

CAIO RAONY FARINA SILVEIRA

**Uma nova ferramenta para o diagnóstico de *Escherichia coli*
enterotoxigênica: obtenção de anticorpos recombinantes
contra a toxina termoestável**

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

CAIO RAONY FARINA SILVEIRA

**Uma nova ferramenta para o diagnóstico de *Escherichia coli*
enterotoxigênica: obtenção de anticorpos recombinantes
contra a toxina termoestável**

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

Silveira, Caio Raony Farina.

Uma nova ferramenta para o diagnóstico de *Escherichia coli* enterotoxigênica: obtenção de anticorpos recombinantes contra a toxina termoestável / Caio Raony Farina Silveira. – 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: Produção de anticorpos.

Versão do título para o inglês: A new tool of enterotoxigenic *Escherichia coli* diagnosis: recombinant antibodies against heat-stable toxin.

1. *Escherichia coli* 2. ETEC 3. Toxina termoestável 4. scFv
5. Clonagem 6. Expressão 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/SBIB0168/2013

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

Candidato(a): Caio Raony Farina Silveira.

Título da Dissertação: Uma nova ferramenta para o diagnóstico de *Escherichia coli* enterotoxigênica: obtenção de anticorpos recombinantes contra a toxina termoestável.

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:



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-898/12

Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
Laboratório de Bacteriologia
Instituto Butantan

Referente Projeto: "Obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais recombinantes (scFv) contra a toxina termo-estável (ST) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)".

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

“As minhas sobrinhas Lara e Yasmin que fazem a vida parecer mais fácil mesmo com todas as adversidades.

Aos meus pais que permitiram que eu chegasse tão longe e se orgulham de mim e a toda minha família.”

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Patrícia, Fernanda e toda a minha família, que me dão suporte e me apoiam nos meus projetos.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza por me acolher em seu laboratório, confiar no meu trabalho, pelo apoio, pelos ensinamentos e persistência.

À Mestre Christiane Ozaki pela obtenção da sequência do gene sintético que foi fundamental para elaboração deste trabalho.

À Dra. Patrícia Abreu pela disponibilidade ao discutir os resultados e pelos direcionamentos na área de Biologia Molecular.

À Doutoranda Daniela Luz e Danielle Munhoz pela amizade e cooperação, além de toda colaboração neste trabalho.

À Gaby, Cynthia e Keyde pelas longas conversas e apoio que tornaram mais fácil estes 2 anos.

Aos amigos e colegas: Andressa Caravelli, Anna Raquel dos Santos, Letícia Rocha, Cristiane Souza, Natália Freitas, Bruno e Roberto. Pelo coleguismo, incentivo, momentos de descontração e por toda ajuda.

A todos os pesquisadores e técnicos do laboratório de Bacteriologia pelos serviços prestados e ensinamentos.

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

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, Dra. Irene Fernandes, Dra. Eliana Faquim, Dr. Geraldo Magalhães (obrigado pelas sugestões), Júnior, Cris, Tamires, Bruna, Sandriana e Pri.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

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

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, sob orientação da Dra. Roxane MF Piazza com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/14659-6, 2011/12928-2).

“Se você pode sonhar, você pode fazer”

Walt Disney

RESUMO

SILVEIRA, C. R. F. **Uma nova ferramenta para o diagnóstico de *Escherichia coli* enterotoxigênica: obtenção de anticorpos recombinantes contra a toxina termoestável.** 2013, 70f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Anticorpos recombinantes vêm sendo utilizados como ferramenta diagnóstica por serem produzidos com baixo custo e em larga escala. Partiu-se de um gene sintético que codifica um fragmento de anticorpo (scFv) específico contra a toxina termoestável, com otimização de códons para expressão em *Escherichia coli*. Esse gene foi amplificado no vetor de clonagem e subclonado em vetor de expressão pET28a. Células *E. coli* BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo recombinante e induzidas em meio de expressão. O fragmento de anticorpo obtido estava contido na fração insolúvel, portanto foi submetido a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel na presença de ureia, seguido de renaturação. A molécula se apresentou funcional e sem reatividade com inespecífica por ensaios de imunofluorescência e ELISA. Além disso, mostrou-se estável quando armazenada a 4°C, sendo assim uma ferramenta promissora para ser utilizada no diagnóstico de ETEC para detecção da toxina ST.

Palavras-chave: ETEC. ST. scFv. Clonagem. Expressão. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

SILVEIRA, C. R. F. **A new tool of enterotoxigenic *Escherichia coli* diagnosis: recombinant antibodies against heat-stable toxin.** 2013. 70f. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Recombinant antibodies have been used as diagnostic tools since they can be produced at low cost and on a large scale. A synthetic gene encoding an antibody fragment (scFv) specific for the heat-stable toxin (ST) with optimized codon for *Escherichia coli* expression was employed. This gene was amplified in the cloning vector and subcloned into pET28a expression vector. *E. coli* BL21(DE3) cells were transformed with the recombinant plasmid and induced. Large amounts of antibody fragment were found in the insoluble fraction. Thus it is submitted to nickel-affinity chromatography in urea presence, followed by refolding step. By immunofluorescence assay and ELISA, the obtained antibody showed to be functional with no cross-reaction to the negative controls. Furthermore, it was stable when stored at 4 °C, therefore a promising tool for ETEC diagnosis detecting the ST toxin.

.

Keywords: ETEC. ST. scFv. Cloning. Expression. *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquemas representativos de DEC e seus principais fatores de virulência.....	23
Figura 2 – Estrutura do domínio tóxico (resíduos 6 a 18) da STp.....	26
Figura 3 - Mecanismo de ação da toxina ST-I de ETEC.....	27
Figura 4 – Ilustração de uma molécula de IgG e seu derivado, scFv.....	30
Figura 5 – Mapa do vetor pMA contendo o fragmento do gene correspondente ao scFv-ST.....	32
Figura 6 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS de baixo peso molecular.....	46
Figura 7 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 do produto de PCR....	47
Figura 8 – Perfil de eletroforese em gel de agarose 0,8% para dosar a concentração de inserto (scFvST) purificado após a digestão do plasmídeo pGEM-scFvST.....	48
Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% de vetores purificados após a digestão com as enzimas BamHI e XhoI.....	49
Figura 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da análise de restrição do vetor pET-scFvST.....	50
Figura 11 - Representação esquemática do scFvST.....	51
Figura 12 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> do ensaio de indução de células <i>E.coli</i> BL21(DE3) transformada com o clone 1 e 2 de pET-scFvST em meio 2YT...	52
Figura 13 – Membrana de nitrocelulose contendo as frações proteicas bacterianas. <i>Immunoblotting</i> com anticorpo anti-His do ensaio de indução de células <i>E.coli</i> BL21(DE3) transformada com o clone 1 e 2 de pET-scFvST em meio 2YT.....	53
Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> das amostras coletadas no AKTA do experimento de cromatografia do scFvST.....	55
Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com <i>Coomassie Blue R-250</i> das amostras coletadas no AKTA do experimento de cromatografia do scFvST pós-renaturação.....	56
Figura 16 - Reatividade do scFvST pelo ensaio de imunofluorescência.	

Isolados de 3321-4 (ETEC) e E2348/68 permeabilizados e incubados com scFv, anticorpo anti-His e anticorpo conjugado a FITC..... 57

Figura 17 - Membrana de nitrocelulose contendo lisado de 3321-4 tratado. *Immunoblotting* com scFvST, anticorpo anti-His, e anti-IgG peroxidase..... 61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil cromatográfico da purificação do scFvST em coluna de Níquel-Sepharose em AKTA Prime Plus.....	54
Gráfico 2 - Reatividade do scFv anti-ST a toxina ST.....	58
Gráfico 3 - Reatividade do scFv anti-ST na concentração de 2,5 µg/mL a toxina ST de diversos isolados de ETEC.....	59
Gráfico 4 - Reatividade do scFv anti-ST na concentração de 5 µg/mL a toxina ST de diversos isolados de ETEC.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sequência de nucleotídeos do gene sintético scFvST inserido no plasmídeo pMA.....	33
Quadro 2 – Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação do gene correspondente ao scFvST.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2YT - Meio Bacto-triptona

A/E - *Attaching and effacement*

AMP - adenosina 3',5'-monofosfato

ARFs - *ADP-ribosylation factors*

BCA - *Bicinchoninic Acid*

BFP - *Bundle-forming pilus*

blastp - *Basic Local Alignment Tool protein*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

cDNA - DNA complementar

CDRs - Regiões determinantes de complementariedade

CFA - Ácido casamínico e extrato de levedura com ágar

DAB - Diaminobenzidina

DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente

DEC - *Escherichia coli* diarreiogênica

DNA - ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

EAST - *Enteroggregative E. coli ST*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora

ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPasy - *Expert Protein Analysis System*

ExPEC - *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal

FITC - isotiocianato de fluoresceína

FPLC - *Fast protein liquid chromatography*

HC - colite hemorrágica

HGPRT - hipoxantinaguanina-fosforribosil-transferase

Ig - Imunoglobulina

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

LB - Lúria Bertani

LT - Termolábil

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

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pEAF - plasmídeo EPEC *adherence factor*

PEG - Polietilenoglicol

pET - *plamid-encoded toxin*

RIA - *Radioimmunoassay*

scFv - *single chain fragment variable*

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

SHU - Síndrome hemolítico-urêmica

ST - Termoestável

STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

Stx1 - Toxina de Shiga 1

TAE - Tampão *Tris-Acetate*

TTP - trombocitopênica trombótica

V_H - cadeia variável pesada

V_L - cadeia variável leve

WHO - *World Health Organization*

X-Gal - *5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Escherichia coli.....	20
1.2 E.coli diarreiogências (DEC).....	20
1.3 E. coli enterotoxigênica (ETEC).....	23
1.4 Enterotoxina termolábil (LT).....	25
1.5 Enterotoxina termoestável (ST).....	25
1.6 Diagnóstico de ETEC.....	27
1.7 Anticorpos monoclonais.....	28
1.8 Anticorpos recombinantes.....	29
2 OBJETIVO.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Obtenção da toxina ST.....	35
3.2 Clonagem do gene correspondente ao fragmento variável do anticorpo (scFv) anti-ST.....	35
3.2.1 Amplificação do gene sintético scFvST.....	35
3.2.2 Eletroforese em gel de agarose.....	36
3.2.3 Adição de adenina terminal ao gene scFvST.....	37
3.2.4 Clonagem do gene scFvST no vetor pGEM-T.....	37
3.2.5 Transformação bacteriana por choque térmico.....	37
3.2.6 Extração plasmideal.....	38
3.2.7 Digestão do vetor de expressão pET28a e dos clones de pGEM-scFvST.....	39
3.2.8 Clonagem do fragmento de scFvST no vetor de expressão pET28a.....	39
3.2.9 Análise de restrição dos clones de pET-scFvST.....	40
3.2.10 Sequenciamento e análise de DNA.....	40
3.2.11 Modelagem molecular do scFvST.....	40

3.3 Expressão do scFvST.....	41
3.3.1 Padronização do meio de cultivo para expressão do fragmento scFvST.....	41
3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
3.3.3 Western-blot.....	42
3.3.4 Immunoblotting.....	42
3.4 Purificação do scFvST.....	43
3.4.1 Purificação do scFvST por cromatografia de afinidade a Níquel em FPLC.....	43
3.4.2 Renaturação do anticorpo recombinante scFvST.....	43
3.5 Ensaio Funcionais do scFv.....	44
3.5.1 Imunofluorescência.....	44
3.5.2 Padronização do teste ELISA utilizando os fragmentos de anticorpos scFvST.....	44
3.5.3 ELISA dos isolados de ETEC produtores de ST.....	45
3.5.4 Western-blot e Immunoblotting.....	45
4 RESULTADOS.....	46
4.1 Obtenção da toxina ST.....	46
4.2 Clonagem do fragmento variável do anticorpo (scFv) anti-ST.....	46
4.3 Expressão do scFvST em pET28a.....	51
4.3.1 Purificação do scFvST por cromatografia de afinidade a Níquel em FPLC.....	53
4.3.2 Renaturação do anticorpo recombinante scFvST.....	55
4.4 Ensaio Funcionais do scFv.....	56
4.4.1 Imunofluorescência.....	56
4.4.2 Padronização do teste ELISA utilizando os fragmentos de anticorpos scFvST.....	57
4.4.3 ELISA dos isolados de ETEC produtores de ST.....	58
4.4.4 Immunoblotting.....	60

5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, como todo membro da família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo, oxidase negativa, predominante na microbiota intestinal humana e de inúmeras espécies animais. Segundo Krieg e Holt (1984), a *E. coli* fermenta glicose através de fermentação ácido mista, produzindo ácido láctico, acético e fórmico.

