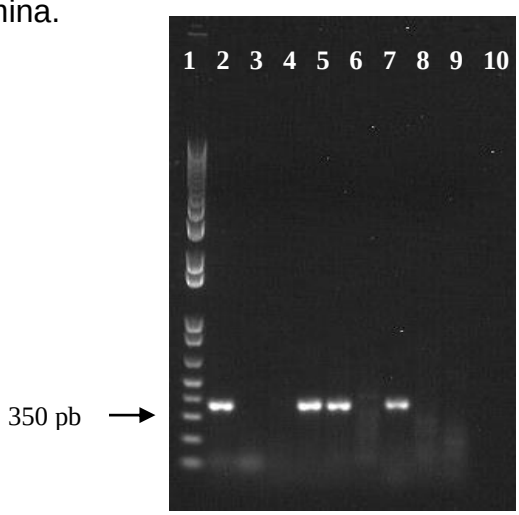
O RNA mensageiro foi então transcrito reversamente em cDNA por RT-PCR para amplificação das cadeias variáveis do anticorpo expresso pelos hibridomas em

questão, sendo assim, utilizou-se vários iniciadores disponíveis para tentar amplificar a cadeia leve normal e não aberrante (**Quadro 2**), e outros iniciadores como oligo(dT), *random primer*, e o iniciador de cadeia constante K18 para obtenção do cDNA. Para a cadeia pesada, este procedimento não foi necessário, pois tanto a cadeia pesada, quanto o ligante peptídico já haviam sido obtidos anteriormente (MENEZES et al., 2011).

Utilizando os iniciadores do **quadro 2**, uma série de reações de PCR foram realizadas, na tentativa de amplificar a cadeia leve da porção variável do anticorpo anti-intimina.

Iniciou-se amplificando a cadeia leve dos hibridomas anti-intimina IgG2b, partindo-se de um cDNA obtido pelos iniciadores *Random Hexamers*. Na **figura 14**, observa-se a amplificação nas canaletas 2, 5, 6 e 8. Esses fragmentos foram todos purificados e sequenciados, porém, após o sequenciamento e alinhamento com IgG germinal de camundongo, estas sequências se mostraram em sua maioria aberrantes (faltando uma cisteína no seu início), sendo portanto não funcionais.

Figura 14 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das V_L dos anticorpos anti-intimina.

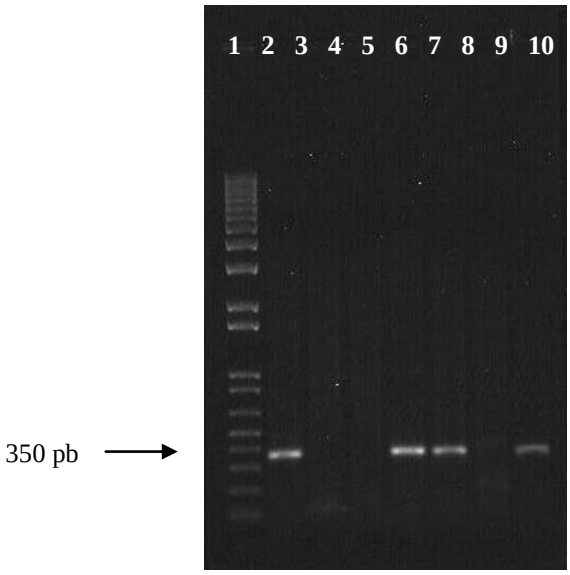


Gel de agarose 0,8% corado com GelRed (1:50000) e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. **1**- 1kb Plus (Invitrogen); **2-10-** Amplificação de V_L de anti-intimina, iniciadores 353, 362, 364, 365, 390, 391, 392, 392 e 394, respectivamente.

Em uma segunda tentativa utilizando o cDNA obtido com iniciadores *Oligo dT*, as bandas amplificadas estão mostradas nas canaletas 2, 5, 6 e 8, (**Figura 15**), e

também após sequenciamento e alinhamento com IgG germinal de camundongo, estas sequências se mostraram em sua maioria aberrantes.

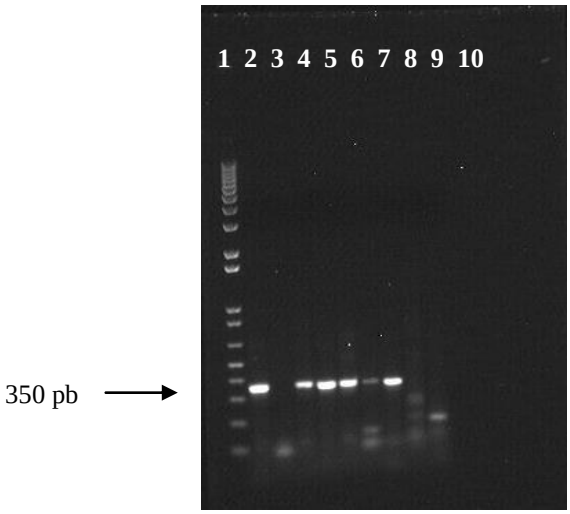
Figura 15 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das V_L dos anticorpos anti-intimina.



Gel de agarose 0,8% corado com GelRed (1:50000) e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. **1-** 1kb Plus (Invitrogen); **2-10-** Amplificação de V_L de anti-intimina, iniciadores 353, 362, 364, 365, 390, 391, 392, 392 e 394, respectivamente.

Na terceira tentativa, utilizando o cDNA obtido com os iniciadores do grupo K18, as bandas amplificadas estão apresentadas nas canaletas 2, 4, 5, 6, 7 e 8, e após o sequenciamento e alinhamento, comprovou-se a existência de uma cadeia leve positiva, funcional e não aberrante, referente ao fragmento obtido do produto das PCRs correspondente ao iniciador 364 para cadeia leve (canaleta 4).

Figura 16 - Perfil eletroforético dos produtos de PCR das V_L dos anticorpos anti-intimina.



Gel de agarose 0,8% corado com GelRed (1:50000) corado com GelRed (1:50000) e visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. **1-** 1kb Plus (Invitrogen); **2-10-** Amplificação de V_L de anti-intimina, iniciadores 353, 362, 364, 365, 390, 391, 392, 392 e 394 respectivamente.

Com as sequências confirmadas, partiu-se para a montagem do scFv-intimina utilizando a sequência da nova cadeia leve, unida por um ligante peptídico à cadeia pesada obtida por Menezes et al (2011), como mostrado no **quadro 6**.

Quadro 6 - Sequência de nucleotídeos referente à CP, *linker* e CL da fração variável do anticorpo anti-intimina.

CADEIAS	SEQUÊNCIAS
CP	GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCCTGGGACTTC AGTGAAGATATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGGTCACTGACTACTA CATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTG GAGATATTAATCTTGACAATCGTGATTGTAGTTATAACCAGAAGTTCCA GGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCGTCCAGCACAGTCTACAT GGAGATCCGCAGCCTGACTTCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGC AAGTCAACTGGGTCACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
Linker	GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG
CL	GATATTGTGATAACCCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGA ACATCAGCTTCCATTTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGT GATGGCATCACTTATTTATATTGGTATCTGCAGAGGCCAGACCAGTCT CCTCAGCTCCTGGTTTATCGGATGTCCAGCCTTGCCTCAGGGGTCCC AGACAGGTTCAGTAGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTCACACTGAAAAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTGCTCAAA ATCTAGAACTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAACTGGAAATA AAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTA

Quadro 7 - Sequência predita de aminoácidos referente à CP, *linker* e CL da fração variável do anticorpo anti-intimina sem a presença de códons de terminação.

CADEIAS	SEQUÊNCIAS
CP	VQLQESGPEVVKPGTSVKISCKASGYTVTDYYMNWVKQSHGKSLEWIGD INLDNRDCSYNQKFQDKATLTVDKSSSTVYMEIRSLTSEDSAVYYCASQL GHWGQGTTVTVS
Linker	GGGGSGGGGSGGGGS
CL	DIVITQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSDGITYLYWYLQRPDQSPQLL VYRMSSLAGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTF GGGKLEIK

A obtenção das sequências possibilitou sua tradução pelo programa BioEdit (**Quadro 7**) e a identificação dos CDRs de cada cadeia, o que caracterizou o anticorpo e nos assegurou que as sequências estavam completas e corretas.

Utilizou-se as instruções previamente descritas para tentar identificar tais regiões. Na **figura 17** estão as sequências correspondentes a V_H e ao *linker,* e na **figura 18** estão as sequências correspondentes a V_L do anticorpo anti-intimina. Em ambas as figuras, os CDRs estão identificados em verde, mostrando que a sequência está completa.

Figura 17 - Análise das sequências de V_H e do *linker* de anti-intimina, pelo programa BioEdit.

```
Restriction Enzyme Map:

         H  M  H  H  H  H  H  H  L  E  G  S  R  V  Q  L  Q  E  S  G  P  E  V  V  K  P  G
1       CATATGCATCACCATCACCATCACCTCGAGGGATCCCGGGTTCAGCTGCAGGAATCAGGTCCTGAAGTTGTTAAACCTGG   80
1       GTATACGTAGTGGTAGTGGTAGTGGAGCTCCCTAGGGCCCAAGTCGACGTCCTTAGTCCAGGACTTCAACAATTTGGACC   80
          NdeI   NsiI              XhoI   BamHI          PvuII                             Acc65I
               BfrBI                        XmaI            PstI
                                             SmaI

                                                   CDR1

          T  S  V  K  I  S  C  K  A  S  G  Y  T  V  T  D  Y  Y  M  N  W  V  K  Q  S  H
81      TACCAGCGTTAAAATCTCATGCAAAGCGAGCGGTTACACCGTTACCGATTACTACATGAACTGGGTTAAACAGAGCCACG   160
81      ATGGTCGCAATTTTAGAGTACGTTTCGCTCGCCAATGTGGCAATGGCTAATGATGTACTTGACCCAATTTGTCTCGGTGC   160
           KpnI                        BsrBI

                                                         CDR2

        G  K  S  L  E  W  I  G  D  I  N  L  D  N  R  D  C  S  Y  N  Q  K  F  Q  D  K  A
161     GTAAAAGCCTGGAATGGATCGGTGATATCAACCTGGATAACCGTGATTGCTCATACAACCAGAAATTCCAGGATAAAGCG   240
161     CATTTTCGGACCTTACCTAGCCACTATAGTTGGACCTATTGGCACTAACGAGTATGTTGGTCTTTAAGGTCCTATTTCGC   240
                                EcoRV


         T  L  T  V  D  K  S  S  S  T  V  Y  M  E  I  R  S  L  T  S  E  D  S  A  V  Y  Y
241     ACCCTGACCGTTGATAAAAGCAGCAGCACCGTTTACATGGAAATCCGTAGCCTGACCAGCGAAGATAGCGCAGTTTACTA   320
241     TGGGACTGGCAACTATTTTCGTCGTCGTGGCAAATGTACCTTTAGGCATCGGACTGGTCGCTTCTATCGCGTCAAATGAT   320


                        CDR3

          C  A  S  Q  L  G  H  W  G  Q  G  T  T  V  T  S  R  G  G  G  G  S  G  G  G  G
321     CTGCGCATCACAGCTGGGTCACTGGGGTCAGGGTACCACCGTTACCTCTAGAGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTA   400
321     GACGCGTAGTGTCGACCCAGTGACCCCAGTCCCATGGTGGCAATGGAGATCTCCACCACCACCATCGCCACCACCACCAT   400
            FspI      PvuII                Acc65I          XbaI
                      BseYI                    KpnI



        S  G  G  G  G  S  R  S  V  I  T  Q  A  A  F  S  N  P  V  T  L  G  T  S  A  S  I
401     GCGGTGGTGGTGGTAGCAGATCTGTTATCACCCAGGCAGCATTCAGCAACCCTGTTACCCTGGGTACCAGCGCAAGCATC   480
401     CGCCACCACCACCATCGTCTAGACAATAGTGGGTCCGTCGTAAGTCGTTGGGACAATGGGACCCATGGTCGCGTTCGTAG   480
                          BglII                                            Acc65I
                                                                               KpnI
```

A figura mostra um mapa de restrição da sequência, os CDRs marcados em verde, suas regiões flanqueadas em amarelo e o *linker* de vermelho.

Figura 18 - Análise das sequências de V_L de anti-intimina, pelo programa BioEdit.

```
        S  G  G  G  G  S  R  S  V  I  T  Q  A  A  F  S  N  P  V  T  L  G  T  S  A  S  I
401     GCGGTGGTGGTGGTAGCAGATCTGTTATCACCCAGGCAGCATTCAGCAACCCTGTTACCCTGGGTACCAGCGCAAGCATC   480
401     CGCCACCACCACCATCGTCTAGACAATAGTGGGTCCGTCGTAAGTCGTTGGGACAATGGGACCCATGGTCGCGTTCGTAG   480
                        BglII                                          Acc65I
                                                                          KpnI

                                  CDR1

         S  C  R  S  S  K  S  L  L  H  S  D  G  I  T  Y  L  Y  W  Y  L  Q  R  P  D  Q  S
481     AGCTGCCGTAGCAGCAAATCACTGCTGCACAGCGATGGTATCACCTACCTGTACTGGTACCTGCAGCGTCCTGATCAGAG   560
481     TCGACGGCATCGTCGTTTAGTGACGACGTGTCGCTACCATAGTGGATGGACATGACCATGGACGTCGCAGGACTAGTCTC   560
          PvuII                                                 Acc65I    PstI    BclI
                                                                   KpnI

                                  CDR2

          P  Q  L  L  V  Y  R  M  S  S  L  A  G  V  P  D  R  F  S  S  S  G  S  G  T  D
561     CCCTCAGCTGCTGGTTTACCGTATGAGCAGCCTGGCAGGTGTTCCGGATCGTTTCAGCTCAAGCGGTAGCGGTACCGATT   640
561     GGGAGTCGACGACCAAATGGCATACTCGTCGGACCGTCCACAAGGCCTAGCAAAGTCGAGTTCGCCATCGCCATGGCTAA   640
           BbvCI                                  BspEI                        Acc65I
                PvuII                                                               KpnI

                                                                  CDR3

        F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  V  G  V  Y  Y  C  A  Q  N  L  E  L  P  Y  T
641     TCACCCTGAAAATCTCACGTGTTGAAGCAGAAGATGTTGGTGTTTACTACTGCGCACAGAACCTGGAACTGCCGTACACC   720
641     AGTGGGACTTTTAGAGTGCACAACTTCGTCTTCTACAACCACAAATGATGACGCGTGTCTTGGACCTTGACGGCATGTGG   720
                        PmlI                                FspI


         F  G  G  G  K  L  E  S  L  *  E  F  R  S  G  C  *  Q  S  P  K  G  S  *  V  G
721     TTCGGTGGTGGTAAACTGGAAAGCTTATAAGAATTCCGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTG   800
721     AAGCCACCACCATTTGACCTTTCGAATATTCTTAAGGCTAGGCCGACGATTGTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGAC   800
                           HindIII   EcoRI
                                  PsiI



801        800
801        800
```

A figura mostra um mapa de restrição da sequência, os CDRs marcados em verde, suas regiões flanqueadas em amarelo.

Com os CDRs corretos e identificados, partiu-se para o desenho do gene sintético do anticorpo anti-intimina. Escolheu-se três vetores para inserir sítios no gene, pSMT3, pPIG16 e pAE, todos para expressão em *E. coli* sendo o pSMT3 para a expressão fusionada com a proteína SUMO (BUTT et al., 2005), o pPIG16 (BRIGIDO et al., 1993) por possuir um peptídeo sinal e o pAE que possui um alto número de cópias juntamente com um forte promotor (RAMOS et al., 2004).

A sequência protéica obtida teve seu começo e fim determinados e o *linker* foi inserido na sequência, como mostrado no quadro 7. Esta sequência foi então inserida no programa *backtranseq* do Emboss explorer juntamente com um arquivo

contendo os codon de preferência para *E. coli* para obter-se um gene com codons otimizados para o seu sistema de expressão.

O conteúdo de GC deste gene também foi alterado para sua melhor expressão em *E. coli*, pois o gene original tinha um conteúdo de GC muito alto, o que não era compatível para a bactéria de expressão, que é mesófila e precisa de uma quantidade de GC não muito alta, já que a temperatura das reações de transcrição e replicação de DNA dentro deste organismo ficou em torno de 37 ^{o}C. Esta mudança foi feita utilizando o programa *GeeCee* do Emboss Explorer para avaliar o conteúdo de GC e os códons de preferência de *E. coli* obtidos pelo site Kazusa. Com as tabelas de codons de preferência, fez-se mudanças de codons, não fugindo muito dos preferenciais do sistema de expressão, mas visando a diminuição do conteúdo de GC, fixou-se o conteúdo em 0.52, o que favorece este sistema de expressão.

Com o programa BioEdit, fez-se um mapa de restrição do gene para verificar se haviam repetições de sítios enzimáticos a serem inseridos. Dessa forma, por meio da análise dos vetores, determinou-se as enzimas de escolha de maneira a modular o gene com sítios específicos flanqueando o *Linker*. Assim, as enzimas escolhidas foram a BglI antes e a XbaI depois do *Linker*, e para que isso fosse possível, modificou-se um codon para retirar um sítio de XbaI que havia dentro do gene, isso fez com que fosse substituída uma Isoleucina por uma Serina, e uma Lisina por uma Leucina, o que não afetaria a conformação da proteína.

Para a clonagem em pPIG16, as enzimas escolhidas foram XmaI à jusante e EcoRI à montante, ambas foram inseridas no desenho do gene. Para a clonagem em pAE, utilizou-se os sítios para BamHI e HindIII, que também foram inseridos no gene. Já para pSMT3, as enzimas escolhidas foram SacI e HindIII, sendo a primeira também inserida no gene. Todas as inserções foram feitas para que o gene entrasse na fase de leitura do vetor, sendo assim, um indicativo para uma expressão adequada. Esses ajustes foram feitos pelo programa BioEdit.

Também para uma melhor transcrição do gene, inseriu-se uma sequência de seis histidinas para sua expressão em pPIG16, já que os demais vetores já a possuem, extremamente necessária para sua purificação. Uma outra variável foi uma mutação pontual em um dos últimos aminoácidos do ScFv, após o CDR3, transformando este em um codon de terminação antes da cauda de histidina, para a

expressão em pAE, que não possui um terminador em sua sequência. Na **figura 19**, observa-se o gene final obtido.

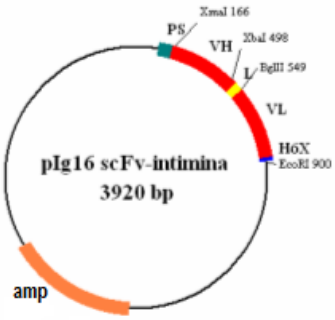
Figura 19 - Desenho do gene sintético ScFv-intimina mostrando os sítios de restrições e a cauda de histidina.

```
GAGCTCGGGGATCCCGGGTTCAGCTGCAGGAATCAGGTCCTGAAGTTGTTAAACCTGGTACCAGCGTTAA
AATCTCATGCAAAGCGAGCGGTTACACCGTTACCGATTACTACATGAACTGGGTTAAACAGAGCCACGGT
AAAAGCCTGGAATGGATCGGTGATATCAACCTGGATAACCGTGATTGCTCATACAACCAGAAATTCCAGG
ATAAAGCGACCCTGACCGTTGATAAAAGCAGCAGCACCGTTTACATGGAAATCCGTAGCCTGACCAGCGA
AGATAGCGCAGTTTACTACTGCGCATCACAGCTGGGTCACTGGGGTCAGGGTACCACCGTTACCTCTAGA
GGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCGGTGGTGGTGGTAGCAGATCTGTTATCACCCAGGCAGCAT
TCAGCAACCCTGTTACCCTGGGTACCAGCGCAAGCATCAGCTGCCGTAGCAGCAAATCACTGCTGCACAG
CGATGGTATCACCTACCTGTACTGGTACCTGCAGCGTCCTGATCAGAGCCCTCAGCTGCTGGTTTACCGT
ATGAGCAGCCTGGCAGGTGTTCCGGATCGTTTCAGCTCAAGCGGTAGCGGTACCGATTTCACCCTGAAAA
TCTCACGTGTTGAAGCAGAAGATGTTGGTGTTTACTACTGCGCACAGAACCTGGAACTGCCGTACACCTT
CGGTGGTGG(T)AAACTGGAAAGCTTACACCACCACCACCACCACTAAGAATTCC
```

Em verde o sítio para SacI, em rosa o sítio para BamHI que divide com o sítio para XamI em Em verde o sítio para SacI, em rosa o sítio para BamHI que divide com o sítio para XamI em amarelo. Em azul o sítio de BglI, em roxo o de XbaI fazendo o gene ser modular, flanqueando o linker. Em vermelho o sítio para HindII e em cinza o sítio para EcoRI. Em azul claro esta marcada a cauda de histidina e em verde escuro a mutação pontual necessária para a clonagem em pAE, a guanina é substituída por uma timina, originando um Stop codon.

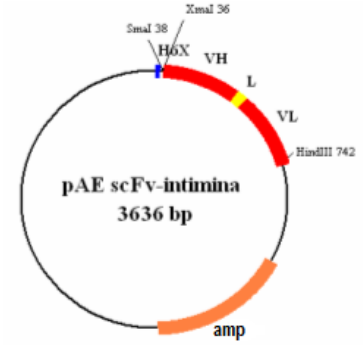
Também utilizando o programa BioEdit e visando a confirmação teórica de que o gene estaria na mesma fase de leitura dos vetores, desenhou-se construções do gene nos vetores para a expressão. No programa observou-se que o gene a ser sintetizado permaneceria em fase em todos os vetores. As **figuras 20, 21 e 22** mostram as construções que foram realizadas.

Figura 20 - Representação esquemática do mapa da construção do gene sintético scFv-intimina no vetor pPIG16.



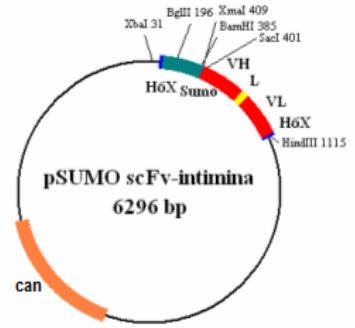
O desenho mostra os sítios de restrições, o peptídeo sinal do vetor, o gene modular e o cassete de resistência, que é ampicilina.

Figura 21 - Representação esquemática do mapa da construção do gene sintético scFv-intimina no vetor pAE.



O desenho mostra os sítios de restrições, a cauda de histidina do vetor, o gene modular e o cassete de resistência, que é ampicilina.

Figura 22 - Representação esquemática do mapa da construção do gene sintético scFv-intimina no vetor pSMT3.



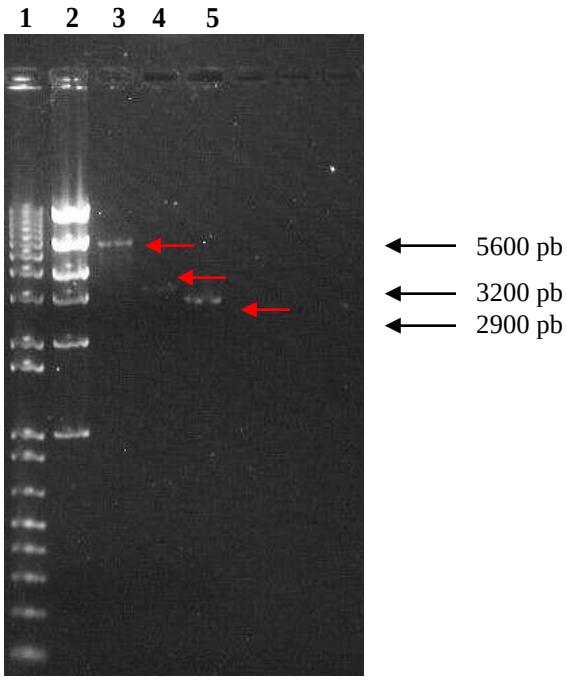
O desenho mostra os sítios de restrições, a proteína SUMO, a cauda de histidina do vetor, o gene modular e o cassete de resistência, que é canamicina.

Os genes sintéticos chegaram em nossas mãos em dois criotubos liofilizados para o posterior manuseio. Estes estavam inseridos em um vetor de clonagem pUC57 (marcador de resistência - ampicilina 100 µg/mL) de 2710 pares de bases, isolado da linhagem DH5α de *Escherichia coli,* com os respectivos sítios de restrição e otimização do gene. A característica que os diferenciava e como foram tratados foi descrito anteriormente.

Para a realização da clonagem dos genes sintéticos nos vetores de expressão escolhidos, realizou-se a extração plasmidial e digestão dos vetores com as enzimas de restrição SacI e HindIII para pSMT3, BamHI e HindIII para pAE e XmaI e EcoRI para pPIG16 (Fermentas) conforme descrito nos **quadros 3** e **4**, respectivamente. A concentração das digestões foi realizada na razão molar inserto:vetor de 3:1 (**Figura**

23). Esses resultados foram utilizados para calcular a quantidade de vetor necessária para os próximos ensaios.

Figura 23 - Perfil eletroforético da digestão dos vetores pSMT3, pPIG16 e pAE com as enzimas SacI e HindIII para pSMT3, XmaI e EcoRI para pPIG16 e BamHI e HindIII para pAE.

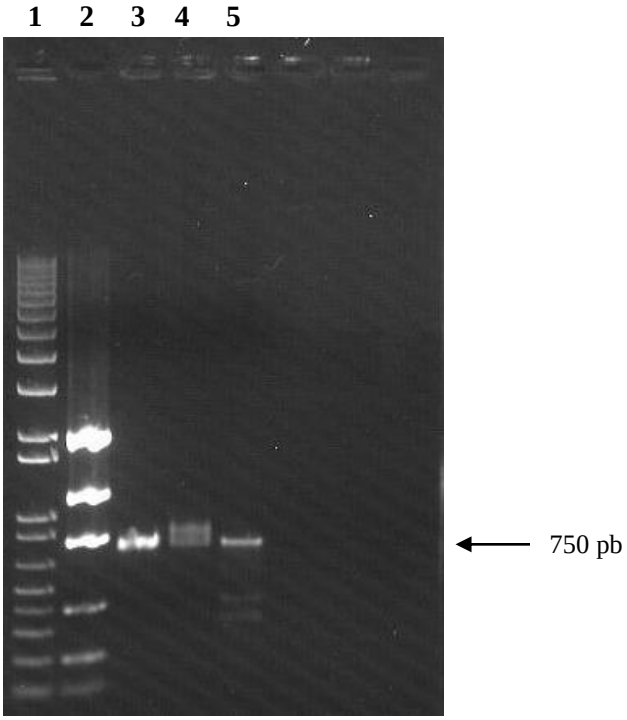


Gel de agarose 1% corado com GelRed (1:50000), visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. **1-** Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **2**- High mass; **3**- pSMT3 (5600 pb), **4**- pPIG16 (3200 pb), **5**- pAE (2900 pb). As setas vermelhas indicam os fragmentos de interesse liberados.
Fonte: Caravelli (2013).

Após a realização da digestão dos vetores, as concentrações definidas para posterior clonagem nesses fragmentos foi de 7 ng para os vetores pSMT3 e pAE, e de 4 ng para o vetor pPIG16.

O mesmo procedimento foi realizado com os genes scFv-intimina sintéticos para a análise de restrição dos fragmentos liberados após a transformação bacteriana por choque térmico, e digestão dos genes com as respectivas enzimas dos vetores de escolha (**Figura 24**).

Figura 24 - Perfil eletroforético da digestão dos genes sintéticos scFv-intimina com as enzimas SacI e HindIII para pSMT3, XmaI e EcoRI para pPIG16 e BamHI e HindIII para pAE.



Gel de agarose 1% corado com GelRed (1:50000), visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. **1-** Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **2**- Low mass; **3**- scFv-intimina digerido com as enzimas do pAE, **4**- scFv-intimina digerido com as enzimas do pSMT3, **5**- scFv-intimina digerido com as enzimas do pPIG16. A seta indica o tamanhos dos fragmentos de interesse liberados de 750 pb.

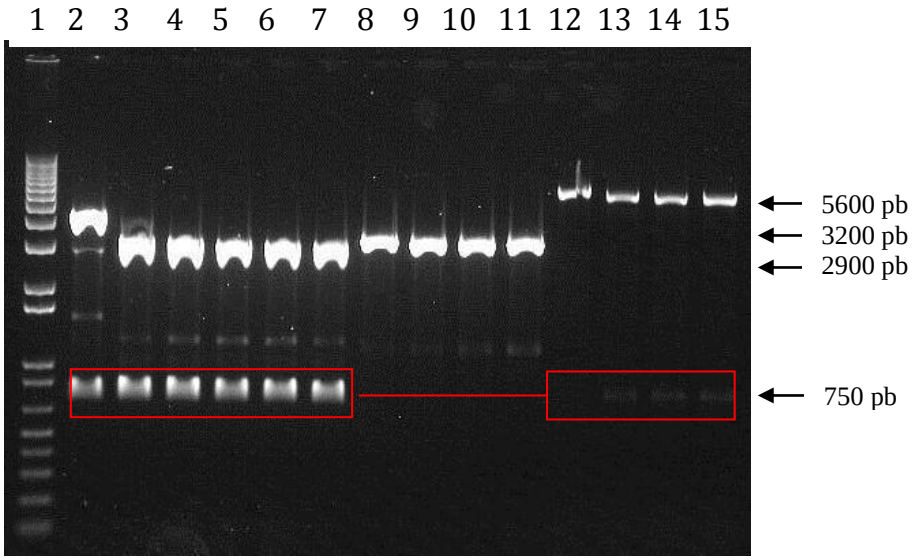
Após a realização da digestão dos insertos, as concentrações definidas para posterior clonagem nos vetores de escolha foram de 40 ng de scFv-intimina em pAE, 10 ng de scFv-intimina em pSMT3 e 20 ng de scFv-intimina em pPIG 16.

Sendo assim, feita a análise de restrição tanto dos vetores como também dos insertos a serem utilizados foi realizada a clonagem do scFv-intimina nos vetores de expressão pSMT3, pAE e pPIG16.

Concluída a ligação dos fragmentos, foi realizada transformação bacteriana por choque térmico e foram escolhidas quatro colônias de cada clone obtido para a extração do DNA plasmidial do pAE scFv-intimina, pPIG16 scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina, respectivamente. Posteriormente foi realizada a digestão dos fragmentos com as enzimas SacI e HindIII para pSMT3 scFv-intimina, XmaI e EcoRI

para pPIG16 scFv-intimina e BamHI e HindIII para pAE scFv-intimina para confirmar a presença dos clones obtidos (**Figura 25**).

Figura 25 - Perfil eletroforético da digestão dos clones pAE scFv-intimina com as enzimas BamHI e HindIII, pPIG16 scFv-intimina com as enzimas XmaI e EcoRI e pSMT3 scFv-intimina com as enzimas SacI e HindIII.



Gel de agarose 0,8% corado com GelRed (1:50000), visualizado em transiluminador com luz ultravioleta. **1-** Padrão molecular 1 Kb DNA Ladder; **2-7** pAE scFv-intimina, **8-11** pPIG16 scFv-intimina, **12-15** pSMT3 scFv-intimina. A seta indica os tamanhos dos fragmentos de interesse liberados de 750 pb (scFv-intimina), 5600 pb para o vetor pSMT3, 3200 pb para o vetor pPIG16 e 2900 pb para o vetor pAE.

Ao analisar a **figura 25**, observa-se que dos 14 clones analisados, em 4 não ocorreu a clonagem como mostrado nas canaletas de 8 a 11. Esses 4 clones, correspondentes ao pPIG16 scFv-intimina, foram descartados. Escolheu-se então os clones referentes ao pAE scFv-intimina (canaletas 3 a 7) e ao pSMT3 scFv-intimina (canaletas 12 a 15) para os posteriores testes de expressão.

Para verificar a correta identidade dos clones obtidos, com a confirmação da presença do inserto de interesse, dois clones sendo um pAE scFv-intimina e outro pSMT3 scFv-intimina foram submetidos a sequenciamento utilizando os iniciadores T7 *Foward* e *Reverse,* para verificação de fase de leitura e presença de mutações. As reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Os resultados indicaram que as sequências analisadas apresentaram 100% de identidade entre os clones pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina, confirmando a clonagem em fase de leitura correta e a ausência de mutações. No **quadro 8** estão os números de aminoácidos presentes, a real massa molecular e o ponto isoelétrico dos clones pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina obtidos pela ferramenta *ProtParam* (disponível em: http://expasy.org/tools/protparam.html).