Capaz de desempenhar um papel importante na manutenção da fisiologia intestinal (EDWARDS, 1986), suprimindo o crescimento de bactérias nocivas e sintetizando quantidades apreciáveis de vitaminas. *E. coli* geralmente permanece “sem causar danos” confinada à luz intestinal, entretanto, em hospedeiros debilitados ou imunodeprimidos, ou quando barreiras intestinais são violadas, cepas não patogênicas de *E. coli* podem causar infecção (NATARO; KAPER, 1998).

Devido a grande capacidade de adaptação, determinadas linhagens de *E. coli* adquiriram propriedades específicas de virulência, causando um amplo espectro de doenças (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Estes fatores de virulência podem causar infecções intestinais, infecções urinárias, septicemias, meningites e outros tipos de infecções.

As amostras de *E. coli* associadas à infecções extraintestinais são chamadas de ExPEC. Outros patótipos relacionados à gastroenterite são conhecidos como *E. coli* diarreio gênicas (DEC). Greig e Ravel (2009) analisaram 4.093 surtos de infecções de origem alimentar entre os anos de 1995 e 2005 e encontraram *E. coli* sendo incriminada em 9,5% dos casos, sendo a terceira maior causa de infecção, perdendo apenas para *Salmonella spp* e *Norovírus*.

1.2 *E. coli* diarreio gênicas (DEC)

As amostras de *E. coli* diarreio gênicas estão classificadas em seis categorias baseadas nos mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro* (NATARO; KAPER, 1998).

Existem mais de 170 diferentes sorogrupos identificados de *E. coli*, e há uma certa correlação entre sorogrupo e virulência. A classificação através do sistema de virulência é baseada em características como: forma de adesão da bactéria às células do hospedeiro, efeitos da adesão às células do hospedeiro, produção de toxinas e grau de invasão. Segundo Torres, Zhou e Kaper (2005), os fatores de adesão das cepas patogênicas de *E. coli* são estruturas proteicas associadas à superfície da membrana bacteriana e podem ser divididos em adesinas fimbriais e não fimbrias.

Meng, Feng e Doyle (2001) alertam que a classificação dos grupos de *E. coli* leva em consideração os dois sistemas (sorogrupo e virulência), porém nem sempre há como classificar uma cepa apenas baseado nessas diferenças, pois a capacidade patogênica da bactéria pode ser transmitida geneticamente entre as cepas através de plasmídeos, fagos e ilhas cromossômicas de patogenicidade.

As seis categorias de *E. coli* diarreiogênicas descritas são: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que apresenta padrão de adesão difusa a células epiteliais (DAEC) (KAPER *et al.*, 2004).

EPEC é a principal causadora de diarreia infantil em muitos países em desenvolvimento (TRABULSI; FERNANDES; ZULIANI, 1967). As estirpes de EPEC não produzem toxinas, entretanto aderem à mucosa do intestino delgado e causam uma lesão histopatológica caracterizada por um rearranjo de actina nas células do hospedeiro bem como *in vitro* denominada de lesão *attaching and effacing* (A/E). As EPEC podem ser divididas em dois subgrupos, o das EPEC típicas e das atípicas. As EPEC típicas são caracterizadas pela presença do plasmídeo pEAF (*E. coli Adherence Factor*) onde está presente o operon *bfp*, que codifica uma fímbria do tipo IV denominada BFP (*bundle forming pilus*). Nas EPEC atípicas este plasmídeo encontra-se ausente (HERNANDES *et al.*, 2009).

As cepas de EIEC apresentam a capacidade de invadir e de multiplicar-se em células epiteliais, causam diarreia aquosa e quando a infecção é severa pode causar colite inflamatória. São bioquímica, genética e patogenicamente semelhantes à

Shigella spp., entretanto não produzem a toxina de Shiga (LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998).

As estirpes de *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) apresentam seus principais fatores de virulência codificados por genes localizados em elementos genéticos móveis. Ela está relacionada a um amplo espectro de doenças humanas, que compreende desde diarreias leves à colite hemorrágica (HC) e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU, cuja possível seqüela mais grave é, possivelmente, a falência renal) e a púrpura trombocitopênica trombótica (TTP), em seres humanos (GRIFFIN; TAUXE, 1991; NATARO; KAPER, 1998). EHEC constitui uma subcategoria de STEC, que diferenciam entre si através da capacidade das cepas de EHEC de produzirem a lesão A/E, de forma semelhante à causada por EPEC (NATARO; KAPER, 1998).

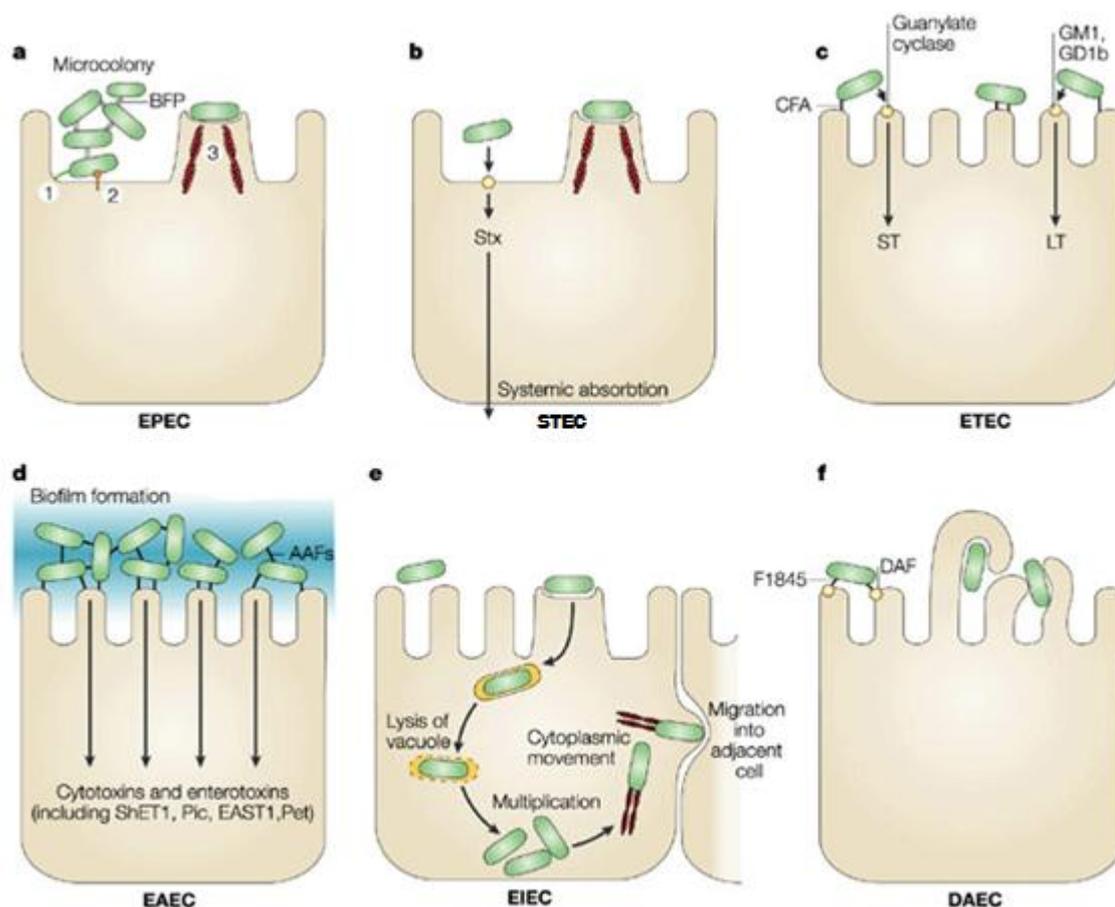
DAEC é a categoria de *E. coli* diarreiogênica que apresenta um padrão de adesão difusa em células epiteliais em cultura (ELLIOTT; NATARO, 1995). Além de causar várias infecções entéricas, como diarreia em crianças, também estão relacionadas com infecções no trato urinário (pielonefrite, cistite e bacteriúria assintomática). Sua patogênese ainda é pouco conhecida, e não há descrição de surtos relacionados com alimentos até o momento.

EAEC é caracterizada por aderir a células epiteliais cultivadas no padrão denominado de adesão agregativa (tijolos empilhados) (NATARO et al. 1987). Este patógeno está normalmente associado à diarreia persistente em crianças, principalmente em países desenvolvidos (SEARS; KAPER, 1996).

ETEC é importante causadora de diarreia desidratante em crianças em países em desenvolvimento. Estes organismos produzem as enterotoxinas termo estável (ST) e termo lábil (LT), que dentre as enterotoxinas são as melhores caracterizadas (SEARS; KAPER, 1996).

Os diferentes patotipos de *E. coli* diarreiogênicas estão representados na **Figura 1** e seus respectivos fatores de virulência.

Figura 1 – Esquemas representativos de DEC e seus principais fatores de virulência



FONTE: Adaptado de Kaper et al., 2004.

1.3 *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC)

A *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é a causa mais comum de diarreia em países em desenvolvimento, causando anualmente entre 280 e 400 milhões de episódios de diarreia em crianças menores de 5 anos, 100 milhões de episódios em crianças com idade entre 5-14 anos e estima-se 400 milhões de casos por ano em pessoas com mais de 15 anos (WHO 2006). Apesar de impressionantes, estes números podem estar subestimados, uma vez que diarreia causada por ETEC é também associada com doença crônica nutricional. Esta correlação é encontrada principalmente em crianças nas localidades menos desenvolvidas da Ásia, África, Oriente Médio e América Latina (ABU-ELYAZEED et al., 1999). Estudos realizados no Egito e em Bangladesh apontaram cepas de ETEC como principal causa da

diarreia em crianças com menos de cinco anos de idade, acometendo 70% e 90% dos casos estudados, respectivamente (revisto por QADRI et al., 2005).

No Brasil, um estudo realizado com 119 crianças que apresentavam diarreia aguda endêmica em Salvador, detectou ETEC como sendo o segundo patótipo de *E. coli* diarreiogênica mais frequentemente isolado (7,5%) (FRANZOLIN et al., 2005). Em outro estudo realizado na mesma cidade, com 1207 crianças que apresentavam ou não diarreia aguda endêmica, cepas de ETEC foram detectadas em 3,7% dos casos estudados (BUERIS et al., 2007). Em João Pessoa, dados de um estudo realizado por Moreno e colaboradores (2008) semelhante, demonstram que a ETEC foi encontrada nas fezes de 11% dos casos de diarreia aguda, ficando atrás apenas da EAEC.

Além de ser uma das principais causas de diarreia em crianças, ETEC também é o principal agente associado à chamada “diarreia dos viajantes”, que acomete turistas em trânsito em regiões onde esse patógeno é endêmico (WENNERAS et al., 1999).