Quadro 8 - Dados obtidos do *blast* no *Expasy param* dos clones pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina.

	pAE scFv-intimina	**pSMT3 scFv-intimina**
Número de aminoácidos (aa)	246	356
Massa molecular (PM) $^{Predita}/_{real}$	26,58/30,0	39,3/40,0
Ponto isoelétrico (PI)	6,81	6,63

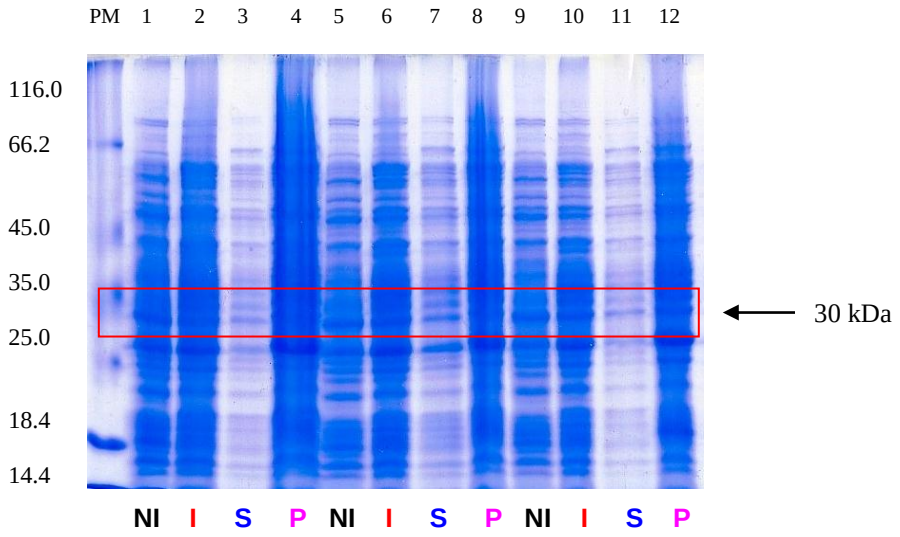
6.2 Expressão do anticorpo recombinante scFv-intimina e análise funcional

Com a clonagem do fragmento scFv-intimina concluída, iniciou-se o processo de expressão do anticorpo recombinante. A linhagem de *Escherichia coli* utilizada para os ensaios preliminares foi a BL21(DE3). Primeiramente, a linhagen de *E. coli* BL21(DE3) competente foi transformada com os clones 1, 2 ou 3 de pAE scFv-intimina e os clones 1, 2 ou 3 de pSMT3 scFv-intimina que foram induzidos com IPTG. A partir da análise do perfil proteico, pode-se observar um componente de massa molecular relativa de 30 kDa para pAE scFv-intimina e 40 kDa para pSMT3 scFv-intimina, na fração induzida das células transformadas com ambos os clones, respectivamente (**Figuras 26 e 27**).

Uma vez definida a cepa de expressão, analisou-se a localização celular da proteína recombinante após indução em pequena escala. Para isso, o volume total da cultura celular induzida (10 mL) foi centrifugado e o precipitado ressuspendido em 1 mL de PBS para sonicação. As frações do sobrenadante do lisado e do precipitado do lisado foram analisadas. Por SDS-PAGE observa-se um componente de massa molecular relativa correspondente à proteína de interesse presente nas frações

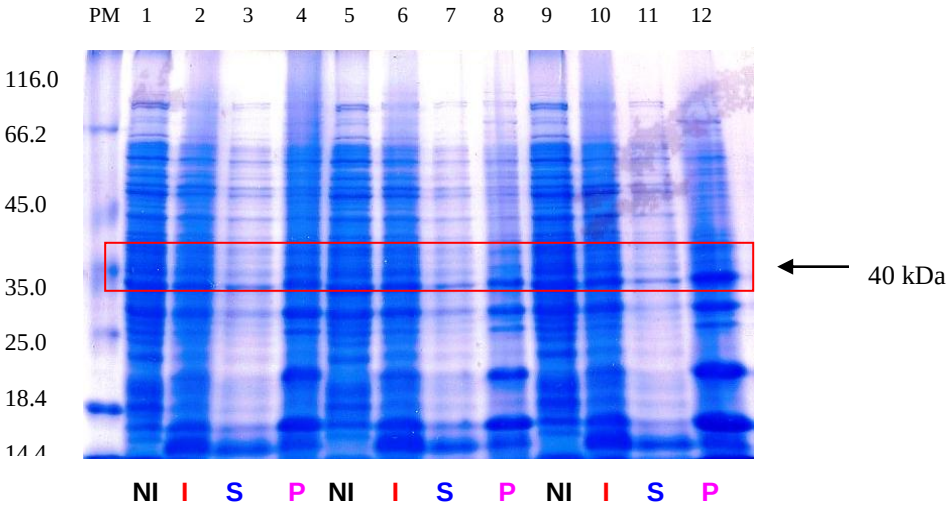
induzida e precipitado do lisado (**Figura 26 e 27 – canaletas 2 e 4, 6 e 8, 10 e 12**) indicando uma expressão em corpúsculos de inclusão da proteína recombinante.

Figura 26 - Perfil eletroforético do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones 1, 2 e 3 de pAE scFv-intimina.



Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% correspondente a expressão do scFv-intimina no vetor pAE: **PM** – Padrão de massa molecular (Protein Misxture – GE), clones 1, 2 e 3 respectivamente - **1-5-9** Fração não-induzida (preto), **2-6-10** Fração induzida (vermelho), **3-7-11** Sobrenadante do lisado (azul) e **4-8-12** Precipitado do lisado (rosa).

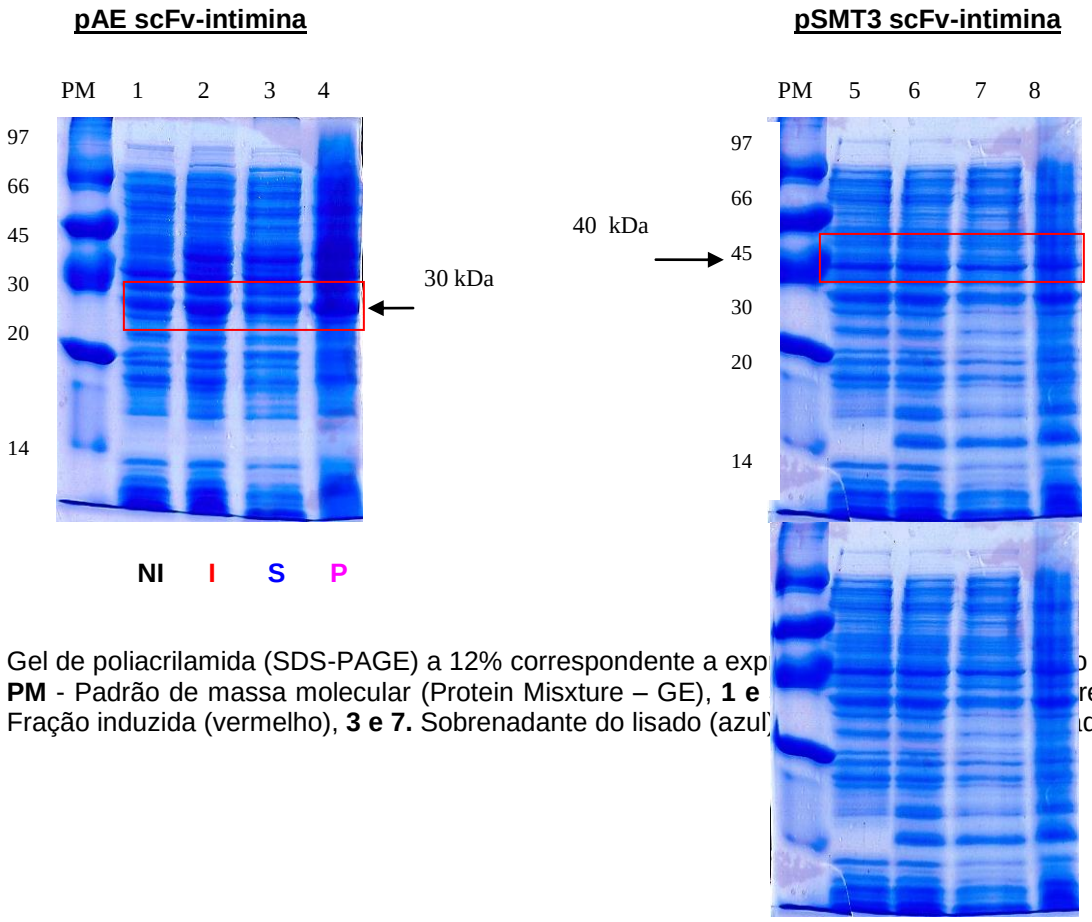
Figura 27 - Perfil eletroforético do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os clones 1, 2 e 3 de pSMT3 scFv-intimina.



Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% correspondente a expressão do scFv-intimina no vetor pSMT3: **PM** - Padrão de massa molecular ((Protein Misxture – GE), clones 1, 2 e 3 respectivamente - **1-5-9** Fração não-induzida (preto), **2-6-10** Fração induzida (vermelho), **3-7-11** Sobrenadante do lisado (azul) e **4-8-12** Precipitado do lisado (rosa).

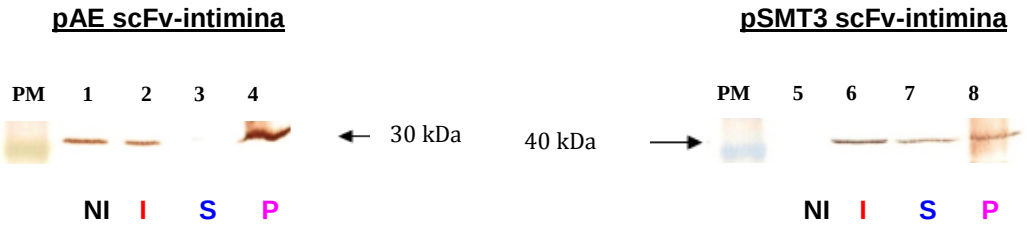
Dentre os clones avaliados, tanto os clones de pAE scFv-intimina quanto os clones de pSMT3 scFv-intimina apresentaram resultados semelhantes entre si. Para continuação das etapas posteriores foi selecionado o clone 1 de cada uma das amostras e o mesmo processo foi repetido para realização de um *immunoblotting* empregando o anticorpo monoclonal IgG anti-histidina que confirmaria a presença dessas proteínas (**Figuras 28 e 29**, respectivamente).

Figura 28 - Perfil eletroforético do ensaio de indução de células *E. coli* BL21(DE3) transformadas com o clone 1 de pAE scFv-intimina e o clone 1 de pSMT3 scFv-intimina.



Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% correspondente a exp o vetor pAE: **PM** - Padrão de massa molecular (Protein Misxture – GE), **1 e** reto), **2 e 6.** Fração induzida (vermelho), **3 e 7.** Sobrenadante do lisado (azul) do (rosa).

Figura 29 - Imunodetecção dos anticorpos recombinantes pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina.



Immunoblotting empregando o anticorpo monoclonal IgG anti-histidina após a indução por IPTG dos anticorpos recombinantes scFv-intimina: **PM -** Padrão de massa molecular (Full Range Rainbow – GE), **1 e 5**. Fração não induzida (preto), **2 e 6.** Fração induzida (vermelho), **3 e 7.** Sobrenadante do lisado (azul), **4 e 8.** Precipitado do lisado (rosa).

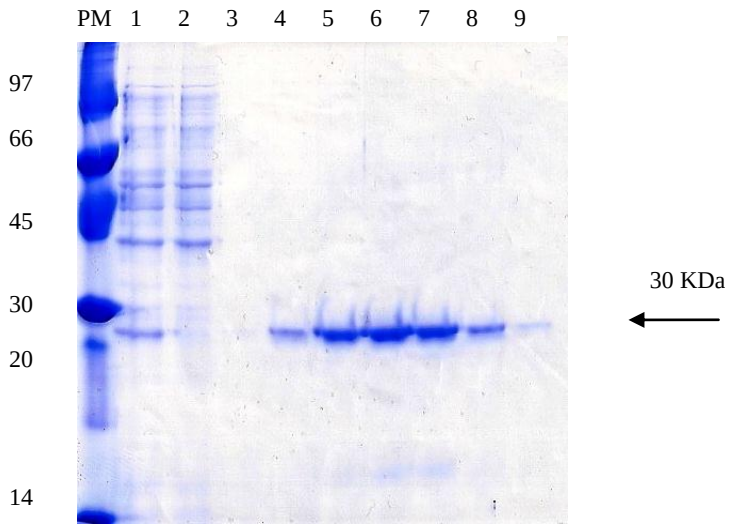
Esses resultados levaram-nos a escolher o clone 1 do pAE scFv-intimina para dar prosseguimento à purificação da proteína em coluna de afinidade a Ni^{2+}, e como se observou a presença da proteína no sobrenadante do cultivo bacteriano (**Figura 29 – canaleta 7**), optou-se pela purificação do clone 1 do pSMT3 scFv-intimina. O método de *Batch* Ni^{2+}*,* foi escolhido por ser mais prático e rápido para a identificação da fração solúvel.

6.2.1 Purificação em coluna de afinidade a Ni^{2+} do anticorpo recombinante pAE scFv-intimina

Com a escolha do clone a ser expresso, além da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) para expressão e determinação das condições de expressão, o próximo passo foi a obtenção do anticorpo recombinante por purificação em coluna de afinidade a Ni^{2+}. Uma vez que a localização celular da proteína recombinante era conhecida, o precipitado do lisado foi tratado com tampão 8 M de ureia para a solubilização da proteína presente em corpúsculos de inclusão, sendo submetida a renaturação por diluição. Diferentes metodologias para a renaturação das proteínas recombinantes são conhecidas e cada uma delas necessitam ser otimizadas, de acordo com a molécula a ser renaturada (VERMA et al., 1998). Durante o processo de renaturação, ocorreu a precipitação de algumas proteínas solubilizadas com o tampão de 8 M de ureia, que foram retiradas após centrifugação e filtragem do

tampão de renaturação. Após sua obtenção, a proteína recombinante foi quantificada, apresentando concentração de 380 µg/mL, tendo um rendimento de 0,5 mg por litro de cultivo bacteriano (**Figura 30**).

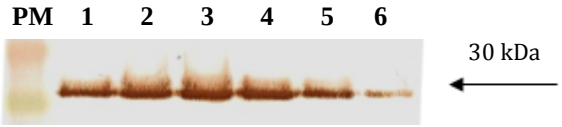
Figura 30 - Perfil eletroforético da purificação do anticorpo recombinante pAE scFv-intimina após indução por IPTG.



Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% correspondente a purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG. **PM -** Padrão de massa molecular (Protein Misxture – GE), **1 –** Fração não purificada, **2**- Lavagem (*flow-through*), **3 a 9** – Frações eluídas a 500 mM de imidazol.

Além da análise por SDS-PAGE a 12%, o processo de purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina também foi analisado por *immunoblotting* empregando o anticorpo monoclonal IgG anti-histidina. Na **figura 31**, observa-se a presença de um componente de massa molecular relativa de 30 kDa presente nas frações eluídas com 500 mM de imidazol.

Figura 31 - Imunodetecção do anticorpo recombinante pAE scFv-intimina após indução por IPTG.



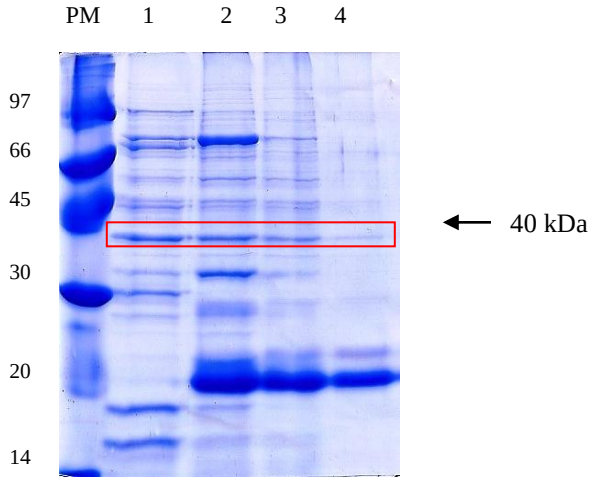
Immunoblotting, empregando o anticorpo monoclonal IgG anti-histidina, da purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG. **PM -** Padrão de massa molecular (Full Range Rainbow - GE), **1 a 6** – Frações eluídas a 500 mM de imidazol.

6.2.2 Purificação do anticorpo recombinante pSMT3 scFv-intimina por batch NI^{2+}

Ao analisar-se o *immunoblotting* (**Figura 29**), verificou-se a presença do anticorpo recombinante na fração do sobrenadante do lisado (**Figura 29**, canaleta 7), sendo este também utilizado para obtenção do anticorpo recombinante. As concentrações de imidazol empregadas no processo de purificação foram 20 mM, 40 mM e 60 mM, por 10 minutos cada, para eliminação das proteínas contaminantes. A eluição do anticorpo recombinante foi realizada com 2 mL de tampão de eluição (50 mM Tris-Hcl; 200 mM de cloreto de sódio; 500 mM de imidazol – pH 8.0), incubando-o com a resina por 1 hora.

Pela análise do perfil eletroforético realizado com as frações coletadas durante o processo de purificação, observou-se um componente de massa molecular relativa de 40 kDa referente ao anticorpo recombinante obtido a partir do pSMT3 scFv-intimina (**Figura 32**). A fração da eluição (canaleta 1) também apresenta proteínas contaminantes além da proteína de interesse, indicando que as concentrações de imidazol não foram suficientes para a retirada das mesmas.

Figura 32 - Perfil eletroforético da purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG.

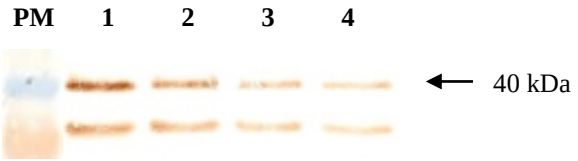


Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% correspondente a purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG. **PM -** Padrão de massa molecular (Protein Mixture – GE), **1 –** Fração eluída com 500 mM de imidazol, **2**- Fração eluída com 60 mM de imidazol, **3** – Fração eluída com 40 mM de imidazol, **4-** Fração eluída com 20 mM de imidazol.

O componente proteico observado no gel de SDS-PAGE foi confirmado através da sua detecção no *immunoblotting* (**Figura 33**).

Infelizmente, essa proteína recombinante não pode ser utilizada, pois a presença de contaminantes e o baixo rendimento protéico inviabilizariam a realização de todos os testes funcionais.

Figura 33 - Imunodetecção, empregando o anticorpo monoclonal IgG anti-histidina, da purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG.



Immunoblotting da purificação do anticorpo recombinante scFv-intimina após indução por IPTG. Canaletas: **PM -** Padrão de massa molecular (Full Range Rainbow – GE), **1 –** Fração eluída com 500 mM de imidazol, **2**- Fração eluída com 60 mM de imidazol, **3** – Fração eluída com 40 mM de imdazol, **4-** Fração eluída com 20 mM de imidazol.

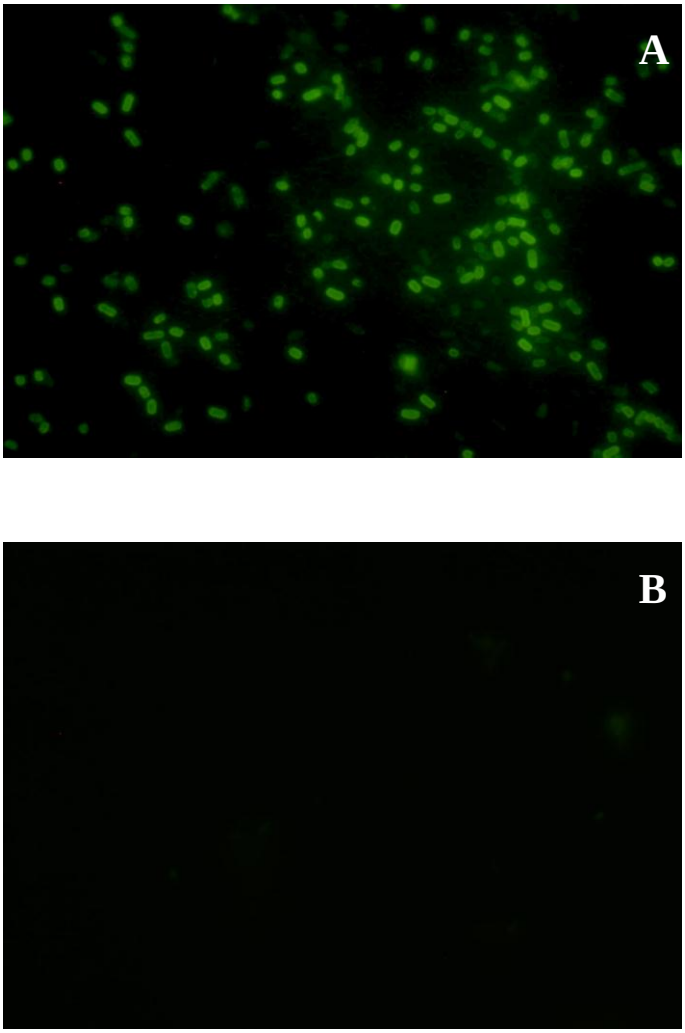
6.3 Análise funcional do anticorpo recombinante scFv-intimina

6.3.1 Reatividade do scFv-intimina por imunofluorescência indireta

O anticorpo recombinante purificado a partir de corpúsculos de inclusão foi então submetido a ensaios funcionais.

Para isso, os isolados E2348/60, protótipo de tEPEC e H10407, protótipo de ETEC, foram cultivados e pelo ensaio de imunofluorescência, o scFv-intimina mostrou-se reativo (**Figura 34A**), reconhecendo o isolado E2348/69 e não reativo com o isolado H10407 (**Figura 34B**).

Figura 34 - Reatividade do scFv-intimina frente aos controles, por ensaio de imunofluorescência indireta.



Isolados de E2348/69 e H10407 permeabilizados e incubados com scFv-intimina na concentração de 13 µg/ml, anticorpo monoclonal IgG anti-histidina 1:2000 e anticorpo conjugado a FITC de camundongo 1:100. **A:** E2348/69, **B:** H10407.

6.3.2 Validação do scFv-intimina

Foram analisados 199 isolados na sua totalidade sendo incluídos os isolados controles positivo (E2348/69) e negativo (H10407). O percentual de reatividade do scFv-intimina com os isolados está descrito na **tabela 1**.

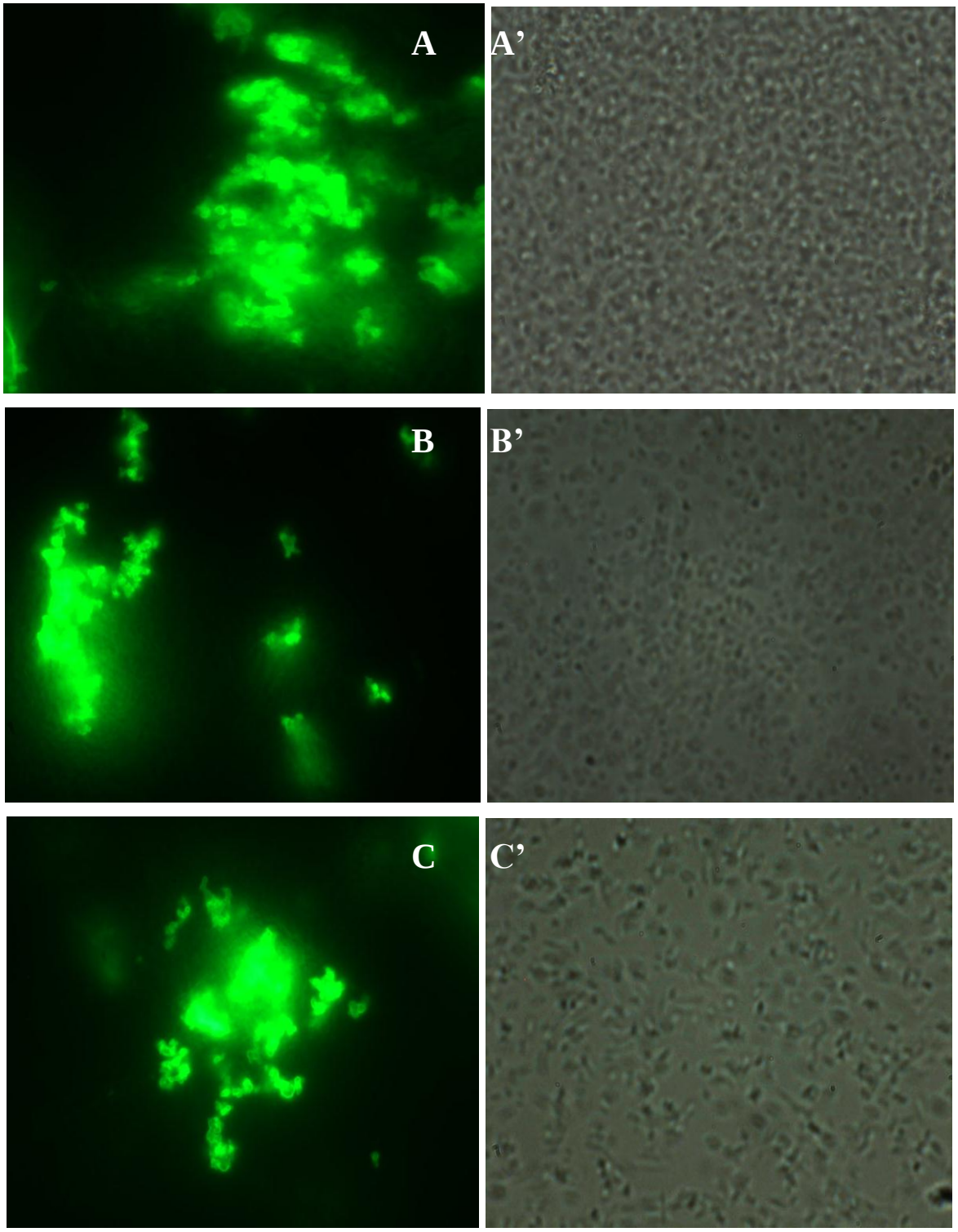
Tabela 1 - Percentual de reatividade do scFv-intimina nos diferentes isolados de *E. coli* e outras enterobactérias.

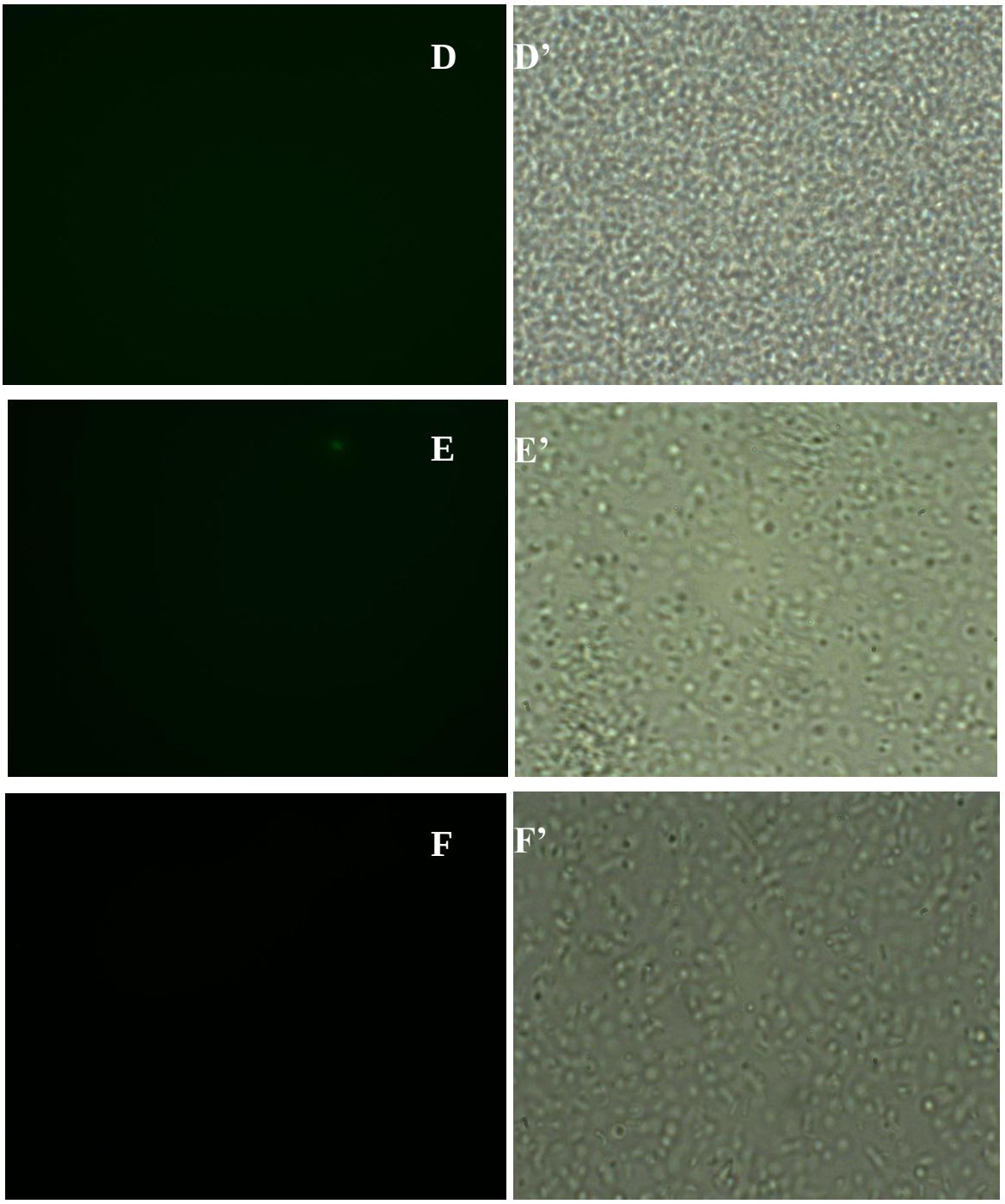
Patotipos	Número de isolados	Percentual de reatividade (%)	TOTAL
aEPEC	72	100	72/72
tEPEC	37	100	37/37
EHEC	23	100	23/23
ETEC	10	0	0/10
EAEC	10	0	0/10
EIEC	10	0	0/10
DAEC	10	0	0/10
STEC	5	0	0/5
***E. coli* S.F.V.**	10	0	0/10
ENTEROBACTÉRIAS	10	0	0/10