Cepas de ETEC patogênicas para o homem se restringem a um número limitado de sorotipos e podem produzir, isoladamente ou simultaneamente, dois tipos de enterotoxinas: a toxina termolábil (LT) e a toxina termoestável (ST), que diferem entre si em estrutura e mecanismo de ação (BEAUSOLEIL; LABRIE; DUBREUIL, 2002; LEVINE et al., 1983).

A presença de uma ou de ambas as toxinas definem as amostras como ETEC. Sendo assim, a detecção dessas toxinas é o modo mais simples de identificá-las. Diversos estudos epidemiológicos mostraram que 75% das cepas de ETEC expressam ST e/ou LT, encontrando uma clara associação entre as cepas de ETEC que expressam essas toxinas e a diarreia, considerando-as, portanto, um importante fator de virulência (revisto por WOLF, 1997).

1.4 Enterotoxina termolábil (LT)

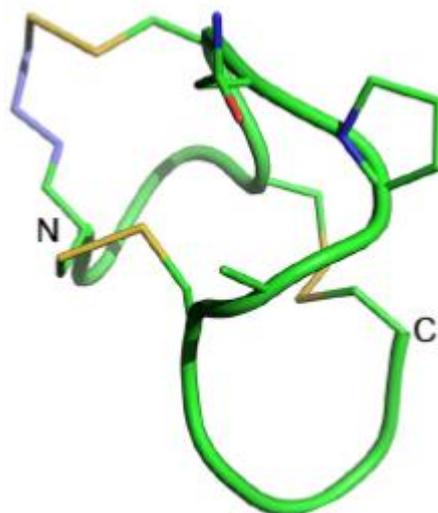
Devido à similaridade com a toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae*, a enterotoxina termolábil (LT) pode ser considerada o fator de virulência de ETEC melhor caracterizado.

A LT é uma toxina com estrutura do tipo AB₅, grande e oligomérica. Portanto é composta de uma subunidade A e outra B. O mecanismo de ação da LT se dá pela ligação da subunidade B ao receptor GM1 dos enterócitos sendo assim endocitada. Ocorre então uma dissociação das duas subunidades, e a subunidade A é transportada ao citosol, onde deve ativar as ARFs (*ADP-ribosylation factors*). Este processo gera um aumento de AMP-cíclico intracelular causando um influxo de eletrólitos, levando assim a diarreia (FLECKESTEIN et al., 2010).

1.5 Enterotoxina termoestável (ST)

A toxina termo estável (ST) é pequena, monomérica, com cerca de 2 kDa. O gene *estA* que a codifica esta associado a um transposon localizado em um plasmídeo (SO; MCCARTHY, 1980). Este gene codifica uma toxina rica em cisteínas, variando entre 18 e 19 aminoácidos (THOMPSON; GIANNELLA, 1985), sua região C-terminal é conservada, apresentando 13 aminoácidos, dos quais seis resíduos são cisteínas que formam três pontes de dissulfeto. Essas pontes são responsáveis pela atividade enterotóxica e a natureza termoestável da toxina (RASHEED; GUZMAN-VERSEZCO; KUPERSZTOCH,1990) (**Figura 2**).

Figura 2 – Estrutura do domínio tóxico (resíduos 6 a 18) da STp. N e C terminais estão marcados. As 3 pontes de dissulfeto estão demonstradas por “sticks”.



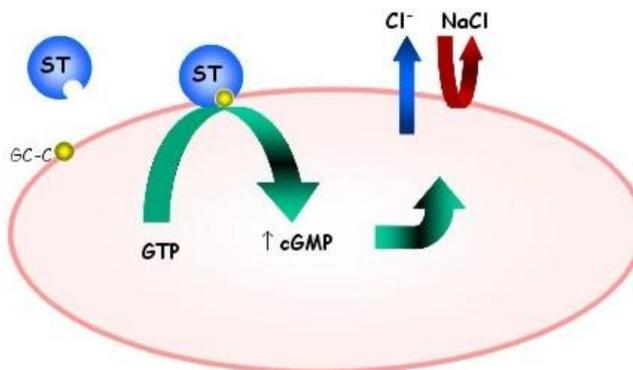
FONTE: Taxt et. al., 2010

A ligação de ST ao seu receptor celular resulta na estimulação de guanilato ciclase a qual leva a um aumento intracelular de GMP cíclico. Esse aumento de GMP cíclico afeta o fluxo eletrolítico, com inibição da absorção de sódio e estímulo na secreção de cloretos, essas alterações resultam na diarreia característica das infecções por ETEC (GIANNELLA, 1995) (**Figura 3**).

A enterotoxina ST pode ser classificada em STa (STI), ST-Ia (ST-P) e ST-Ib (ST-H), sendo estas relacionadas ao receptor GC-C e presentes em amostras que acometem humanos. Existem ainda outro tipo, a STb (STII), tipicamente relacionada a cepas porcinas. A STb tem a ligação feita por diferentes receptores e a não é bem esclarecida a sua relação no quadro de diarreia em humanos (FLECKESTEIN et al., 2010).

ST-I é produzida por ETEC e por várias outras bactérias gram-negativas incluindo *Yersinia enterocolitica* e *Vibrio cholerae* não O1. ST-I possui cerca de 50% de identidade proteica com a toxina termoestável EAEC EAST1. Inclusive, algumas amostras de ETEC podem também expressar EAST-1 além de ST-I (NATARO; KAPER, 1998; SAVARINO et al, 1996; YAMAMOTO; ECHEVERRIA, 1996).

Figura 3 - Mecanismo de ação da toxina ST-I de ETEC



Fonte: Menezes, 2002.

1.6 Diagnóstico de ETEC

Ensaio imunossorológicos foram desenvolvidos para detecção de ST, incluindo RIA (*radioimmunoassay*) (GIANNELLA et al., 1981) e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (CRYAN, 1990). Para LT, diferentes ensaios imunológicos foram descritos, dentre eles o teste Biken (HONDA et al., 1981), ELISA (YOLKEN et al., 1977), ensaios de aglutinação (ITO; KUWAHARA; YOKOTA, 1983), ensaio de aglutinação de látex passiva reversa (SCOTLAND; RICHMOND; ROWE, 1983) e ensaio de coaglutinação estafilocócica (CHAPMAN; DALY, 1993). O ELISA-GM1 (SACK et al., 1980; SVENNERHOLM; HOLMGREN, 1978; SVENNERHOLM; WIKLUD, 1983) foi desenvolvido primeiramente para detectar LT, sendo, subsequentemente, combinado para detecção de ST e LT. No entanto, ele tem sido utilizado somente em estudos epidemiológicos (QADRI et al., 2005). Como alternativa ao ELISA GM-1, devido ao seu elevado custo, um ELISA de captura foi desenvolvido utilizando a fração enriquecida em IgG do anticorpo anti-LT-I obtido em coelho e um anticorpo monoclonal anti-LT-I, caracterizado como IgG2b. Este ELISA apresentou 100% de sensibilidade e 99% de especificidade diante das cepas testadas (MENEZES et al., 2006).

Os ensaios imunossorológicos apresentam diversas vantagens quando comparados a outros métodos de detecção. Dentre as inúmeras vantagens desses métodos podemos citar: alta especificidade, sensibilidade, fácil preparação da amostra, fácil execução, além da rápida obtenção dos resultados. Os ensaios citados acima necessitam de anticorpos anti-LT ou anti-ST para a sua execução. Esses anticorpos policlonais ou monoclonais são obtidos a partir de animais e apresentam diferentes características quando comparados. 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; TRAVERS; WALPORT, 2008).

1.7 Anticorpos monoclonais

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)

Em 1974, Pontecorvo descreveu que protoplasmas de plantas quando tratados com polietilenoglicol (PEG) poderiam ser rapidamente fundidos. Em 1975, Köhler e Milstein descobriram que era possível obter a fusão de linfócitos B de camundongo com capacidade de produzir anticorpos com células de mieloma de camundongo se utilizando do mesmo agente. As células híbridas cresceriam ilimitadamente, produzindo grandes quantidades de anticorpos com alta especificidade predeterminada para um epítipo e homogêneos (HARLOW E LANE, 1988). Estes anticorpos foram denominados anticorpos monoclonais e as células híbridas que os produziam hibridomas. Os anticorpos monoclonais abriram novas perspectivas de investigação no campo da biologia e da medicina (KÖHLER E MILSTEIN, 1975).

Ao contrário das células de mieloma, as células de baço ou de outros órgãos linfoides de um animal imunizado com o antígeno de interesse, além de possuir genes correspondentes a imunoglobulina, produzem a enzima hipoxantinaguanina-fosforribosil-transferase (HGPRT) que atua na produção dos ácidos nucléicos.

Existem duas vias para a síntese de ácidos nucleicos em linfócitos B normais, denominadas via 'de novo' e via de salvamento.

Algumas células mielóides são mutantes para a produção da enzima HGPRT. Apenas a via 'de novo' encontra-se presente para a síntese dos ácidos nucleicos nestas células. No momento da fusão a via 'de novo' pode ser bloqueada através de drogas, tais como: azaserina, metotrexato e aminopterina. A aminopterina é a droga mais utilizada para selecionar as células de mieloma não fusionadas, sendo assim, os hibridomas permanecem vivos devido a presença da via de salvamento encontrada nas células B e, conseqüentemente, possuem assim a enzima HGPRT. Sendo assim as células de mieloma não fusionadas acabam morrendo.

Anticorpos monoclonais contra a toxina termoestável (ST) de ETEC foram produzidos no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (MENEZES, 2002) com o objetivo de serem utilizados como ferramenta para diagnóstico.

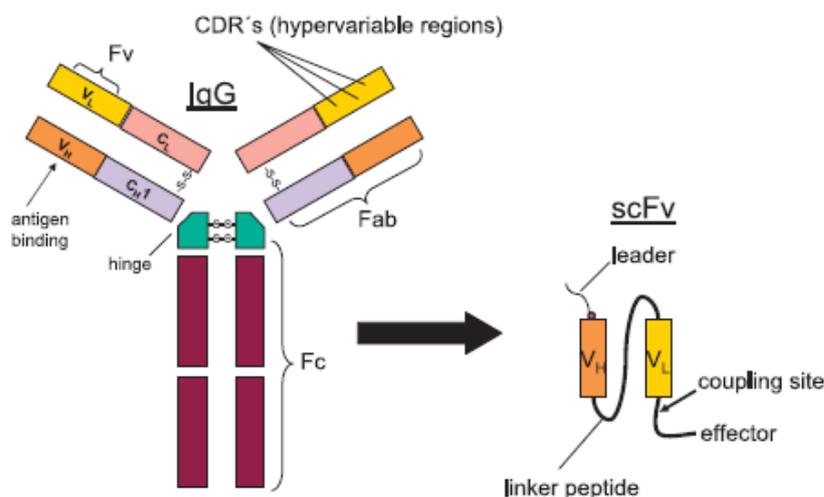
1.8 Anticorpos recombinantes

Com o intuito de se manter a homogeneidade dos anticorpos monoclonais, além da sua especificidade, aliados ainda à produção em larga escala com baixo custo, a engenharia genética tem sido utilizada para obtenção de anticorpos recombinantes.

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 para obtê-los (HAGEMeyer et al., 2009). Dentre as diferentes construções baseadas na estrutura do anticorpo, podemos citar os fragmentos variáveis em cadeia única (*single chain Fragments variable* ou scFv). Esses fragmentos são constituídos dos domínios variáveis (V), mas não dos domínios constantes (C) da molécula de anticorpo (GIVOL, 1991). Os genes que codificam para esses domínios podem ser especificamente amplificados, clonados individualmente, e posteriormente subclonados formando um 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. Dessa forma, a flexibilidade da molécula expressa é preservada para melhor se ligar ao antígeno. Geralmente, polipeptídeos com 15 aminoácidos de comprimento apresentando os aminoácidos $(Gly_4Ser_1)_3$ na sua composição são os mais utilizados, uma vez que *linkers* com comprimento superior a 12 resíduos de aminoácidos permitem interações entre V_L e V_H semelhantes às nativas (HOLLIGER; HUDSON, 2005; JOOSTEN et al., 2003; KORTT et al., 1997; ZDANOV et al., 1994). Na **Figura 4** podemos observar a ilustração de uma molécula de IgG e seu derivado, um fragmento variável em cadeia única (scFv).

Figura 4 – 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 infraestrutura 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 desejadas; 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.

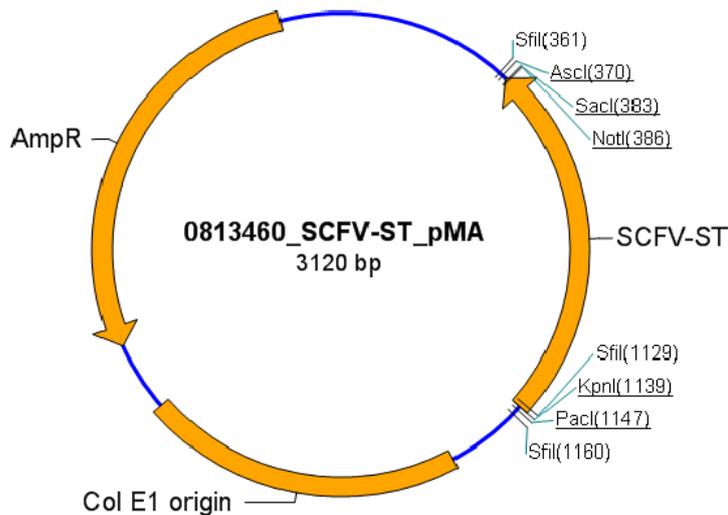
Dentre as bactérias utilizadas como sistema de expressão, a *Escherichia coli* tem sido amplamente utilizada para expressão de proteínas recombinantes, devido a facilidade de seu manuseio, baixo custo e rápido crescimento. Diversos trabalhos têm descrito alto rendimento da expressão de fragmentos de 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*. A primeira é a produção do fragmento no citoplasma bacteriano, na forma de corpúsculos de inclusão, seguida de renaturação para recuperação de moléculas biologicamente ativas. Já a segunda estratégia consiste na 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 expressas 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).

A afinidade destes anticorpos pode ser significativamente aumentada aplicando técnicas dirigidas à evolução. Em geral, estas metodologias incluem várias etapas de mutação, expressão (*display*), seleção e amplificação (WARK & HUDSON, 2006).

Levando-se em conta as vantagens dos anticorpos recombinantes (scFv), o mRNA do hibridoma produtor de anticorpos contra a toxina ST foi isolado, foi transcrito em cDNA por uma reação de transcriptase reversa, e este foi utilizado como molde. As regiões do gene responsáveis pela tradução das porções variáveis das cadeias leves e pesadas da imunoglobulina foram amplificadas utilizando iniciadores que compõe o kit *Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System* (GE Healthcare, EUA). Os produtos obtidos foram clonados no vetor *pGEM-T Easy* (Promega, EUA) para subsequente sequenciamento.

Com as sequencias, foi montado um gene sintético otimizado para expressão em bactérias. Este gene obtido em outro trabalho (dados não publicados) foi então utilizado como matéria prima para este trabalho (**Figura 5**).

Figura 5 – Mapa do vetor pMA contendo o fragmento do gene correspondente ao scFv-ST (*GeneArt*)



Quadro 1 – Sequência de nucleotídeos do gene sintético scFvST inserido no plasmídeo pMA

**Sequência de
nucleotídeos do
gene sintético
scFvST**

GAGCGGAAGGCCCATGAGGCCAGTTAATTAAGAGGTACCGGC
CCAGCCGGCCGTGAAACTGCAGCAGAGCGGTGCGGAACTGGC
CAATCCGGGTGCGAGCGTGAAACTGAGCTGCAAAGCGAGCGG
CTATACCTTTAGCAACTATTGGATGCATTGGGTGAAACAGCGT
CCGGGTCAAGGCCTGGAATGGATTGGCTTTATTAATCCGCGCA
ACGGCTATATTAATAACAACCAGAAATTCAAAGATAAAGCGAC
CCTGACCGCGGATAAAAAGCAGCAGCACCGCGTATATGCAGCTG
ACCAGCCTGCCGTATGAAGATAGCGCGGTGTATTATTGCGCGC
GTGATGATAACGGCGGCTTTGATTATTGGGGCCAGGGCACCAC
GGTACCCTGAGCAGCGGCGGTGGTGGTAGCGGTGGCGGCGG
TAGCGGTGGTGGTGGCAGCGATATTCAGATGACCCAGAGCCCG
AGCAGCCTGGCCGTTAGCGCGGGTGAAAAAGTGACCATGAGCT
GCAAAGCAGCCAGAGCCTGCTGAACAGCCGTACCCGTAAAAA
CTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGAAA
CTGCTGATTTATTGGGCGAGCACCCGTGAAAGCGGCGTGCCGG
ATCGTTTTACCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAC
CATTAGCAGCGTGCAGGCGGAAGATCTGGCCGTGTATTATTGT
AAACAGAGCTACAACCTGCTGACCTTTGGTGCGGGCACCAAAC
TGGAATTAAGCGGCCGCGAGCTCATGGCGCGCCTAGGCCTT
GACGGCCTTCCGCCA

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho consistiu na obtenção de fragmentos de anticorpos recombinantes (scFv) contra a toxina termoestável (ST) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), purificação e caracterização dos anticorpos recombinantes quanto sua atividade funcional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da toxina ST

Para obtenção de ST, o isolado 3321-4 (O153:H43 - protótipo) gentilmente cedido pela Profa. Beatriz Guth da disciplina de Microbiologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, foi cultivado a 37 °C por 16-18 horas a 250 rpm em 3 mL de meio Luria Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0). Esta cultura foi espalhada uniformemente em placas de CFA (1% de ácido casamínico, 0,15% de extrato de levedura e 2% de ágar) e incubada a 37 °C por 18 horas. O conteúdo bacteriano foi retirado e ressuspenso em Tampão Salina Fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,4 e este submetido a análise bacteriana. O material foi centrifugado, e o sobrenadante coletado foi submetido a um filtro de exclusão molecular de 30 kDa. Este foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE, como descrito por SCHAGGER; VON JAGOW, 1987) e utilizado como antígeno controle nos testes.

3.2 Clonagem do gene correspondente ao fragmento variável do anticorpo (scFv) anti-ST

3.2.1 Amplificação do gene sintético scFvST

Utilizando iniciadores (*primers*) obtidos em outro trabalho em nosso laboratório, foi possível a amplificação do fragmento variável de cadeia única do anticorpo scFv-ST e inserção dos sítios de restrição para BamHI e XhoI, as sequências destes iniciadores estão demonstradas no quadro 2.

Quadro 2 – Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados para amplificação do gene correspondente ao scFvST.

scFvST Forward: 5' GGATCCGTGAAACTGCAGCAGAGCG 3'

BamHI

scFvST Reverse: 5' CTCGAGTCATTTAATTTCCAGTTTGGTGCC 3'

XhoI

Para isto foram utilizados 0,2 mM de uma mistura de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada um dos iniciadores (*foward e reverse*), tampão de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), 2,5 U de *Pfx DNA Polymerase*, 50 ng de DNA Plasmidial contendo o gene sintético. A água foi utilizada como controle negativo. A reação foi realizada em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA), sob as seguintes condições: 94 °C por 50 segundos, 58 °C por 50 segundos, 72 °C por 1 minuto, totalizando 35 ciclos. Então o produto de PCR foi analisado em gel de agarose 0,8% e purificado utilizando o kit de extração de gel *PureLink Quick Gel Extration* (Invitrogen, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.2.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR, extrações plasmideais e análises de restrição foram analisados em géis de agarose, preparados em diferentes concentrações, conforme indicado. A agarose (GE Healthcare, EUA) foi dissolvida por aquecimento em

tampão TAE (Tampão Tris-Acetate - Tris 40 mM, Ac. Acético 20 mM, EDTA 1 mM) e acrescentando-se 1 µL de GelRed (Biotium, EUA) para a visualização. Uma alíquota de 5 µL das amostras foi homogeneizada com 1 µL de tampão de amostra (0,25% de azul bromofenol; 0,25% de xileno cianol; 30% de glicerol), e como padrão molecular foi utilizado *1 kb DNA Ladder* ou *1 kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen, EUA). Estas foram submetidas à migração sob corrente constante de 90 V. Para fotografia do gel foi utilizado o sistema de captação de imagem AlphaImager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

3.2.3 Adição de adenina terminal ao gene scFvST

Para a clonagem do gene scFvST no vetor pGEM-T foi necessário a adição da adenina terminal. Para isto, foram utilizados neste procedimento: 750 ng do fragmento scFvST, 0,2 mM de dATP, 1,5 mM de MgCl₂, 5 U de Taq DNA Polimerase, tampão de PCR e água ultrapura para um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 72°C por 30 minutos em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA) sendo purificado com o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare, Reino Unido), seguindo as recomendações do fabricante.

3.2.4 Clonagem do gene scFvST no vetor pGEM-T

Uma vez purificado, para aumentar a massa de cópias do gene scFvST, seguido de sequenciamento e aumentar a eficiência da digestão para inserção nos vetores de expressão, o produto de PCR foi recombinado com o vetor pGEM-T *Easy* (Promega, EUA) utilizando a razão molar inserto:vetor de 3:1. Para cada 50 ng de vetor foram utilizados 40 ng de fragmento, 3 U de *T4 DNA Ligase* (Promega, EUA), tampão de ligação fornecido pelo fabricante e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 4 °C por 18 horas.

3.2.5 Transformação bacteriana por choque térmico

Células da cepa DH5α competentes por tratamento com cloreto de cálcio, foram transformadas por choque térmico o produto da reação de ligação. Foi

adicionado 1 μL do produto da reação de ligação em alíquotas de 50 μL de células competentes, sendo incubado por 30 minutos em gelo. As células foram submetidas a choque térmico a 42 °C por 45 segundos e mantidas novamente por 2 minutos em gelo. As células transformadas foram recuperadas com o acréscimo de 950 μL de meio Luria-Bertani (LB) (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0), sendo mantidas a 37 °C sob agitação a 150 rpm. Um volume de 100 μL da cultura foi plaqueado, em duplicata, em placas LB ágar (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, Ágar 15 g/L, pH 7.0) contendo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de *5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside* (X-Gal) (Invitrogen, EUA) e 1 mM de *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside* (IPTG) (Sigma Aldrich, EUA). As placas foram incubadas a 37 °C, por 18 horas e as colônias resultantes do crescimento bacteriano foram selecionadas.

3.2.6 Extração plasmidial

O protocolo empregado para a extração plasmidial foi baseado no descrito por Birnboim e Doly (1979) com ligeiras modificações. Apenas as colônias brancas provenientes do crescimento da transformação das células DH5 α com o produto da ligação foram utilizadas, enquanto as azuis foram descartadas. As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio LB (Tryptona 10 g/L, Extrato de Levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.0) com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e mantidas sob agitação (180 rpm), a 37 °C por 18 horas. Um volume de 4,5 mL do crescimento bacteriano, foi centrifugado a 16000 x g, por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 300 μL de uma solução de EDTA 0,5 M, Tris 1 M pH 8,0, glicose 20%, água ultrapura q.s.p. e incubando por 5 minutos em gelo. Em seguida 600 μL de uma solução de hidróxido de sódio 10 N, dodecil sulfato de sódio 20%, água ultrapura q.s.p. foram adicionados, homogeneizados lentamente por inversão e incubado em gelo por 5 minutos. Uma solução de acetato de sódio 3 M, pH 4,8 foi adicionada após a incubação em um volume de 450 μL , homogeneizada lentamente por inversão e incubada 30 minutos no gelo. O lisado celular foi centrifugado a 16000 x g por 15 minutos a 4 °C.