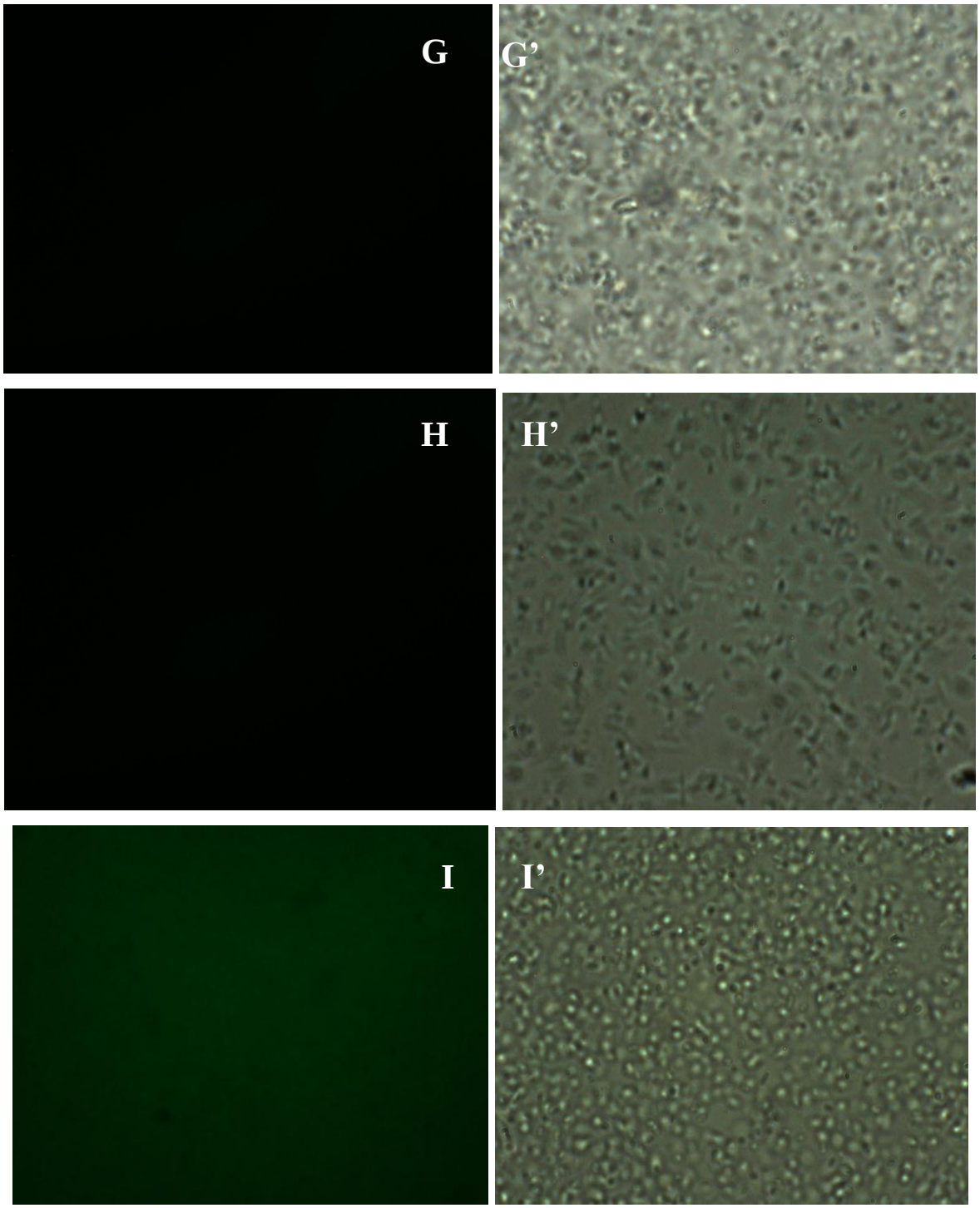
Nota: aEPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica atípica)
tEPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica típica)
EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica)
ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica)
EAEC (*Escherichia coli* enteroagregativa)
EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasora)
DAEC (*Escherichia coli* de adesão difusa)
STEC (*Escherichia coli* produtora da toxina de shiga)
E. coli S.F.V. (*Escherichia coli* sem fator de virulência para DEC)

Ao analisar os dados da **tabela 1**, pode-se concluir que o scFv-intimina é sensível (100%) e específico (100%). Um painel representativo da reatividade, ou não do scFv-intimina por imunofluorescência indireta pode ser observado na **Figura 35: A** – aEPEC, **B** – tEPEC, **C** – EHEC, **D** – ETEC, **E** – EAEC, **F** – EIEC, **G** – DAEC, **H** – STEC, **I** – *E. coli* S.F.V, e **J** – Outras enterobactérias.

Figura 35 - Painel representativo da reatividade, ou não do scFv-intimina por imunofluorescência indireta.




D
D'
E
E'
F
F'


G
G'
H
H'
I
I'

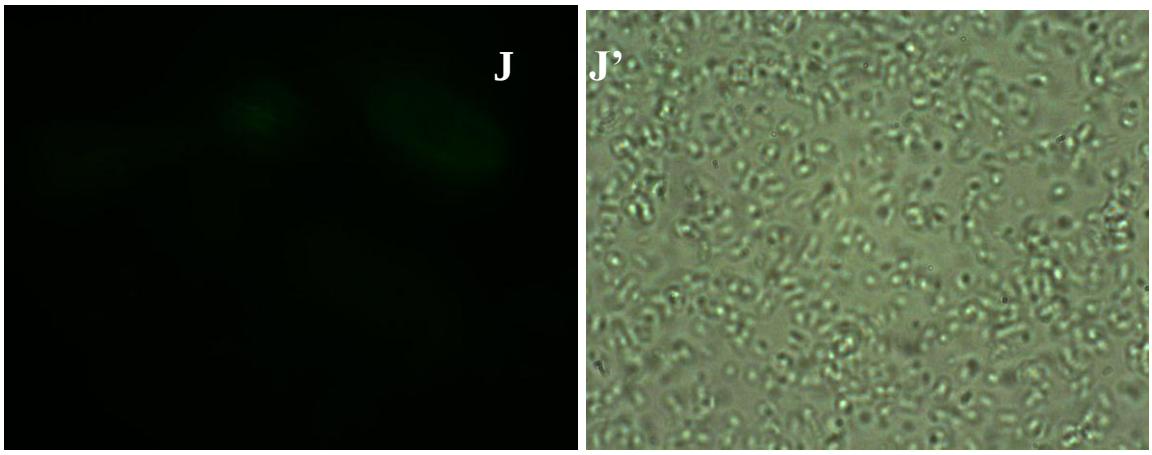


Ilustração de um isolado de cada categoria analisada, permeabilizados e incubados com scFv-intimina na concentração de 30 µg/mL, anticorpo monoclonal IgG anti-histidina 1:2000 e anticorpo conjugado a FITC de camundongo 1:100. **A:** aEPEC, **A’**: aEPEC ML **B:** tEPEC, **B’:** tEPEC ML, **C**: EHEC, **C’**: EHEC ML, **D**: ETEC, **D’**: ETEC ML, **E**: EAEC, **E’**: EAEC ML, **F**: EIEC, **F’**: EIEC ML, **G**: DAEC, **G’**: DAEC ML, **H**: STEC, **H’**: STEC ML, **I**: *E. coli* S.F.V, **I’**: *E. coli* S.F.V ML, e **J:** Outras enterobactérias, **J’:** Outras enterobactérias ML.

7 DISCUSSÃO

A diarreia é um grave problema de saúde pública mundial, principalmente em regiões menos favorecidas. Dados da Organização Mundial de Saúde apontam que as infecções são desencadeadas a partir do consumo de alimentos contaminados como carne mal cozida, saladas, água não potável ou até mesmo pela propagação entre pessoas que vivem em precárias condições sanitárias (ausência de água tratada e saneamento básico). Como medidas preventivas, além do melhoramento das condições sanitárias e acesso a água tratada, as ações de boas práticas de higiene e a vacinação são de extrema importância (CLEMENTS et al., 2012; WHO, 2012).

O controle dos surtos de diarreia depende do rápido diagnóstico e identificação da fonte de infecção. No entanto, na rotina de laboratórios clínicos, somente os ensaios de identificação do antígeno somático têm sido amplamente aplicados no diagnóstico de doenças gastrointestinais causadas por EPEC e EHEC, essa identificação não é conclusiva, pois não há correlação entre sorogrupo e as diferentes categorias de *E. coli* diarreiogênica. Além disso, no caso das EHEC, apenas o sorotipo O157:H7 é pesquisado, mesmo não sendo o único representante deste patotipo (CAMPOS et al., 2004b; TRABULSI et al., 2002).

A identificação dos genes de virulência característicos seria uma escolha para a detecção dos patotipos das DEC. A técnica de PCR simples, multiplex PCR ou até mesmo o uso de sondas de DNA para a detecção de genes de virulência, tem sido empregados com sucesso na identificação de EPEC e EHEC, assim como outras categorias de DEC (ARANDA et al., 2004, 2007; BUERIS et al., 2007; COCOLIN et al., 2000; FENG; MONDAY, 2000; FRANKE et al., 1994; KARCH; MEYER, 1989; KIMATA et al., 2005; MÜLLER et al., 2006; OSEK, 2003; PASS et al., 2000; PATON; PATON, 1998, 2002; PERSSON et al., 2007; RAPPELLI et al., 2001; RICH et al., 2001;). No entanto, estes testes não são factíveis na realidade de países em desenvolvimento por serem economicamente inviáveis. Além disso, a detecção do gene não garante a expressão do fator de virulência correspondente (ABE et al., 2009; MENEZES et al., 2010; NARA et al., 2010; VILHENA-COSTA et al., 2006).

Dentre os métodos para detecção da expressão dos fatores de virulência, os ensaios imunossorológicos podem ser considerados a primeira via alternativa, por apresentarem alta sensibilidade determinada pelos anticorpos policlonais, e alta especificidade determinada pelos anticorpos monoclonais que se apresentam de forma homogênea e são produzidos ilimitadamente (MURPHY et al., 2008; SVENNERHOLM et al., 1986). Diante disso, em nosso laboratório foram produzidos anticorpos específicos para as toxinas LT e ST de ETEC (MENEZES, 2002; MENEZES et al., 2003, 2006), para a toxina Pet de EAEC (VILHENA-COSTA et al., 2006) e para a toxina Stx de STEC (MENDES-LEDESMA et al., 2008; ROCHA et al., 2012).

Em comum, EPEC e EHEC compartilham um mesmo fator de virulência, a adesina intimina (ADU-BOBIE et al., 1998), que por ser altamente imunogênica, demonstra ser um importante alvo para imunodiagnóstico (JERSE; KAPER; 1991).

Dessa forma, anticorpos policlonais anti-intimina (KOGA et al., 2003) e anticorpos monoclonais IgG2a e IgG2b foram obtidos e caracterizados (MENEZES et al., 2010). Por *immunoblotting* contendo extrato protéico de diversos isolados bacterianos foi observado uma especificidade de 100% de ambos os anticorpos. Esses autores identificaram uma reatividade de 97% dos anticorpos policlonais e 68,8% dos anticorpos monoclonais, que apesar de ser uma reatividade maior do que 50%, ainda é um percentual inferior para o imunodiagnóstico (MENEZES et al., 2010).

Diante disso, para tentar melhorar esta reatividade e utilizando a tecnologia de anticorpos recombinantes, um fragmento variável de cadeia única (scFv) do anticorpo anti-intimina foi obtido e foram realizados testes funcionais e modelagens estruturais *in sílico* deste anticorpo, mostrando o perfeito reconhecimento do mesmo frente aos isolados controles (MENEZES et al., 2011).

Inicialmente, a estratégia do presente trabalho era construir um gene sintético scFv-intimina partindo do clone obtido por Menezes et al (2011) para a validação do imunodiagnóstico. O gene sintético foi construído, subclonado no vetor de expressão pAE (RAMOS et al, 2004), expresso em *E. coli* BL21 e purificado por cromatografia de afinidade ao níquel. No entanto, após os primeiros ensaios para testar sua reatividade por imunofluorescência indireta, constatou-se que o anticorpo não era

estável. Isto nos levou a analisar novamente a sequência de aminoácidos do scFv-intimina, e se observou que a porção variável da cadeia leve (V_L) era aberrante, ou seja, faltava uma cisteína antes do CDR-L3 da cadeia leve, a qual é um pré-requisito para o perfeito reconhecimento das regiões determinantes de complementariedade, sendo que a porção variável da cadeia pesada (V_H) confere a especificidade do anticorpo e a porção variável da cadeia leve (V_L) confere a estabilidade (HOLLINGER; HUDSON, 2005).

Uma vez que os linfócitos B ou hibridomas podem ser utilizados como fonte do material genético para a amplificação das regiões variáveis leve e pesada, partiu-se para a contagem de suas células a fim de se averiguar se o número de células era suficiente para extração de RNA total, no caso do kit utilizado neste trabalho, o número de células deveria ser inferior a 3-4 X 10^6 células por mL. O RNA total de hibridomas produtores de anticorpos anti-intimina foi então extraído, e utilizado para a amplificação de uma nova porção variável da cadeia leve, que por sequenciamento, comprovou-se que a mesma era normal e não aberrante, e possuía 350 pares de bases (GE HEALTHCARE, 2002; KOHLER; MILSTEIN, 1975; SVENNERHOLM et al., 1986;).

Partindo das análises anteriores, construiu-se um segundo gene sintético utilizando a sequência da porção variável da cadeia pesada (V_H) e o ligante peptídico obtido por Menezes et al. (2011), e a nova sequência da porção variável da cadeia leve (V_L).

Com as sequências confirmadas, a próxima etapa foi selecionar os vetores que seriam utilizados para a expressão do gene sintético. Escolheu-se três vetores com diferentes estratégias de expressão.

O primeiro vetor de escolha foi o vetor pAE, que une as características de pET3-His e pRSET. O vetor pET3-His tem a vantagem de conter seis resíduos de histidina na porção N-terminal e múltiplos sítios de clonagem a apenas nove aminoácidos a partir da metionina, mas a sua origem de replicação (pBR322) não possui alto número de cópias. Por outro lado, o vetor pRSET tem a vantagem de conter uma origem de replicação de alto número de cópias (pUC19), mas não contém múltiplos sítios de clonagem como no sistema pET. O vetor pAE foi construído com a base do vetor pRSET contendo a origem de replicação de alto

número de cópias, com o sítio múltiplo de clonagem contendo 6 resíduos de histidina a partir do vetor pET3-His. Além disso, o vetor pAE tem um tamanho reduzido (2,8 kb) se comparado ao pET3-His (4,6 kb) e o pRSET (2,9 kb). Utilizando este vetor, Ramos et al (2004) clonaram o fragmento C de toxina tetânica (Fc) e expressaram em *E. coli* BL21 (DE3). A fração Fc foi expressa de forma insolúvel, mas com um bom rendimento. Devido essas vantagens, o vetor pAE foi um dos vetores escolhidos para a expressão de scFv anti-intimina.

O segundo vetor de escolha foi o vetor pSMT3, o qual é fusionado à proteína SUMO (*Small Ubiquitin-related modifier*) utilizada para promover a solubilidade de proteínas recombinantes. Outras proteínas de fusão também são descritas na literatura como a GST (*Glutatione S-Transferase*), a MBP (*Maltose Binding Protein*) e a NUS-A (*N-Utilizing substance A*). A proteína SUMO mostra-se bastante eficaz além de garantir a solubilidade. Em conjunto, o vetor pSMT3 promove elevados níveis de expressão da proteína recombinante por possuir o promotor T7, assim como o vetor pAE. Uma das maiores vantagens do sistema de fusão SUMO é a sua protease, que remove a proteína SUMO através da clivagem, em diferentes temperaturas e pH, de forma precisa e eficaz ao fazer o reconhecimento da estrutura terciária, diferenciando-se das demais proteases de fusão que normalmente reconhecem sequências curtas e degeneradas de peptídeos (BUTT et al, 2005; ZUO et al, 2005).

O terceiro vetor é o vetor pPIG16, que por possuir um peptídeo sinal, expressa a proteína para a sua liberação no periplasma. É um vetor derivado do pPIC9 (Invitrogen), que foi modificado inicialmente por Andrade et al., (2000), acrescentando-se sítios de clonagens e a própria sequência da proteína A, com o objetivo de torná-lo ideal para a expressão de scFvs recombinantes. Este vetor foi novamente melhorado por meio da retirada de sítios de restrição indesejáveis, a fim de aumentar a meia vida do fragmento de anticorpo, melhorando assim, a eficiência do sistema de expressão (BRIGIDO et al., 1993).

O desenvolvimento do DNA recombinante e das técnicas de produção de proteínas heterólogas em micro-organismos vem possibilitando vários avanços na produção de anticorpos (MARANHÃO; BRÍGIDO, 2001). Grande parte dos esforços despendidos na expressão de proteínas heterólogas, visando obtê-las em quantidade adequada para estudos funcionais e estruturais posteriores, se concentra

na experimentação de sistemas de expressão alternativos, incluindo bactérias, leveduras, células de insetos e mamíferos; e no uso de proteínas de fusão como facilitadores do enovelamento e purificação de proteínas recombinantes como citado anteriormente.

O sistema mais comumente utilizado para a expressão de proteínas heterólogas é o que utiliza *E. coli* como célula hospedeira (LEWIN, 1994, 1997; STRYER, 1988; ZAHA et al., 1996). Este sistema é amplamente difundido deviso à facilidade e baixo custo de se cultivar esta bactéria, e pela reprodutibilidade e abundância de proteínas que a mesma produz. Além disso, modificações nos vetores e linhagens de *E. coli* são frequentemente feitas no sentido de aumentar a eficiência e versatilidade do sistema original.

A eficiência da expressão de proteínas heterólogas está na combinação de inúmeros fatores como o vetor de expressão, a célula hospedeira, a composição do meio de cultura e a temperatura de indução da expressão, a cepa de *E. coli* que foi utilizada no presente estudo para atender a todas essas necessidades, foi a *E. coli* BL21(DE3), a qual proporcionou um bom nível de expressão do scFv-intimina nas construções pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina, não sendo observada nenhuma banda além da predita. A construção pPIG16 scFv-intimina foi descartada antes mesmo da expressão do scFv-intimina, pois infelizmente a subclonagem do scFv-intimina no vetor pPIG16 não ocorreu.