Após a centrifugação, ao volume de 1,2 mL do sobrenadante coletado foram adicionados 2,5 volumes de etanol 100%, previamente resfriado e homogeneizados lentamente por inversão e centrifugados a 16000 x g por 10 minutos a 4 °C. O

sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 70% resfriado, centrifugados a 16000 x g por 5 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado foi seco em temperatura ambiente até a completa evaporação do etanol e ressuspenso em 50 µL de água ultrapura estéril.

3.2.7 Digestão do vetor de expressão pET28a e dos clones de pGEM-scFvST

O vetor de expressão pET28a e os clones de pGEM-scFvST foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e XhoI. Os clones de pGEM-scFvST foram digeridos para obtenção do fragmento scFvST, enquanto o pET28a, foi digerido para a linearização e posterior ligação do fragmento scFvST. Nessas reações de digestão foram utilizadas as mesmas concentrações de DNA e volumes de reagentes, como também as mesmas condições de incubação.

Para cada uma das reações foram utilizados 750 ng de DNA plasmidial, tampão *React 2*, 10 U de enzima XhoI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril para volume final de 15 µL, sendo incubadas a 37 °C por 2 horas. Ao produto dessa primeira digestão foram adicionados tampão *React 3*, 10 U de enzima BamHI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril, totalizando 25 µL, sendo também incubadas a 37 °C por 2 horas. As digestões foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,9% em 50 mL de TAE (*Tris-acetate-EDTA* pH 8) com 1 µL de GelRed (Biotium, EUA), os fragmentos liberados e os vetores de expressão digeridos foram purificados do gel de agarose com o kit *PureLink Quick Gel Extration* (Invitrogen, EUA), segundo recomendações do fabricante.

3.2.8 Clonagem do fragmento de scFvST no vetor de expressão pET28a

Para a reação de ligação com o vetor pET28a, empregando a razão molar inserto:vetor de 3:1, foram utilizados 3,75 µL da amostra a 2,5 ng/mL de fragmento scFvST, 10 µL da amostra a 20 ng/µL de vetor pET28a, tampão de ligação fornecido com a enzima e 40 U de *T4 DNA Ligase* (New England Biolabs, EUA) e água ultrapura para completar um volume de 20 µL. Após incubação da reação de 1 hora a temperatura ambiente seguida de 18 horas em termociclador a 16 °C. A reação de ligação foi utilizada para transformar *E. coli* DH5α, por choque térmico. As bactérias foram cultivadas a 37 °C e então foi realizada a extração plasmidial.

3.2.9 Análise de restrição dos clones de pET-scFvST

Os seis clones de pET-scFvST foram submetidos a análise de restrição com as enzimas BamHI e XhoI. As reações de digestão foram realizadas com 250 ng de DNA plasmidial, tampão *React 2*, 10 U de XhoI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL. Estas reações foram incubadas a 37 °C por 2 horas. Após a digestão com a enzima XhoI, realizou-se a digestão com a enzima BamHI, sendo acrescentadas à reação de digestão tampão *React 3*, 10 U de BamHI (Invitrogen, EUA) e água ultrapura estéril totalizando um volume final de 15 µL. Estas reações foram incubadas a 37 °C, por 2 horas e a análise de restrição foi feita após a migração dos produtos da digestão em gel de agarose 0,8%.

3.2.10 Sequenciamento e análise de DNA

Com a confirmação da presença do inserto de interesse, os clones foram submetidos a sequenciamento para verificação da 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 Clustal W2 (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>). A tradução da sequência de DNA em proteína foi realizada com auxílio do programa Generunner, enquanto os cálculos do ponto isoelétrico e de massa molecular foram calculados por meio da ferramenta *ProtParam*, presente no servidor ExPasy (disponível em: <http://expasy.org/tools/protparam.html>).

3.2.11 Modelagem molecular do scFvST

As sequências dos *frameworks* e dos CDRs foram utilizadas, independentemente da investigação de similaridade usando um banco de dados de uma sequência com estrutura resolvida (blastp contra as sequências de proteína banco de dados). Uma vez que os modelos adequados para cada cadeia foram

selecionados, estas foram modeladas usando o programa *Modeller 9v9*. (SALI & BLUNDELL, 1993). Para gerar as imagens, o programa "*Noc 3.0*" foi utilizado.

3.3 Expressão do scFvST

3.3.1 Padronização do meio de cultivo para expressão do fragmento scFvST

Células BL21(DE3) foram transformadas com o plasmídeo pET-scFvST e desta cultura transformada foi preparado um pré-inóculo de 3 mL em meio LB com 50 µg/mL de canamicina, cultivado a 37 °C, por 18 horas a 200 rpm. Este pré-inóculo foi utilizado para preparar o inóculo de expressão utilizando-se de uma diluição 1:100 em 500 mL de meio LB ou 500 mL de meio 2YT (SAMBROOK & RUSSELL 2001), ambos com 50 µg/mL de canamicina (Invitrogen, EUA) a 37 °C, 200 rpm até atingir um A_{600} de 0,6 a 0,8. Uma alíquota de 1 mL de cultura (controle não-induzido) foi retirada. Ao frasco de cultura foi acrescentado IPTG em uma concentração final de 1 mM. A cultura foi mantida sob agitação por mais 4 horas, sendo coletado 1 mL da cultura (controle induzido) ao final dessa incubação. Os volumes restantes das culturas foram centrifugados e os precipitados ressuspensos em 1 mL de Tris/HCl 20 mM pH 7,6 para lise celular por rompimento. Após a lise, a suspensão foi centrifugada e as frações solúveis e insolúveis do extrato celular foram separadas.

3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os ensaios de indução foram analisados por SDS-PAGE em condições redutoras e desnaturantes, 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 80 µL de água ultrapura, foram homogeneizados com tampão de amostra (tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto 60 mM, pH 6,8; dodecil sulfato de sódio 2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,001%; β-mercaptoetanol 5%). Em seguida foram aquecidas a 100 °C por 5 minutos e submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE na concentração de 12%. A eletroforese foi efetuada a 15 mA, por cerca de 2 horas em tampão Tris-Glicina (tris aminometano hidrocloreto 0,025 M, dodecil sulfato de sódio 0,1%, glicina 0,192 M), juntamente com o padrão de massa molecular *Full-Range Rainbow*

Markers RPN 800E (GE Healthcare, Reino Unido). Após eletroforese, os géis foram corados por Coomassie Bleu R-250 (BioRad, EUA), sob agitação, a temperatura ambiente por 1 hora e descorados com tampão descorante (metanol 30%, ácido acético 7% e água ultrapura q.s.p.) por 18 horas.

3.3.3 Western-blot

As proteínas separadas por SDS-PAGE foram transferidas para membranas de nitrocelulose *Hybond-C Extra* (GE Healthcare, EUA), utilizando o aparato em sistema úmido (BioRad Laboratories, EUA), sob corrente elétrica constante de 150, a 4 °C, por 18 horas em tampão de transferência (tris 250 mM, pH 8,3; glicina 192 mM; metanol 20% v/v), segundo Towbin, Staehelin e Gordon (1979). Uma vez feita a transferência, as membranas foram coradas com *Ponceau S* (Sigma-Aldrich, EUA) para coloração do padrão molecular, sendo bloqueadas com solução de 10% de leite desnatado (Nestlé, Brasil) em PBS 10 mM, por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação.

3.3.4 Immunoblotting

Após o bloqueio, a membrana foi submetida à imunodeteção empregando o anticorpo monoclonal IgG2a anti-His (GE Healthcare, EUA) diluído 1:3.000 em solução de leite desnatado 10%. Após a incubação por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação, a membrana foi lavada, por 3 vezes de 5 minutos cada, com PBS-Tween 20 a 0,05% (Synth, Brasil). Uma vez lavada, a membrana foi incubada com IgG de cabra anti camundongo conjugado a peroxidase (Sigma Aldrich, EUA) diluído 1:1.000 em solução de leite desnatado 10% por 1 hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Antes da revelação com uma solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (5 mg de DAB, 30 mL de PBS, 150 µL de peróxido de hidrogênio), o ciclo de lavagem das membranas foi repetido. A revelação foi interrompida com a adição de água destilada.

3.4 Purificação do scFvST

3.4.1 Purificação do scFvST por cromatografia de afinidade a Níquel em FPLC

Como previamente descrito, células de *E. coli* BL21 (DE3) foram transformadas com pET-scFvST e submetidas à expressão protéica. A fração insolúvel, obtida através da lise bacteriana, foi solubilizada em tampão 1 contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 200 mM, imidazol 5 mM e ureia 8 M, e incubada a 4 °C sob agitação por 18 horas. A solução foi centrifugada a 12000 x g por 30 min e o sobrenadante após ser filtrado foi submetido a coluna de Níquel-Sepharose (GE Healthcare, Reino Unido) previamente equilibrada em AKTAprime plus (GE Healthcare, Reino Unido). Após a lavagem com tampão 1, amostra foi eluída com tampão 2 contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), NaCl 200 mM, imidazol 500 mM e ureia 8 M. A proteína purificada foi submetida à análise por eletroforese em gel SDS-PAGE.

3.4.2 Renaturação do anticorpo recombinante scFvST

O processo de renaturação foi realizado pelo método de diálise com concentrações decrescentes de ureia. A proteína em solução de ureia a 8 M foi depositada em uma membrana de diálise de 8000 Da em tampão de solubilização descrito previamente, contendo ureia 5 M. Após 12 horas a 4 °C, o tampão foi trocado por outro contendo ureia 3 M e a diálise efetuada da mesma forma. O processo foi repetido para as concentrações a 2 M, 1 M, 0,5 M de ureia, sendo a última diálise realizada apenas com o tampão de solubilização. Ao tampão de 0,5 M de ureia, foi acrescentado glutationa oxidada (GSSG) 375 µM para o auxílio da reestruturação das pontes dissulfeto. A proteína foi concentrada por PEG 6000, submetida a SDS-PAGE e quantificada pelo kit *Micro BCA Protein Assay* (Thermo Scientific – EUA).

3.5 Ensaios Funcionais do scFv

3.5.1 Imunofluorescência

Os isolados 3321-4 de ETEC (cepa protótipo produtora de ST) e E2348/69 (cepa protótipo de EPEC típica utilizada como controle negativo) foram cultivados em caldo LB a 37 °C por 18 horas, a 250 rpm. Um mililitro e meio foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos e lavado 3 vezes com PBS. O sedimento foi submetido à permeabilização utilizando triton X-100 a 2% sob agitação por 10 minutos e lavado 3 vezes com PBS, seguido de incubação com paraformaldeído a 1% por 20 minutos e 3 lavagens subsequentes com PBS. A suspensão bacteriana foi tratada com glicina 1%. O bloqueio foi realizado utilizando-se BSA 1%. A reação de imunofluorescência foi realizada utilizando-se o scFvST diluído 1:10 obtido neste trabalho, seguido de uma incubação com anticorpo anti-histidina, diluído 1:2000. Em seguida foi adicionado o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Aldrich, EUA) em uma diluição de 1:100 em azul de Evans. Todas as incubações foram realizadas por 1 hora à temperatura ambiente. Uma gota da suspensão bacteriana foi colocada em uma lamina de vidro e observada em microscópio de fluorescência (Axioskop – Zeiss, Alemanha) em aumento de 1000 x.