Diante desse resultado, com a cepa de escolha, as construções desejadas, e a confirmação dos clones por sequenciamento, partiu-se para a expressão dos fragmentos pAE scFv-intimina e pSMT3 scFv-intimina. Inicialmente, foram testados três clones de cada construção para verificar a melhor expressão, e assim, escolher apenas um clone de cada para expressar em larga escala e realizar a purificação. Dentre os clones avaliados, todos tanto pAE scFv-intimina como o pSMT3 scFv-intimina apresentaram resultados semelhantes entre si. Portanto, um clone de cada uma das proteínas foi selecionado, e o mesmo processo foi repetido para realização de um *immunoblotting*.

A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*, muitas vezes ocorre na forma de corpúsculos de inclusão. Esses agregados, além de tornar o processo de purificação mais trabalhoso, devem ser solubilizados com agentes desnaturantes

para que possam ser purificados, e uma vez desnaturados, um processo de reenovelamento (*refolding*) é necessário para reconstituir a conformação original da proteína. Como esse processo de reenovelamento nem sempre é eficiente, a obtenção da proteína recombinante na forma solúvel e funcional seria desejável (BURGESS, 2009; NOVAGEN, 2003).

Ao analisar-se os resultados anteriores, escolheu-se o clone 1 do pAE scFv-intimina para dar prosseguimento à purificação da proteína em coluna de afinidade a Ni^{2+}, e o clone 1 do pSMT3 scFv-intimina para ser purificado pelo método de *Batch* pela presença de proteínas na fração solúvel.

O aumento dos níveis de expressão de proteínas recombinantes pode ser influenciado pela temperatura de indução, concentração do agente indutor e até mesmo pelo meio de cultura a ser utilizado (MAKINO; SKRETAS; GEORGIOU, 2011), sendo assim, ambos os clones foram induzidos em larga escala utilizando um meio de cultura rico o 2YT, o qual pode aumentar em até quatro vezes a expressão do scFv-intimina na forma solúvel, sendo por isso testado para a expressão do pSMT3 scFv-intimina (KIPRIYANOV, 2009).

Com o intuito de se obter o anticorpo recombinante na sua forma solúvel, o pSMT3 scFv-intimina foi purificado pelo sistema *batch*. Este método de purificação é rápido e simples, pois é utilizado um pequeno volume de amostra e consiste na separação das frações de lavagem, em que o tampão não pode ser removido totalmente, e eluição, através da decantação da resina com diferentes concentrações de imidazol para detectar a existência de uma fração solúvel protéica (PORTES JUNIOR, 2010). Infelizmente, a fração eluída apresentou além da proteína de interesse de massa molecular relativa de 40 kDa, proteínas contaminantes, indicando que as concentrações de imidazol não foram suficientes para a retirada das mesmas. Esta proteína recombinante não foi utilizada, pela presença de contaminantes na amostra eluída, e pelo baixo rendimento obtido para os testes de imunofluorescência indireta a serem realizados. A presença destas proteínas contaminantes dificultaria a quantificação da proteína SUMO scFv-intimina, necessária para o cálculo da concentração de protease SUMO a ser utilizada para a clivagem da proteína de fusão (BATCH AND SPIN CUP METHODS FOR AFFINITY PURIFICATION OF PROTEINS, 2002).

O pAE scFv-intimina foi expresso de forma insolúvel, sendo necessário realizar o tratamento de solubilização da proteína de interesse presente no corpúsculo de inclusão. O precipitado do lisado foi desnaturado com ureia 8 M, e renaturado em concentrações decrescentes do mesmo agente desnaturante. Por SDS-PAGE, observou-se um componente de massa molecular relativa de 30 kDa, o qual foi quantificado e apresentou uma concentração de 380 µg/mL, comprovando a eficácia na obtenção do pAE scFv-intimina purificado.

A proteína expressa contém quatro resíduos de cisteína, apresentando duas pontes dissulfeto, que foram quebradas com o tratamento de solubilização. Com o intuito de reconstituir essas pontes, foi utilizado glutationa oxidada como agente oxidante em uma das etapas da renaturação (UMETSU et al., 2003). Uma pequena quantidade da proteína precipitou, no entanto, recuperou-se grande quantidade (cerca de 0,5 mg/L) da fração solubilizada. Essa fração foi utilizada nos ensaios de funcionalidade, possibilitando assim, o retorno à estrutura conformacional original.

Ao correlacionar-se a obtenção do scFv-intimina após os processos de purificações anteriores, a metodologia de renaturação utilizada na construção pAE scFv-intimina mostrou-se eficiente na recuperação da conformação nativa do fragmento scFv-intimina, comprovando que a adição de glutationa oxidada ao tampão de renaturação, em determinadas fases do processo, parece garantir a obtenção da conformação nativa dos fragmentos dos anticorpos, já que promovem a formação correta das pontes de dissulfeto, além de evitarem a agregação de proteínas (UMETSU et al., 2003); em contraste com a metodologia de purificação da fração solúvel do pSMT3 scFv-intimina que não foi eficaz, sendo descartada dos ensaios posteriores de funcionalidade. Após a obtenção do scFv-intimina purificado, verificou-se a reatividade por imunofluorescência indireta.

Os primórdios da imunofluorescência datam de 1942, quando Albert Coons e colaboradores, demosntraram a marcação de anticorpos antipneumococos com fluorescência no tecido pulmonar.

As reações imunológicas que envolvem a ligação antígeno-anticorpo podem ser visualizadas ou quantificadas por meio de diferentes marcadores para o antígeno ou para o anticorpo. Entre os marcadores mais comumente empregados podem-se citar os fluorocromos, as enzimas e os compostos radioativos e eletro-opacos.

Os fluorocromos são corantes que absorvem radiação (luz ultravioleta), são por ela excitados e emitem luz visível. Para que funcionem como marcadores, necessitam possuir grupos químicos capazes de formar ligações covalentes com moléculas protéicas, emitindo alta fluorescência no espectro visível com coloração distinta da emitida pelos tecidos. Devem ter uma conjugação relativamente simples, retenção da atividade do anticorpo na proteína marcada e estabilidade do conjugado fluorescente obtido. Um dos fluorocromos mais utilizados é o isoticianato de fluoresceína (FITC), de cor verde, que tem um pico de absorção de 4901 e de emissão de 5201. A rodamina (isoticianato de tetrametil – TRICT), outro agente utilizado de cor vermelha, possui picos distintos (5201 e 6101). O microscópio utilizado para a leitura de imunofluorescência direta ou indireta pode ser de epiluminescência ou confocal (AOKI et al., 2010).

Atualmente, os estudos de imunofluorescência são determinantes no diagnóstico laboratorial de diversas infecções e doenças autoimunes, como também permite a avaliação de auto-anticorpos circulantes, sendo, muitas vezes, possível a correlação clínico-laboratorial dos doentes (AOKI et al., 2010).

Existem dois tipos de imunofluorescência: a imunofluorescência direta em que o anticorpo específico marcado com fluorocromo (conjugado) é adicionado e se fixa ao antígeno, formando um imunocomplexo estável, sendo que o anticorpo não ligado é removido por lavagens e o preparado é observado em microscópio de fluorescência; e a imunofluorescênia indireta que pode ser utilizada para a pesquisa de anticorpos ou para a pesquisa de antígenos (DUARTE et al., 2003; SCHAER et al., 2010).

Para a pesquisa de anticorpos, antígenos padronizados são fixados a lâminas de vidro, o soro do paciente é diluído e colocado sobre o antígeno, sendo incubado para permitir a formação do complexo antígeno-anticorpo. Realizam-se lavagens para a retirada dos anticorpos não ligados e a preparação é incubada com o conjugado fluorescente, na presença de anticorpo no soro, o conjugado reage com o anticorpo específico para o antígeno, sendo o preparado observado em microscópio de fluorescência. Para a pesquisa de antígenos, que é a técnica usada no nosso estudo, incuba-se a célula, molécula ou tecido que se quer pesquisar o antígeno com o anticorpo específico, levando à formação de um imunocomplexo, realizam-se as

lavagens para a retirada do anticorpo não ligante excedente e a preparação é incubada com um conjugado antiimunoglobulina, marcado com fluorocromo, produzido em outra espécie animal, sendo o preparado observado em microscópio de fluorescência (DUARTE et al., 2003; SCHAER et al, 2010).

As técnicas de imunofluorescênia ainda são empregadas na rotina laboratorial no diagnóstico de várias doenças infecciosas como a doença de Chagas, Aids, Hepatites e complexos em doenças auto-imunes, mas estão sendo gradativamente substituídas por testes imunoenzimáticos, principalmente devido à necessidade de um microscópio de fluorescência, pela sua subjetividade na leitura e por não ser automatizado (DUARTE et al., 2003; SCHAER et al., 2010).

No entanto, por se tratar de uma proteína de membrana externa não majoritária, a intimina é de difícil dissociação da bactéria, portanto difícil de ser utilizada nos testes imunoenzimáticos. Vários protocolos foram testados na tentativa de remover esta proteína da membrana: lise por ureia, polimixina, EDTA, aquecimento, detergentes, porém nenhum processo foi eficiente o bastante para detecção da intimina por ELISA ou *immuno dot*. A explicação para este fato seria a hipótese de após rompimento celular, por ser transmembrânica, grande porção de intimina ficaria presa nas porções celulares lisadas e não é liberada para o sobrenadante; ou quando liberada, aparece em quantidades insuficientes e somente detectadas na sua forma desnaturada e linearizada por *immunoblotting* (MENEZES et al., 2010).

Neste sentido, foi utilizada a técnica de imunofluorescênia indireta para a pesquisa de antígenos, a fim de testar a funcionalidade do scFv-intimina, já que a mesma utiliza etapas de permeabilização e fixação para facilitar o acesso do scFv-intimina ao antígeno alvo (intimina), além de possuir elevadas sensibilidade e especificidade, boa reprodutibilidade, e ser uma técnica de fácil execução e padronização, podendo-se utilizar o mesmo conjugado em diferentes sistemas de detecção.

Alguns estudos descritos na literatura utilizam a técnica de imunofluorescência indireta para determinar a viabilidade e rotulagem de anticorpos (MOYES, 2009); avaliar a infecção de determinadas plantas hospedeiras como é o caso da *Xilella fastidiosa* (CARBAJAL et al., 2004); para detectar anticorpos contra um determinado vírus murino em camundongos (KITAGAWA et al., 2010); ou até mesmo na

avaliação de auto-anticorpos anti-nucleares em células HEp-2. No entanto, a maioria desses ensaios são realizados em cultura celulares, para indentificar o processo infeccioso, invasão celular e atividade dos anticorpos frente ao antígeno utilizado. Em contraste, no nosso trabalho utilizou-se um protocolo de imunofluorescência indireta adaptado, ou seja, os ensaios foram realizados em suspensões bacterianas e não em culturas celulares, permitindo assim, o perfeito reconhecimento da intimina em EPEC e EHEC pelo scFv-intimina.

Algumas tentativas de padronização do ensaio de imunofluorescência indireta foram realizadas, tendo apenas uma variável a ser padronizada a cada ensaio. Inicialmente, foram testados os solventes para as lavagens em solução de PBS contendo leite desnatado (5%) e o BSA (Sigma - 1%). O BSA foi escolhido por eliminar os não ligantes em cada processo mantendo o fundo livre de artefatos para uma boa visualização da lâmina. Em seguida, diferentes concentrações do Triton-X-100 (Sigma), 1%, 2% e 4% alternadas entre 10, 15 e 20 min de agitação foram testadas. A concentração de 4% a 10 min foi a ideal para os nossos ensaios, pois a permeabilização foi eficaz mantendo a integridade dos isolados bacterianos. Após, foram testados diferentes fixadores como o formaldeído (Sigma) a 1%, 2% e 4%; o metanol (Sigma), a acetona (Sigma) e o etanol puro (Sigma) alternados entre 10 e 20 min. O formaldeído 1% a 20 min foi o fixador de escolha, pois manteve as amostras permeabilizadas anteriormente. E por fim, a última variável testada foi o FITC (Sigma) nas diluições 1:50 e 1:100, em que a diluição 1:100 escolhida determinou uma excelente identificação e visualização dos isolados bacterianos.

Dessa forma, padronizadas as etapas da imunofluorescência indireta com os isolados controles positivo (E2349/69) e negativo (H10407), realizou-se a varredura dos isolados propostos. Foram analisados 72 isolados de aEPEC, 37 isolados de tEPEC, 23 isolados de EHEC, todos positivos comprovando a existência do gene *eae* nestas amostras; e 10 isolados de ETEC, 10 isolados de EAEC, 10 isolados de EIEC, 10 isolados de DAEC, 5 isolados de STEC, 10 isolados de *E. coli* sem fator de virulência para DEC e 10 isolados de outras enterobactérias, todos negativos comprovando a ausência do gene eae, sendo totalizados 199 isolados computando com os isolados controles. Os ensaios de imunofluorescência indireta resultaram na

detecção de 132 isolados *eae*-positivos (100% de sensibilidade) e a não detecção de 67 isolados *eae*-negativos (100% especificidade).

Com base neste estudo, a indicação de aplicação do teste de imunofluorescência indireta para a detecção de EPEC e EHEC seria realizada da seguinte forma:

- a amostra de fezes seria semeada em meio de cultivo indicado (LB ou 2YT) e cultivada por 16-18 h para o enriquecimento;
- posterioremente, 0,5 mL do cultivo seria permeabilizado com 4% de Triton-X-100 por 10 min; fixado com 1% de formaldeído por 20 min e incubado com 1% de glicina por 10 min;
- o preciptado seria ressuspendido com 30 µg/mL de scFv-intimina, seguido da incubação com o anticorpo monoclonal IgG anti-histidina diluído 1:2000.
- após, seria adicionado o soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceina (FITC) em uma diluição de 1:100.
- todas as etapas seriam realizadas por 1 h à temperatura ambiente, em um volume final de 0,3 mL, lavagens subsequentes em solução PBS/BSA (1%) por 5 min, sob agitação mínima e constante;
- a leitura da suspensão bacteriana seria realizada em microscópio de fluorescência (aumento de 1000 X).
- desta forma, a partir da coleta da amostra, o resultado estaria pronto após 20-22 h, aproximadamente.

Assim, o ensaio de imunofluorescência indireta padronizado mostrou-se eficaz e rápido, e o scFv-intimina é uma excelente ferramenta para o imunodiagnóstico de EPEC e EHEC.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho a partir de um gene sintético otimizado da sequência de fragmentos de anticorpos recombinantes anti-intimina, obteve-se um scFv-intimina, uma ferramenta para o diagnóstico rápido de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) por imunofluorescência indireta.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1994.

ABE, C. M. et al. Virulence feasures of atypical enteropathogenic Escherichia coli identified by the eae (+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.

ABRAHAM, S. R. et al. The human antibody repertoire: heavy and light chain variable region gene usage in six alloantibodies specific for human HLA class I and class II alloantigens. **Mol. Immunol.**, v. 32, n. 14-15, p. 1105-1122, 1995.

ADU-BOBIE, J. et al. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α and intimin β from enteropathogenic *Escherichia coli.* **Infect. Immun.**, v. 66, n. 12, p. 5643-5649, 1998.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia col* (EPEC) in Norwegian children with diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 11, p. 1015-1019, 2003.

AGBODAZE, D. Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by Escherichia coli: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, n. 4, p. 221-230, 1999.

AGIN, T. S.; WOLF, M. K. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 320-326, 1997.

AIDAR-UGRINOVICH**,** L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. Int. **J. Food. Microbiol.**, v. 115, p. 297-306, 2007.

ALZARI, P. M. ; LASCOMBE, M. B.; POLJAK, R. J. Three-dimensional structure of antibodies. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 555-580, 1988.

AMIT, R. et al. Acute, severe, central and peripheral nervous system combined demyelination. **Pediatr. Neurol.**, v. 2, p. 47–50, 1986.

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

ANDRADE, E. V. et al. Single-chain Fv with fragment oh the human iGg1 tag: construction, *Pichia pastoris,* expression and antigen binding characterization. **J. Biochem.**, v. 128, p. 891-895, 2000.