3.5.2 Padronização do teste ELISA utilizando os fragmentos de anticorpos scFvST

Uma placa de poliestireno MaxiSorp (Nunc, Dinamarca) foi sensibilizada com diluições seriadas do sobrenadante do lisado de 3321-4, com o objetivo de se obter um limite de detecção, em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 por 18 horas a 4 °C. A placa foi bloqueada com 1% de BSA em PBS e incubada com scFvST em uma diluição seriada partindo de 20 µg/mL, ou com anticorpo monoclonal anti-ST (como controle positivo), ou com anticorpo monoclonal anti-Stx1 (como controle negativo). Em seguida, foi adicionado o anticorpo anti-histidina, diluído 1:2000, seguido pelo o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Invitrogen, EUA) diluído 1:10000. Todas as etapas foram incubadas a 37 °C por 1 hora e lavadas 3 vezes com PBS Tween 0,05%. A reação

foi revelada com substrato cromógeno contendo O-fenilenodiamina (OPD) 5 mg em 10 mL de Tampão citrato e 5 µL de peróxido de hidrogênio. A absorbância foi medida no comprimento de 492 nm no leitor Multiskan EX (Labsystems).

3.5.3 ELISA dos isolados de ETEC produtores de ST

O teste foi realizado conforme descrito no item anterior, sendo que a placa foi sensibilizada com 200 µL dos sobrenadantes dos isolados produtores de ST da coleção do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, cultivados a 37 °C por 18 horas a 250 rpm em caldo *E. coli* (Merck – Alemanha) com lincomicina 100 µg/mL e ciprofloxacino 5 ng/mL. O scFvST foi utilizado em duas concentrações, 5 µg/mL e 2,5 µg/mL. Como controle positivo, o scFvST foi substituído pelo monoclonal anti-ST a 20 µg/mL. Para o controle negativo, o scFv foi substituído por PBS, para verificar se existe alguma ligação inespecífica do anticorpo anti-histidina com a toxina ST.

3.5.4 Western-blot e Immunoblotting

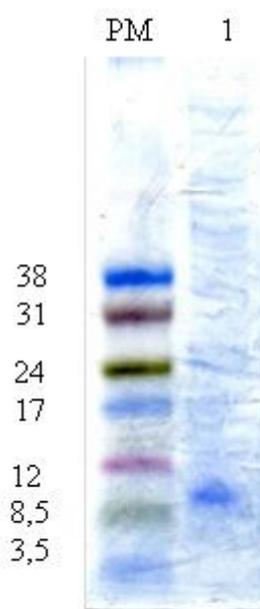
Este teste foi realizado como o descrito nos itens 3.3.3 e 3.3.4, sendo o preparado de ST submetido à SDS-PAGE de baixo peso molecular e transferido a uma membrana de PVDF. O scFvST foi utilizado nas concentrações de 15 µg/mL e 30 µg/mL e o monoclonal anti-ST em 30 µg/mL. O anticorpo anti-histidina foi usado diluído 1:5000 e seguido de uma incubação com anticorpo de cabra anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:5000. A revelação foi realizada com uma solução contendo 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (DAB 5 mg, 30 mL de PBS, 150 µL de peróxido de hidrogênio) e interrompida com a adição de água destilada.

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção da toxina ST

A toxina ST foi obtida por lise celular e apresentou-se na forma de pré-pro-peptídeo. A toxina apresentou uma massa molecular relativa, entre 8,5 kDa e 12 kDa, como observado na **Figura 6**.

Figura 6 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS de tris-tricina corado com *Coomassie Blue R-250*.



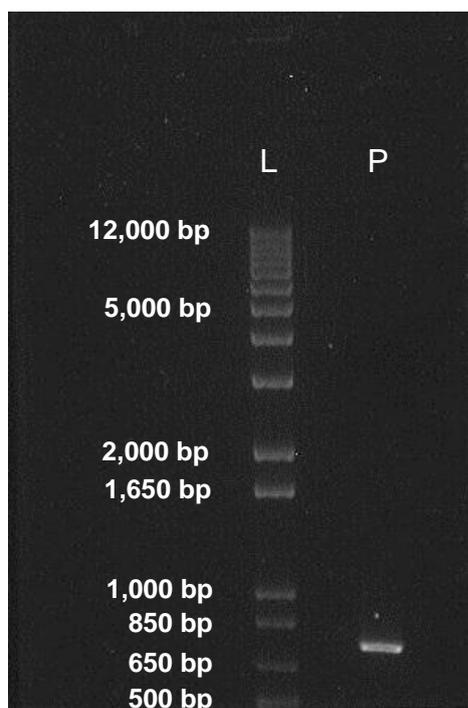
PM: Padrão de peso molecular de baixo peso; 1: ST na forma de pré-pro-peptídeo.

4.2 Clonagem do fragmento variável do anticorpo (scFv) anti-ST

Para a clonagem em pET28a foi necessário sua amplificação, utilizando-se iniciadores com sítios de restrição compatíveis com os sítios múltiplos de clonagem, neste casos para as enzimas BamHI e XhoI. A amplificação foi realizada através de

uma reação de PCR utilizando o gene sintético como molde. O fragmento scFv-ST aparece como um produto da reação de PCR com 725 pb (**Figura 7**).

Figura 7 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8 do produto de PCR

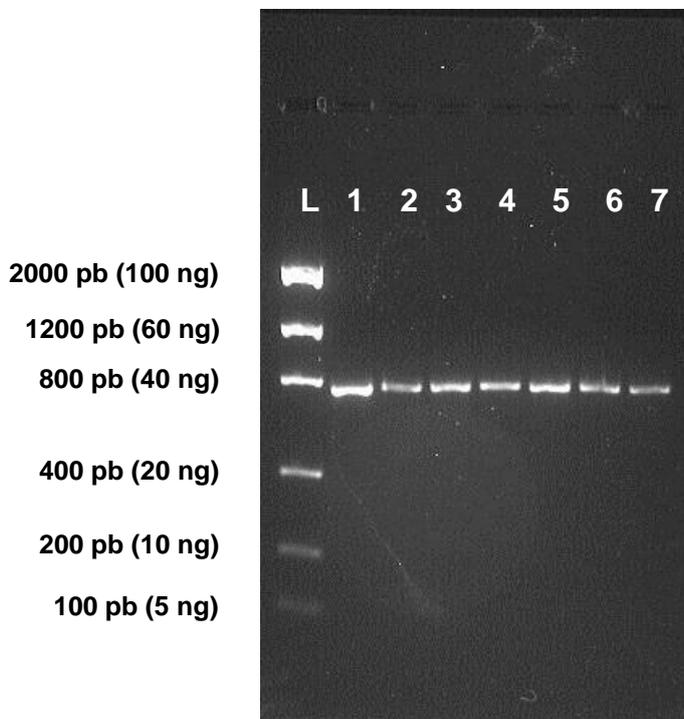


. L) *Ladder 1 kb Plus* (invitrogen, EUA); P) Fragmento scFv-ST com a inserção dos sítios para BamHI e XhoI

Para se obter maiores concentrações do fragmento de gene correspondente ao anticorpo, este foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T, e esta construção foi utilizada para transformar células DH5 α da qual foram recuperados 7 clones.

Após uma extração plasmideal, os clones do plasmídeo pGEM-scFvST foram submetidos a digestão pelas enzimas BamHI e XhoI. Os fragmentos resultantes foram dosados utilizando o padrão Low Mass (Invitrogen, EUA). Concluiu-se por comparação visual com o padrão de peso molecular que os insertos estavam na concentração de 30 ng aproximadamente. O perfil desta extração pode ser observado na **Figura 8**.

Figura 8 – Perfil de eletroforese em gel de agarose 0,8% do inserto (scFvST) purificado após a digestão do plasmídeo pGEM-scFvST com as enzimas BamHI e XhoI

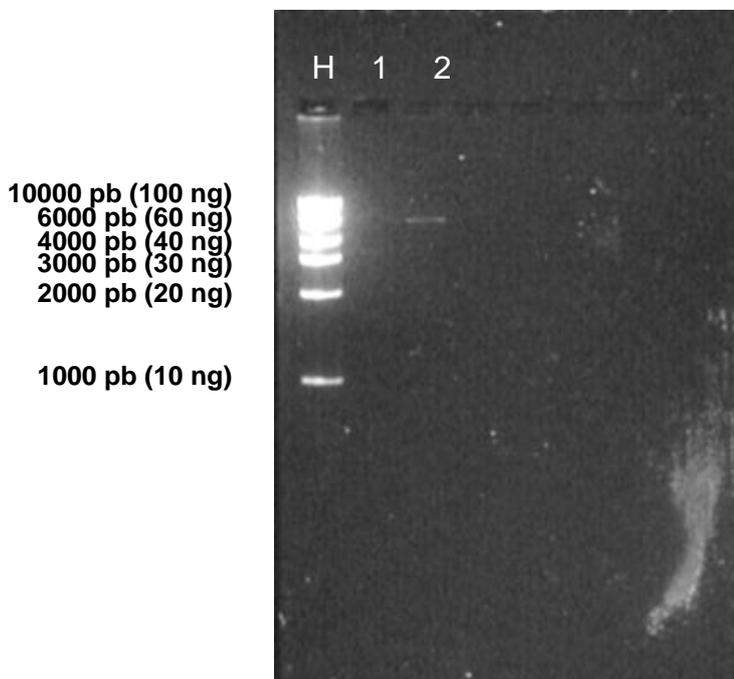


. Low Mass (L); diferentes clones do pGEM-scFvST (1,2,3,4,5,6,7).

O mesmo procedimento foi realizado com os vetores de expressão pET28a e pSMT3. A dosagem dos vetores digeridos foi realizada com o padrão *High Mass* (Invitrogen, EUA), segundo as instruções do fabricante.

A concentração do vetor pSMT3 foi tão baixa que não pode ser visualizada na figura, por ser um plasmídeo considerado de baixa cópia. A concentração do pET28a digerido foi considerada de aproximadamente 5 ng/ μ L pela comparação visual, o que pode ser visto também na **Figura 9**.

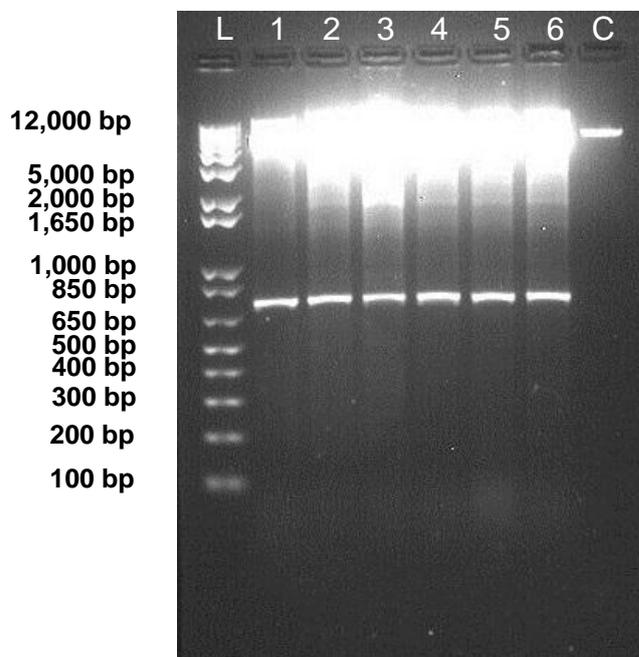
Figura 9 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% de vetores purificados após a digestão com as enzimas BamHI e XhoI.



High Mass (H); pSMT3 (1); pET28a (2).

Após a dosagem aproximada do inserto (scFv) e do vetor pET28a, foi realizada a ligação. E para confirmação se esta foi realizada com sucesso os 6 clones obtidos foram submetidos a uma análise de restrição utilizando as enzimas BamHI e XhoI. Pode-se observar na **Figura 10** que todos os clones liberaram um fragmento entre 850 pb e 650 pb.

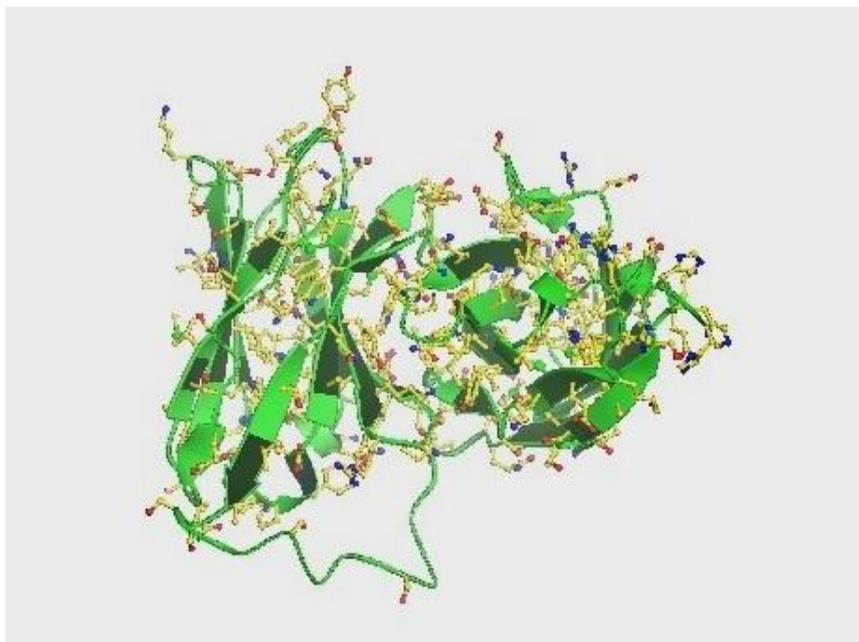
Figura 10 – Perfil eletroforético em gel de agarose 0,8% da análise de restrição do vetor pET-scFvST digeridas com as enzimas BamHI e XhoI.



1 kb plus Ladder (L); clones 1, 2, 3, 4, 5, 6 (1, 2, 3, 4, 5, 6); controle (pET28a cortado com as enzimas BamHI/XhoI) (C).

O sequenciamento mostrou que o fragmento correspondente ao scFvST presente no vetor pET-scFvST construído, possuía 100% de identidade com o fragmento presente no gene sintético, o que possibilitou e viabilizou a continuação do trabalho. Através desta sequência, dezenas de modelos foram gerados, foi selecionado apenas aquele com melhor energia. Os resultados da análise da sequência do scFvST permitiu a definição da estrutura funcional importante para a compreensão das suas atividades e para o processo de modelagem molecular com base na homologia (**Figura 11**).

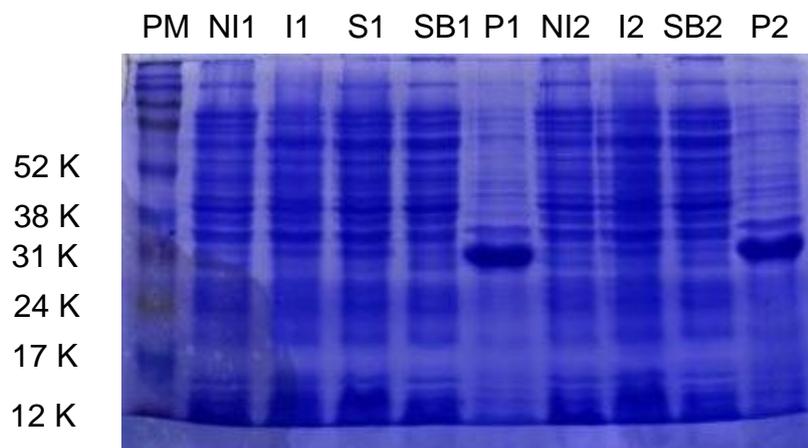
Figura 11 - Representação esquemática do scFvST feita pelo programa *Modeller* 9v9 e visualizada pelo programa *Noc 3.0*



4.3 Expressão do scFvST em pET28a

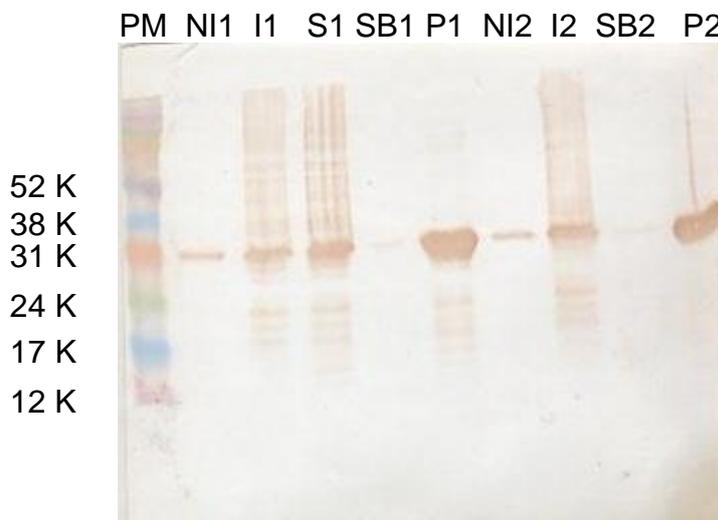
A expressão da proteína (scFv) foi identificada no *immunoblotting* em maior concentração na fração do sedimento (figura 9, frações P1 e P2), sugerindo que esta esteja sendo expressa em corpúsculos de inclusão, sendo assim insolúvel. O meio 2YT foi utilizado como alternativa para indução dos clones pET-scFvST 1 e 2, transformados em células BL21(DE3). A expressão da proteína recombinante pode ser observada nas **Figuras 12 e 13**, principalmente na fração correspondente ao sedimento do cultivo bacteriano, indicando a baixa solubilidade desta.

Figura 12 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* do ensaio de indução de células *E.coli* BL21(DE3) transformada com o clone 1 e 2 de pET-scFvST em meio 2YT.



Peso molecular (PM); Alíquota coletada antes da indução (NI); Alíquota pós-indução (I); Alíquota pós-sonicação (S); Pellet (P); Sobrenadante (SB).

Figura 13 – Membrana de nitrocelulose contendo as frações protéicas bacterianas. *Immunoblotting* com anticorpo anti-His do ensaio de indução de células *E.coli* BL21(DE3) transformada com o clone 1 e 2 de pET-scFvST em meio 2YT.



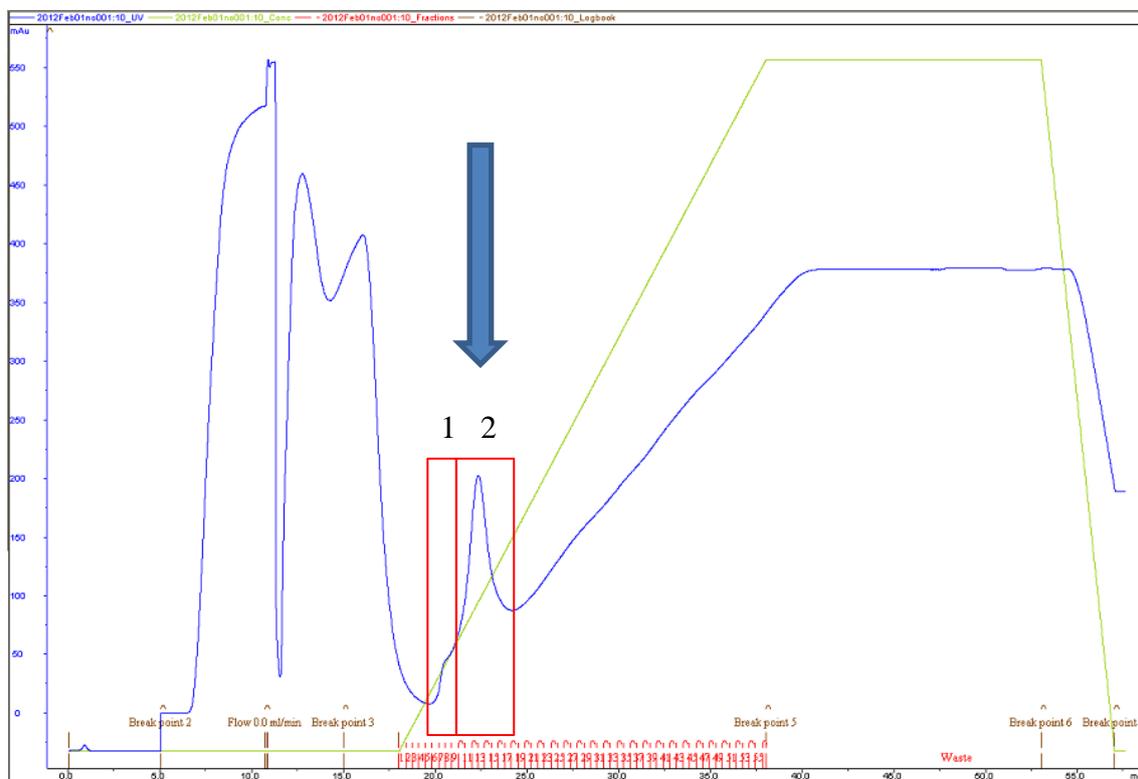
Peso molecular (PM); Alíquota coletada antes da indução (NI); Alíquota pós-indução (I); Alíquota pós-lise (S); *Pellet* (P); Sobrenadante (SB).

4.3.1 Purificação do scFvST por cromatografia de afinidade a Níquel em FPLC

O sobrenadante do sonicado bacteriano foi submetido a cromatografia de afinidade a níquel, devido a presença da cauda de histidina sintetizada juntamente com o anticorpo.

No gráfico a seguir podemos observar o perfil cromatográfico da purificação do scFvST, sendo que a flecha indica o pico de eluição do scFv. Este pico foi dividido em duas frações, as quais foram analisadas separadamente.

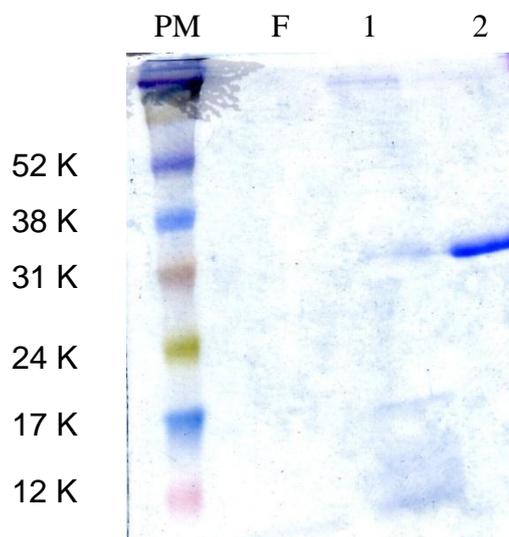
Gráfico 1 - Perfil cromatográfico da purificação do scFvST em coluna de Níquel-Sepharose em AKTAPrime Plus.



A seta destaca o pico de eluição da proteína com uma solução de 500mM imidazol; os retângulos destacam as duas frações coletadas.

Após a purificação, as duas frações coletadas e o flow foram submetidas a SDS-PAGE, para verificação das massas moleculares relativas. A **figura 14** mostra o perfil eletroforético deste experimento. O componente de massa molecular relativa de 35 kDa correspondente ao scFvST pode ser observado em ambas as frações.