ANDRADE, E. V. et al. Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1726, n. 3, p. 293-301, 2005.

ANVIKAR A. R. et al. Role of *Escherichia coli* in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India. **Pediatr. Perinat. Epidemiol.**, v. 22, p. 40-46, 2008.

AOKI V. et al. Imunofluorescência direta e indireta. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Avaliação dos PCRs multiplex para diagnóstico de infecção por Escherichia coli diarreiogênicas e Shigella spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.

ARANDA, K. R. S. et. al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 267, n. 2, p.145-150, 2007.

ARAÚJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.

ARBABI-GHAHROUDI, M.; TANHA, J.; MACKENZIE, G. Prokaryotic expression of antibody. **Cancer and metastasis Rev.**, v. 24, p. 501-519, 2005.

BAKHSHI, B.; FALLAHZAD, S.; POURSHAFIE, M. R. The occurrence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains among children with diarrhea in Iran. **J. Infect. Chemother**. DOI 10.1007/s10156-012-0526-0, 2012.

BARBAS, C. F. et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 88, p. 7978-7982, 1991.

BATCH and spin cup methods for affinity purification of proteins. **Pierce Biotechnology**, Inc., 10/2002.

BATCHELOR, M. et al. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. **J. Clin. Microbiol.,** v. 37, n. 12, p. 3822-3827, 1999.

BATRA, S. K. et al. Expression of the human MUC1 mucin cDNA in a hamster pancreatic tumor cell line HP-1. **Int. J. Pancreatol.**, v. 12, n. 3, p. 271-283, 1992.

BEUTIN L. et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1099-1108, 2004.

BEUTIN, L. et al. Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 630-639, 2006.

BHASKARAN, S. et al. A single-chain fragment variable recombinant antibody against F5 fimbria of enterotoxigenic Escherichia coli inhibits agglutination of horse red blood cells induced by F5 protein. **Vet. Res. Commun.**, v. 29, n. 6, p. 463-476, 2005.

BLANCO, J. E. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 311-319, 2004.

BLANCO J. E. et al. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Int. Microbiol.**, v. 9, p. 103-110, 2006.

BRIGIDO, M. M. et al. Role of Mouse VHIO and VL Gene Segments in the Specific Binding of Antibody to Z-DNA, Analyzed with Recombinant Single Chain Fv Molecules. **J. Immunol.**, v. 150, n. 2, p. 469-479, 1993.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Tecnol. Ciência Desenvol.**, v. 26, p. 44-51, 2002.

BRINKMANN, U. et al. Stabilization of a recombinant Fv fragment by base-loop interconnection and V(H)-V(L) permutation. **J. Mol. Biol.**, v. 268, p. 107-117, 1997.

BRUNT, V. J. Amplifying genes: PCR and its alternatives. **Biotechnology (NY)**, v. 8, n. 4, p. 291-294, 1990.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador in Salvador – Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 6, p. 839-844, 2007.

BURGESS, R. R. Refolging solubilized inclusion body proteins. **Methods Enzimol.**, v. 463, p. 259-282, 2009.

BURTON, D. R. et al. Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA., v. 89, n. 21, p. 10164–10168, 1992.

BUTT, T. R. et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. **Protein Sci.**, v. 1, p. 182-189, 2005.

CAMPELLONE, K. G. et al. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Molec. Microbiol.**, v. 43, p. 1227-1241, 2002.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups – A **Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 545-552 B, 2004.

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

CARBAJAL, D.; MORANO, K. A.; MORANO, L. D. Indirect immunofluorescence microscopy for direct detection of *Xylella fastidiosa* in xylem sap. **Cur. Microbiol.**, v. 49, p. 372-375, 2004.

CARTER, P. et al. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. **Biotechnology (N.Y.)**, v. 10, n. 2, p. 163-167, 1992.

CERQUEIRA, A. M. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 70, p. 111-121, 1999.

CHESTER, K. A.; HAWKIN, R. E. Clinical issues in antibody design. **Trends Biotechnol.**, v. 13, n. 8, p. 294-300, 1995.

CHINA, B. et al. Heterogenicity of the eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with humans strains. **Research Microbiol.**, v. 150, p. 323-332, 1999.

CHINEN, I. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken burger, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 132, p. 167-171, 2009.

CHOI, G. H. et al. Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli.* **Protein Expr. Purif.**, v. 35, p. 84-92. 2004.

CHOUMET, V. et al. Biologically active human anti-crotoxin scFv isolated from a semi-synthetic phage library. **Immunotechnology.**, v. 3, n. 2, p. 117-125, 1997.

CHUNG, W. Y. et al. Phage-display derived single-chain fragment variable (scFv) antibodies recognizing conformational epitopes of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunit. **J. Immunol. Methods.**, v. 339, p. 115-123, 2008.

CLACKSON, T. et al. Making antibody fragments using phage display libraries. **Nature,** v. 352, p. 624-628, 1991.

CLARKE, S. C. et al. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 365-378, 2003.

CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 527-538, 2004.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Landes Bioscience**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

COCOLIN, L. et al. A multiplex-PCR method to detect enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 203, p. 159-164, 2000.

COONS, A. H. et al. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. **J. Immunol.**, v. 45, p. 159-170, 1942.

CUNHA, A. E. et al. Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in Pichia pastoris. **Biotechnol Bioeng.**, v. 86, n. 4, p. 458-67, 2004.

DANIELL, S. J. et al. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, n. 12, p. 865-871, 2001.

DE MOURA, C. et al. Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, n. 2, p. 176-180, 2012.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS (DATASUS). **Informações de saúde**. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Acesso em: 05. dez. 2012.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, n. 1, p. 28-34, 2005.

DUARTE, P. C. et al. Comparação de um soro indireta fluorescente anticorpo teste com dois testes de Western blot para o diagnóstico de mieloencefalite protozoária equina. **Vet. Diagn. J. Invest.**, v. 15, p. 8-13, 2003.

DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **J. Bacteriol.**, v. 7, p. 2597-2606, 2008.

ELGERT, K. D. **Immunology:** understanding the immune system. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.

ELLIOTT, S. J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Vet. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 196-206, 1995.

ELLIOTT, S. J. et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli.* **Infect. Immun.**, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.

ESCHERICH, T. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. **Fortshr. Med.**, v. 3, p. 515-522, 1885.

EVANS, D. J.; EVANS, D. G. Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. **Infect. Immun**., v. 8, p. 322-328, 1973.

FARAH, S. M. et al. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 607-612, 2007.

FENG, P.; MONDAY, S. R. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Mol. Cell. Probes.**, v. 14, p. 333-337, 2000.

FRANKE, J. et al. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2460-2463, 1994.

FRANKEL, G. et al. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1835-1842, 1994.

FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-363, 2005.

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

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. **Infect. Immun.,** v. 73, v. 5, p. 2573-2585, 2005.

GE Healthcare. **RECOMBINANT phage antibody system**, 2002.

GEORGE, A. J. Single-chain Fv radioimmunotargeting. **Q. J. Nucl. Med.**, v. 40, n. 3, p. 320-33, 1996.

GIRARD, F. et al. Interaction of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*and Porcine Intestinal Mucosa: Role of Intimin and Tir in Adherence. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 6005–6016, 2005.

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

GIVOL D. The minimal antigen-binding fragment of antibodies--Fv fragment. **Mol. Immunol.**, v. 28, p. 1379-1386, 1991.

GRIFFIN P. M.; TAUXE R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol. Rev.**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GLOCKSHUBER, R. et al. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. **Biochemistry**, v. 13, n. 6, p. 1362-1367, 1990.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby imunologia.** 4. ed. Rio de Janeiro. Revinter, 2002.

GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GOOSNEY, D. L. et al. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. **Current Biology**, v. 10, n. 12, p. 735-738, 2000.

GRUENHEID, S. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* tir binds nck to initiate actin pedestal formation in host cells. **Nature Cell Biol.**, v. 3, p.856-859, 2001.

GUTH, B. E. C. et al. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from a patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 535-536, 2002.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **J. Anim. Sci.**, v. 85, p. 45-62, 2007.

HAGEMEYER, C. E. et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. **Thromb. Haemost.***,* v. 101, p. 1012-1019, 2009.

HAYDEN, F. G. et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 13, p. 874–879, 1997.

HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, p. 1126-1136, 2005.

HUMPHRIES, R. M.; ARMSTRONG, G. D. Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli to the small intestine epithelium. **Future Microbiol.**, v.5, n.11, p.1645-1661, 2010.

HYLAND, R. M. et al. The bundling pilin of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. **Cell Microbiol.**, v.10, n.1, p.177-187, 2008.

HUSTON, J. S. et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of a specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli.* **Proc. Natl. Acad. Sci.** *USA*, v. 85, p. 5879-5883, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **População**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.php#populacao>. Acesso em: 25 nov. 2012.

IRINO, K. et al. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 446-447, 2002.

IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 29-36, 2005.

JAFARI, F. et al. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. **J. Infect.**, v. 58, p. 21-27, 2009.

JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells**. PNAS**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

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

JOHNSON, K. E.; THORPE, C. M.; SEARS, C. L. The emerging clinical importance de non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1587-1595, 2006.

KAPER J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. Pathogenic *Escherichia coli.* **Nature Reviews.**, v. 2, p. 123–140, 2004.

KAPER, J. B.; O´BRIEN, A. D. ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains**. Washington: ASM Press, 1998. 465 p.

KARCH, H.; MEYER, T. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli.* **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 1180-1186, 1989.

KARMALI, M. A. et al. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony is weeps and polymyxin extraction of verotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 614-619, 1985.

KARMALI, M. A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 15-37, 1989.

KETTLEBOROUGH, C. A. et al. Isolamento de tumor de células-specific single-chain Fv de ratinhos imunizados utilizando bibliotecas de anticorpos fago e a re-construção de anticorpos completos a partir destes fragmentos de anticorpo. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 4, p. 952-958, 1994.

KERSCHBAUMER, R. J. et al. Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Anal. Biochem.**, v. 249, n. 2, p. 219-227, 1997.

KENNY, B.; WARAWA, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1444-1453, 2001.

KIMATA, K. et al. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Microbiol. Immunol.**, v. 49, n. 6, p. 485-492, 2005.

KITAGAWA, Y. et al. ELISA indirecto e ensaio de anticorpo imunofluorescente indirecto para detectar o anticorpo contra a murinanorovirus S7 em ratos. **Anim. Exp.**, v. 59, p. 47-55, 2010.

KNUTTON, S. et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KNUTTON, S. et al. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 499-509, 1999.

KIPRIYANOV, S. M.; LE GALL, F. Generation and production of engineered antibodies. **Mol. Biotech.,** v. 26, p. 39-60, 2004.

KOGA, P. C. M. et al. Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC diagnosis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 5-7, 2003.

KOGA, P. C. M. **Identificação fenotípica de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) utilizando anticorpos anti-intimina**. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

KONOWALCHUK, J.; Speirs, J. I.; Stavric, S. Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 18, p. 775-779, 1977.

KÜHNE, S. A. et al. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2966-2976, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGERKVIST, A. C.; FUREBRING, C.; BORREBAECK, C. A. Single, antigen-specific B cells used to generate Fab fragments using CD40-mediated amplification or direct PCR cloning. **Biotechniques**, v. 18, n. 5, p. 862-869, 1995.

LANATA, C. F. et al. An intervention for the promotion of hygienic feces disposal behaviors in a shanty town of Lima, Peru. **Health Educ. Res.**, v. 17, n. 6, p. 761-773, 2002.

LARRICK, J. W. et al. Direct cDNA cloning of the rearranged immunoglobulin variable region. **Biotechniques**, v. 7, n. 4, p. 360-366, 1989.

LEONG, M. K.; CHEN, T. H. Prediction of cytochrome P450 2B6-substrate interactions using pharmacophore ensemble/support vector machine (PhE/SVM) approach. **Med. Chem.**, v. 4, n. 4, p. 396-406, 2008.

LEOMIL, L. et al. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 97, p. 103-109, 2003.

LEVINE, M. M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heatlabile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 27, n. 1, p. 1119-1122, 1978.

LEVINE, M. M. et al. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 550-559, 1985.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LEWIN, B. **Genes V.** 5th ed. Oxford: Oxford University Press and Cell Press, 1994. 1272 p.

LEWIN B. **Genes VI.** 6th ed. Oxford. Oxford University Press and Cell Press, 1997. 1260 p.

LORIMER, I. A. Imunotoxinas recombinantes específicas para um receptor do factor de crescimento epidérmico: mutante alvo com um único domínio variável de cadeia de anticorpo isolado por exibição por fagos. **Proc. Natl. Acad. Sci. EUA**, v. 93, n. 25, p. 14815-14820, 1996.

LUO, Y. et al. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1073-1077, 2000.

MA, Y. et al. Engineering an anti-Stx2 antibody to control severe infections of EHEC O157:H7. **Immunol. Lett.**, v. 121, p. 110-115, 2008.

MAHGOUB, I. O. Expression and characterization of a functional single-chain variable fragment (scFv) protein recognizing MCF7 breast cancer cells in *E. coli* cytoplasm. **Biochem. Genet.**, v. 50, p. 625-641, 2012.

MAK, T. W.; SAUDERS, M. E. **Primer to the immune response.** China: Elsevier, 2008.

MAKINO, T.; SKRETAS, G.; GEORGIOU, G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. **Microb. Cell. Fact.**, v. 14, p. 10-32, 2011.

MALMBORG, A. C.; BORREBAECK, C. A. BIAcore as a tool in antibody engineering. **J. Immunol. Methods.**, v. 183, p. 7-13, 1995.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Anticorpos humanizados. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 38-43, 2000.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Anticorpos humanizados – humanização de anticorpos de interesse clínico. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 38-43, 2001.

MARKS, J. D. et al. By-passing immunization. Human antibodies from v-gene libraries displayed on phage. **J. Mol. Biol.**, v. 222, p. 581-597, 1991.

MARKS, J. D. et al. Molecular evolution of proteins on filamentous pahge. Mimicking the strategy of the immune system. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 16007-16010, 1992.

McCAFFERTY, J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, p. 552-554, 1990.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **PNAS**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

MELLIES, J. L. et al. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Molec. Microbiol.**, v. 32, p. 296-306, 1999.

MENDES-LEDESMA, M. R. et al. Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx1 and Stx2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli.* **Microbiol. Immunol.**, v. 52, p. 484-491, 2008.

MENEZES, C. A. **Anticorpos monoclonais para detecção de amostras de *Escherichia coli* produtoras de ST–I e LT–I.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MENEZES, C. A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 11-13, 2003.

MENEZES, C. A. et al. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli.* **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, p. 875-880, 2006.

MENEZES, M. A. et al. Identification of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, n. 3, p. 878-887, 2010.

MENEZES, M. A. et al. Cloning approach and functional analysis of anti-intimin single-chain variable fragment (scFv). **BMC Research Notes.**, v. 4, n. 30, p. 1-9, 2011.

MILENIC, D. E. et al. Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6363-6371, 1991.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J Mol Biol.**, v. 3, p. 289-298, 1996.

MOON, H. W. et al. *Attaching* and *effacing* activities of rabbit and human nteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340-1351, 1983.

MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

MOYES, A. et al. A avaliação preliminar de "Chlamydia Clearview" para a detecção rápida de antígeno por clamídia em secreções cervicais. **Genitourin Med.**, v. 67, n. 2, p. 120-123, 2009.

MÜLLER, P. J.; IVANOVA, I. I.; BERGTER, F. Bistability in the activity of glutamine synthetase in ammonium-limiting chemostat cultures of Escherichia coli ML 30. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v. 17, n 3, p. 221-5, 2006.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology**. EUA, Garland Science, v. 7, p 887, 2008.

NARA, J. M. et al. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of *bundle-forming pilus* expression. **J. of App. Microbiol.**, v. 109, p. 35-43, 2010.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 142-201, 1998.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NETER, E. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801-808, 1955.

NGUYEN, R. N. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n. 4, p. 597-603, 2006.

NOVAGEN. **pET system manual**. 10th ed. 2003.

NUNES, M. R. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 1, p. 43-47, 2012.

OCHOA, T. J. et al. New insights into the epidemiology of *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 852-856, 2008.

OGURA, Y. et al. TccP2 of O157:H7 and Non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Challenging the Dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 604–612, 2007.

OLIVEIRA, T. C. R.; LATORRE, M. R. D. O. Tendências da internação e da mortalidade infantil por diarreia: Brasil, 1995 a 2005. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, p. 102-111, 2010.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.

OZAKI, C. Y. **Clonagem e expressão de um fragmento variável em cadeia única contra a toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

OSWALD, E. et al. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 1, p. 64-71, 2000.

OSEK, J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. **J. Appl. Microbiol.***,* v. 95, p. 1217-1225, 2003.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing E*scherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 11, p. 450-479, 1998.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex pcr for stx1, stx2, eae, ehxa, and saa. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 271-274, 2002.

PASS, M. A.; ODEDRA, R.; BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2001-2004, 2000.

PERSSON, S. et al. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, p. 516-524, 2007.

PORTES JUNIOR, J. A. **Detecção da proteína plp2 em glioblastomas.** 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

QADRI, F. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

RAJAWAT, R. et al. A single-chain antibody fragment against human thyroglobulin: construction and evaluation of immunoreactivity. **Hybridoma**, v. 30, n. 3, p. 253-259, 2011.

RAMACHANDRAN, V. et al. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5022-5032, 2003.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

RAPPELLI, P. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive *Escherichia coli.* **New Microbiol.**, v. 24, p. 77-83, 2001.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, v. 48, n. 2, p. 161-167, 2004.

REID, S. D.; BETTING, D. J.; WHITTAM, T. S. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2719-2722, 1999.

RENDÓN, M. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **PNAS**, v. 104, n. 25, p. 10637-10642, 2007.

RICH, C. et al. Identification of human enterovirulent *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **J. Clin. Lab. Anal.**,v. 15, p. 100-103, 2001.

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

RODRIGUES, M. L. et al. Engineering a humanized bispecific F(ab')2 fragment for improved binding to T cells. **Int. J. Cancer Suppl.**, v. 7, p. 45-50, 1992.

ROCHA, L. B. et al. Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: binding characteristics and in vitro neutralizing abilities. **Toxins**, v. 4, n. 9, p. 729-747, 2012.

ROITT, I. M. **Imunologia.** 4. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 299 p.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology.** 6th ed. Londres: Mosby, 2001. 480 p.

ROSA, A. C. et al. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 781–790, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ-SANMARTIN, C. et al. Transcriptional Regulation of the *orf19* Gene and the *tir-cesT-eae* Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli.* **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 9, p. 2823–2833, 2001.

SCALETSKY, I. C. A. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 7, p. 3410-3415, 1999.

SEARS, H. J.; BROWNLEE, I.; UCHIYAMA, J. K. Persistence of individual strains of Escherichia coli in the intestinal tract of man. **J. Bacteriol.,** v. 59, n. 2, p. 293-301, 1950.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, v. 60, n. 1, p. 167-215, 1996.

SCHAER, R. et al. **Imunofluorescência.** Trabalho realizado no laboratório de imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, 2010.

SMITH, H. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 45–49, 1996.

STRYER, L. **Biochemistry.** New York. W. H. Vfreeman and company, 1988. 881 p.

SVENNERHOLM, A. M. et al. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stabile toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-Enzime-linked immunosorbent assay. **J.Clin. Microbiol.**, v. 2, p. 585-590, 1986.

TABNET.DATASUS. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em: 27 nov. 2012.

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

TOLEDO, M. R. F. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 586-589, 1983.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 73, p. 18–29, 2005.

TRABULSI, L. R. et al. Infantile diarrhea caused by enteropathogenic colibacilli: preliminary studies on the occurrence of certain groups and serological types in Sao Paulo. **Inst. Méd. Trop.**, v. 3, p. 267-270, 1961.

TRABULSI, L. R. et al. **Epidemiology of infantile bacterial diarrheal disease in Brazil**. Scientific Publishers, 1985.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infec. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTETHUM, F. **Microbiologia** 4. ed. rev. atual. São Paulo: Atheneu, 2005.

TURNER, S. M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenis *Escherichia coli.* **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10-20, 1997.

UMETSU, M. et al. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single chain fv fragment. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 8979-8987, 2003.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Pneumonia and diarrhoea:** tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. New York: UNICEF, 2012. 77 p. Disponivel em: <http://www.unicef.org/media/files/unicef_p_d_complete_0604.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2012.

VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 8799-8806, 2000.

VAZ, N. M.; FARIA, A. M. C. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. **Immunology**, v. 78, p. 147-151, 1993.

VAZ, T. M. et al. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 903-905, 2004.

VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, E. J. Antibody engeneering: comparision of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **J. Immunol. Methods**, v. 216, n. 1-2, p. 165-181, 1998.

VILHENA-COSTA, A. B. et al. Slot blot immunoassay as a tool for plasmid-encoded toxin detection in enteroaggregative *Escherichia coli* culture supernatants. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, n. 2, p. 101-106, 2006.

ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Can. J. Microbiol**., v. 38, n. 7, p. 699-704, 1992.

WEISSER, N. E.; HALL, J. C. Aplications of single-chain variable fragment antibody in therapeutics and diagnostic. **Biotchnol. Adv.**, v. 27, p. 502-520, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Manual for laboratory investigations of acute enteric infections.** 1987.

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

WORLD HEALTH STATISTICS (WHS). New York: WHO Press, 2011. p. 75. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2011_Full.pdf> . Acesso em: 02 dez. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Children: reducing mortality. **Fact Sheet**, n. 178, Jun. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/index.html>. Acesso em 05 dez. 2012.

ZAHA, A. et al. **Biologia molecular básica.** Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336 p.

ZHANG, W. L. et al. Genetic diversity of intimim genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 12, p. 4486-4492, 2002.

ZUO, X. et al. Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli.* **J. Struct. Funct. Genomics**, v. 6, p. 103-111, 2005.

ANEXOS

ANEXO A – Isolados bacterianos

Quadro A.1 - Isolados bacterianos utilizados no presente estudo.

(continua)

CATEGORIA	CÓDIGO DE ORIGEM	SOROTIPO	PRESENÇA DO GENE eae
aEPEC	BA 86	O76:H19	+
aEPEC	BA 92	O2:H16	+
aEPEC	BA 151	ONT:H9	+
aEPEC	BA 179	O23:H16	+
aEPEC	BA 320	O55:H7	+
aEPEC	BA 356	O33:H7	+
aEPEC	BA 365	ONT:H19	+
aEPEC	BA 442	O35:H19	+
aEPEC	BA 462	O51:H40	+
aEPEC	BA 487	O55:H7	+
aEPEC	BA 558	O111:H40	+
aEPEC	BA 580	O119:H2	+
aEPEC	BA 585	O157:H16	+
aEPEC	BA 589	O5:H2	+
aEPEC	BA 655	O88:H25	+
aEPEC	BA 714	O111:H-	+
aEPEC	BA 852	O88:H25	+
aEPEC	BA 956	O111:H15	+
aEPEC	BA 1244	O55:H7	+
aEPEC	BA 1250	ONT:H6	+
aEPEC	BA 1324	O34:H45	+
aEPEC	BA 1444	O115:H8	+
aEPEC	BA 1649	O111:H38	+
aEPEC	BA 1652	O131:H4	+
aEPEC	BA 1738	O80:H26	+
aEPEC	BA 1768	O51:H40	+
aEPEC	BA 1887	O111:H38	+
aEPEC	BA 2034	ONT:H10	+
aEPEC	BA 2062	O171:H48	+
aEPEC	BA 2065	ONT:H5	+
aEPEC	BA 2073	ONT:H5	+
aEPEC	BA 2103	O26:H11	+
aEPEC	BA 2117	ONT:H5	+
aEPEC	BA 2145	O105:H7	+
aEPEC	BA 2294	O9:H33	+
aEPEC	BA 2297	O153:H11	+
aEPEC	BA 2459	O26:H11	+

(continua)

CATEGORIA	ISOLADO	SOROTIPO	PRESENÇA DO GENE eae
aEPEC	BA 2468	ONT:H19	+
aEPEC	BA 2482	O119:H11	+
aEPEC	BA 2613	O101:H33	+
aEPEC	BA 2775	O113:H19	+
aEPEC	BA 2853	ONT:H10	+
aEPEC	BA 2923	O34:H6	+
aEPEC	BA 2964	O51:H40	+
aEPEC	BA 2975	O88:H25	+
aEPEC	BA 2991	O34:H-	+
aEPEC	BA 3148	O35:H19	+
aEPEC	BA 3157	O119:H2	+
aEPEC	BA 3160	O110:H-	+
aEPEC	BA 3170	O145:H2	+
aEPEC	BA 3378	O104:H2	+
aEPEC	BA 3392	O124:H11	+
aEPEC	BA 3443	O88:H25	+
aEPEC	BA 3574	ONT:H38	+
aEPEC	BA 3690	O111:H38	+
aEPEC	BA 3733	O119:H19	+
aEPEC	BA 3800	ONT:H19	+
aEPEC	BA 3836	ONT:H19	+
aEPEC	BA 3851	ONT:H38	+
aEPEC	BA 3977	ONT:H45	+
aEPEC	BA 4009	O114:H25	+
aEPEC	BA 4013	O88:H-	+
aEPEC	BA 4047	O1:H16	+
aEPEC	BA 4058	O20:H-	+
aEPEC	BA 4077	O64:H23	+
aEPEC	BA 4095	O4:H45	+
aEPEC	BA 4132	O51:H48	+
aEPEC	BA 4135	O108:H25	+
aEPEC	BA 4147	O55:H7	+
aEPEC	BA 4157	ONT:H25	+
aEPEC	BA 4182	O125:H56	+
aEPEC	BA 4192	O111:H25	+
tEPEC	E2348/69	O127:H6	+
tEPEC	C54-58	O55:H6	+
tEPEC	F196-51	O55:H6	+
tEPEC	9-83	O55:H6	+
tEPEC	18-83	O55:H6	+

(continua)

CATEGORIA	ISOLADO	SOROTIPO	PRESENÇA DO GENE eae
tEPEC	59-4HC	O55:H6	+
tEPEC	160	O86:H34	+
tEPEC	736	O86:H34	+
tEPEC	C787/90	O86:H34	+
tEPEC	C1197/85	O86:H34	+
tEPEC	C1207/86	O86:H34	+
tEPEC	EPM-3821-1	O111:H2	+
tEPEC	C194-65	O111:H8	+
tEPEC	CDC-2309	O111:H2	+
tEPEC	9557	O111:H2	+
tEPEC	142	O111:H2	+
tEPEC	EC 16/97	O114:H2	+
tEPEC	EC 17/97	O114:H2	+
tEPEC	38	O119:H6	+
tEPEC	58/82	O119:H6	+
tEPEC	5	O119:H6	+
tEPEC	37	O119:H6	+
tEPEC	-	O119:H6	+
tEPEC	112	O127:H6	+
tEPEC	37	O127:H6	+
tEPEC	45	O127:H6	+
tEPEC	28	O129ab:H6	+
tEPEC	56	O142:H6	+
tEPEC	115	O142:H6	+
tEPEC	297	O142:H6	+
tEPEC	573	O142:H6	+
tEPEC	604	O142:H6	+
tEPEC	14	O142:H34	+
tEPEC	105	O142:H34	+
tEPEC	124	O142:H34	+
tEPEC	174	O127:H40	+
tEPEC	280	O127:H40	+
tEPEC	262	O127:H40	+
EHEC	82-LDC	O157:H7	+
EHEC	82-LCDC	O157:H7	+
EHEC	C 1520-77	O103:H2	+
EHEC	C 374-83	O118:H16	+
EHEC	EPM 20	O111:H8	+
EHEC	EPM 23	O111:H8	+
EHEC	EPM 26	O111:NM	+
EHEC	EPM 27	O111:NM	+

(continua)

CATEGORIA	ISOLADO	SOROTIPO	PRESENÇA DO GENE eae
EHEC	BA 1(53)	O157:H7	+
EHEC	BA 57B	O26:H11	+
EHEC	BA 59	O26:H11	+
EHEC	BA 60	O26:H11	+
EHEC	BA 64	O26:H11	+
EHEC	BA 67	O26:H11	+
EHEC	4(82)	O157:H7	+
EHEC	EPM 94	O157:H7	+
EHEC	EPM 11	O118:H6	+
EHEC	3299-85	O157:H7	+
EHEC	46240	O157:H7	+
EHEC	3104-88	O157:H7	+
EHEC	3077-88	O157:H7	+
EHEC	C7-88	O157:H7	+
EHEC	EPM 1	O157:H7	+
ETEC	H10407	O78:H11	-
ETEC	4702-1	OR:HNT	-
ETEC	40T	OR:H-	-
ETEC	2335	OR:H16	-
ETEC	4011-1	O153:H45	-
ETEC	3891-1	O153:H45	-
ETEC	75525-1	OR:H7	-
ETEC	4	OR:H16	-
ETEC	5	O6:H16	-
ETEC	155A1	O6:H16	-
ETEC	156A1	ONT:H34	-
STEC	EDL933	O157:H7	-
STEC	EPM 2	O157:H7	-
STEC	EPM 9	O103:H2	-
STEC	EPM 16	O26:H11	-
STEC	EPM 20	O111:H8	-
DAEC	BA 5	NT	-
DAEC	BA 20	NT	-
DAEC	BA 29	NT	-
DAEC	BA 32	NT	-
DAEC	BA 45	NT	-
DAEC	BA 48	NT	-
DAEC	BA 55	NT	-
DAEC	BA 66	NT	-
DAEC	BA 74	NT	-
DAEC	BA 78	NT	-

(conclusão)

CATEGORIA	ISOLADO	SOROTIPO	PRESENÇA DO GENE eae
EIEC	38	O164:H-	-
EIEC	25	O143:H-	-
EIEC	45	O143:H-	-
EIEC	24	O143:H-	-
EIEC	14	O124:H30	-
EIEC	19	O136:H-	-
EIEC	48	O167:H-	-
EIEC	26	O144:H-	-
EIEC	6	O29:H-	-
EIEC	7	O29:H-	-
EAEC	BA 144	O175	-
EAEC	BA 120	ONT	-
EAEC	BA 249	O65	-
EAEC	BA 328	O65	-
EAEC	BA 396	ONT	-
EAEC	BA 613	O154	-
EAEC	BA 732	O17	-
EAEC	BA 810	O78	-
EAEC	BA 1024	O44	-
EAEC	BA 1638	ONT	-
E. coli S.F.V.	BA 1	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 3	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 18	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 24	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 34	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 48	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 76	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 81	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 115	NT	-
E. coli S.F.V.	BA 121	NT	-
Citrobacter freundii	21	-	-
Morganella morganii	85	-	-
Providencia spp.	91	-	-
Shigella boydii	1	-	-
Shigella flexneri	-	-	-
Proteus mirabilis	-	-	-
Klebsiella pneumoniae	-	-	-
Enterobacter cloacae		-	-
Serratia marcescens	-	-	-
Salmonella flexneri	45	-	-

Nota: aEPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica atípica)
tEPEC (*Escherichia coli* enteropatogênica típica)
EHEC (*Escherichia coli* enterohemorrágica)
ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica)
EAEC (*Escherichia coli* enteroagragativa)
EIEC (*Escherichia coli* enteroinvasora)
DAEC (*Escherichia coli* de adesão difusa)
STEC (*Escherichia coli* produtora da toxina de shiga)
E. coli S.F.V. (*Escherichia coli* sem fator de virulência para DEC)

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo de periódico

Artigo 1 - ROCHA, L.B.; LUZ, D.E.; MORAES, C.T.P.; CARAVELLI, A.; FERNANDES, I., GUTH, B.E.C.; HORTON, D.S.P.Q.; AND PIAZZA, R.M.F. Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: binding characteristics and in vitro neutralizing abilities. Toxins, v. 4, n. 9, p. 729-747, 2012. doi:10.3390/toxins4090729.

APÊNDICE B – Artigos no prelo

1. CARAVELLI, A.; LUZ, E.L.; ANDRADE F.B.; MARANHÃO, A.Q. AND PIAZZA, R.M.F. Immunofluorescence assay using anti-intimin recombinant antibody a rapid and reliable diagnostic of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in developing world.

2. SOUZA, C.S.S.; LUZ D.E.; ELIAS W.P.; PIAZZA R.M.F. Cloning expression and characterization of protein ecs1997 and investigaton of prevalence of the gene ecs1997 in pathogenic enterobacteria and no pathogenic bacterias.