Figura 14 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* das amostras coletadas no AKTA após cromatografia do scFvST.

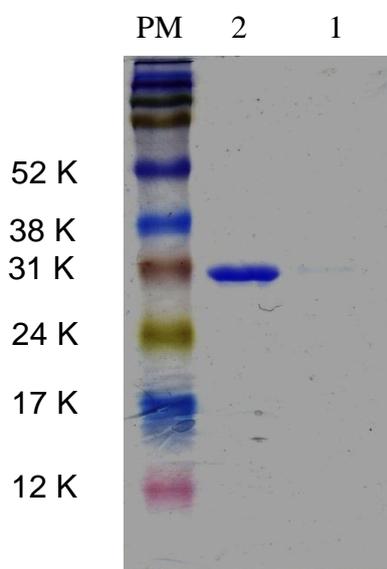


Peso Molecular (PM), *Flow* (F), fração 1 (1), fração 2 (2).

4.3.2 Renaturação do anticorpo recombinante scFvST

Após o processo de renaturação por diálise em diversas concentrações de ureia, um gel de poliacrilamida foi realizado. Não houve qualquer alteração na massa molecular relativa da proteína purificada pós-renaturação (**Figura 15**).

Figura 15 – Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida-SDS a 12% corado com *Coomassie Blue R-250* das amostras coletadas no AKTA do experimento de cromatografia do scFvST pós-renaturação.



Peso Molecular (PM), fração 1 pós-renaturação (1), fração 2 pós-renaturação (2).

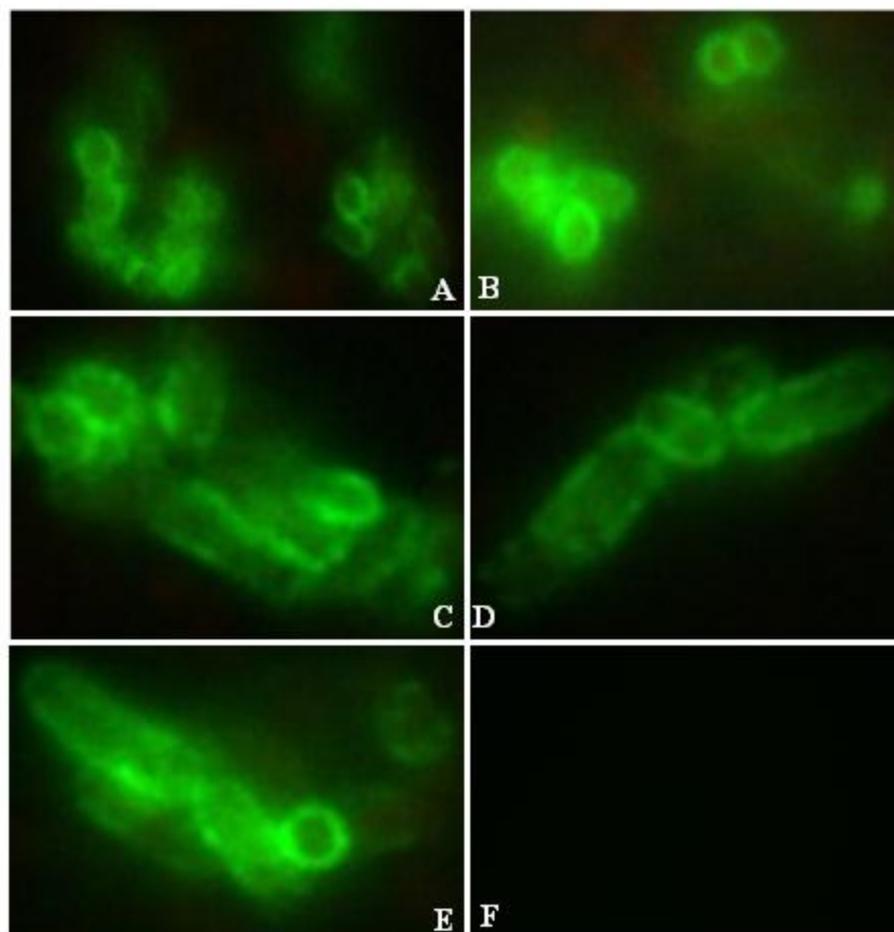
Após o processo de renaturação, a proteína foi dosada utilizando o kit *Micro BCA Protein Assay* (Thermo Scientific – EUA) sendo utilizada como padrão uma curva de BSA, cujo o R^2 foi igual a 0,996. A amostra apresentou uma concentração de 381 $\mu\text{g/mL}$ aproximadamente.

4.4 Ensaios Funcionais do scFv

4.4.1 Imunofluorescência

Para avaliar a reatividade do scFvST foram realizados diversos ensaios de imunofluorescência. Os resultados obtidos podem ser observados na **figura 16**. Os isolados bacterianos foram permeabilizados com Triton X-100 permitindo a exposição da toxina ST pré-secretada endógena. Esta foi marcada com os anticorpos scFvST, anti-His e anti-IgG FITC.

Figura 16 - Reatividade do scFvST pelo ensaio de imunofluorescência.



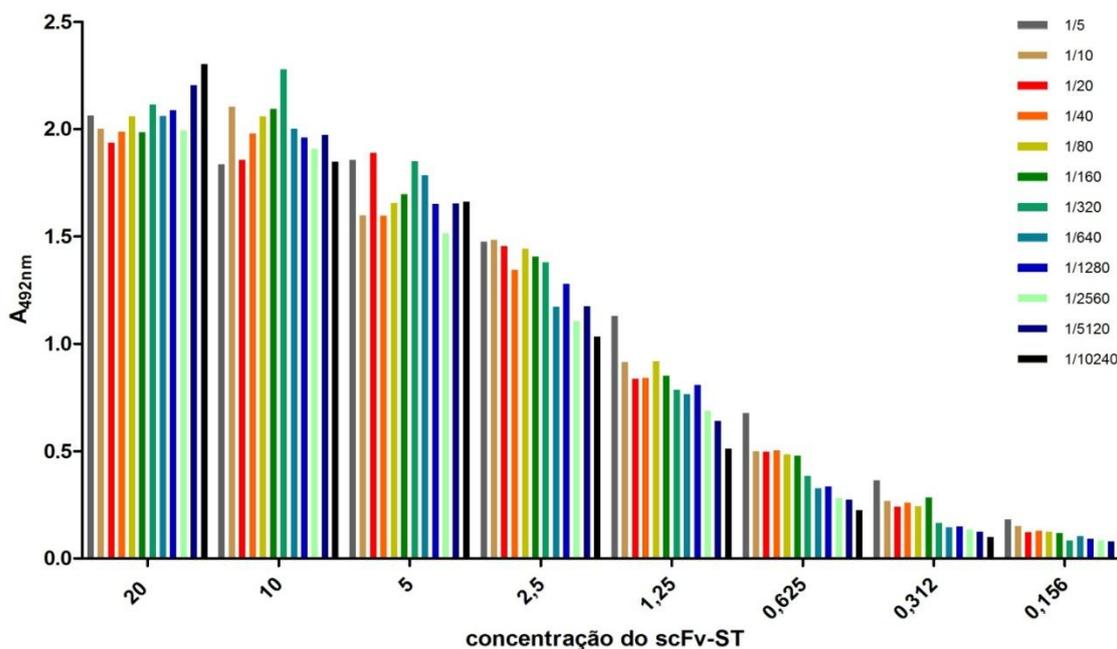
Isolados de 3321-4 (ETEC) e E2348/68 permeabilizados e incubados com scFv, anticorpo anti-His e anticorpo conjugado a FITC. A, B, C, D e E: 3321-4. F: E2348/68 (controle negativo).

4.4.2 Padronização do teste ELISA utilizando os fragmentos de anticorpos scFvST

Após a confirmação da funcionalidade do scFvST por imunofluorescência indireta, testou-se em outros ensaios imunossorológicos. Como não sabíamos qual a melhor concentração do antígeno (extrato de ST), optou-se por uma titulação em bloco variando-se as concentrações do scFvST e do antígeno (gráfico 2).

Os resultados dessa titulação foram extremamente úteis pois através dela definiu-se as concentrações de 5 µg/mL e de 2,5 µg/mL do anticorpo recombinante para os experimentos seguintes.

Gráfico 2 - Reatividade do scFv anti-ST a toxina ST. Ensaio de ELISA com a placa sensibilizada com diversas diluições do lisado de ST tratado, seguido de incubação com o scFv em concentrações decrescentes, do anticorpo anti-His, e do conjugado peroxidase.



4.4.3 ELISA dos isolados de ETEC produtores de ST

Cada um dos isolados de ETEC produtores de ST foram cultivados e os sobrenadantes foram testados por ELISA utilizando as condições apresentadas no teste de padronização, visto no gráfico 2. Os resultados deste experimento podem ser observados nos gráficos 3 e 4.

Gráfico 3 - Reatividade do scFv anti-ST a toxina ST de diversos isolados de ETEC. Ensaio de ELISA com a placa sensibilizada com os sobrenadantes dos isolados, seguido de incubação com o scFv na concentração de 2,5 µg/mL, outra do anticorpo anti-His, e por fim do conjugado peroxidase. Como controle positivo, foi utilizado o monoclonal anti-ST em substituição ao scFv.

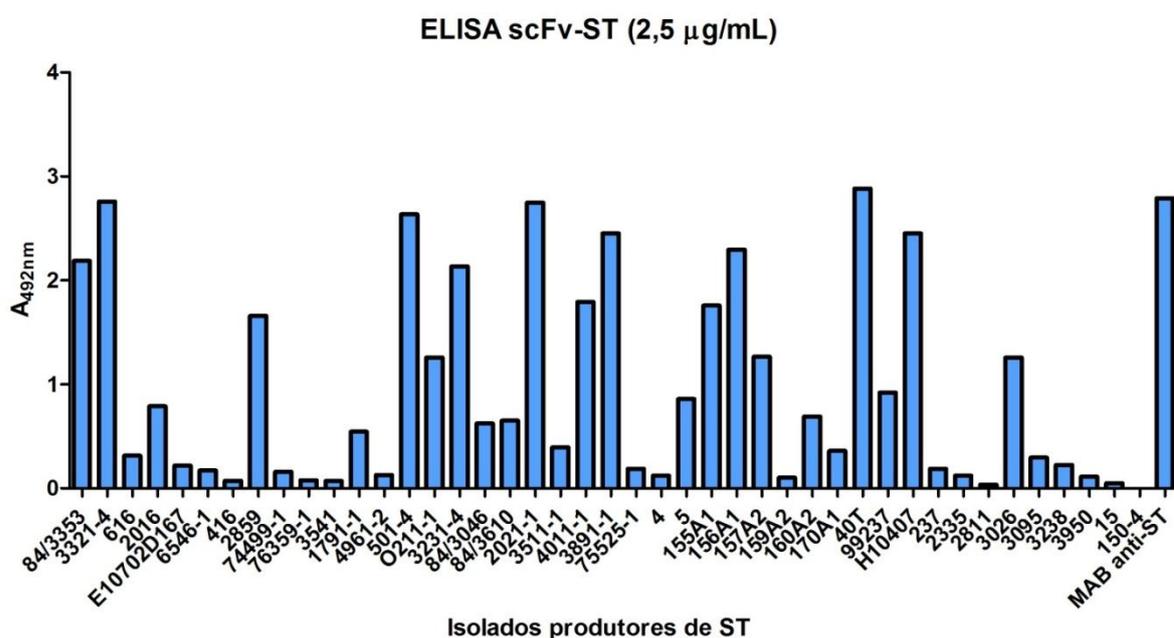
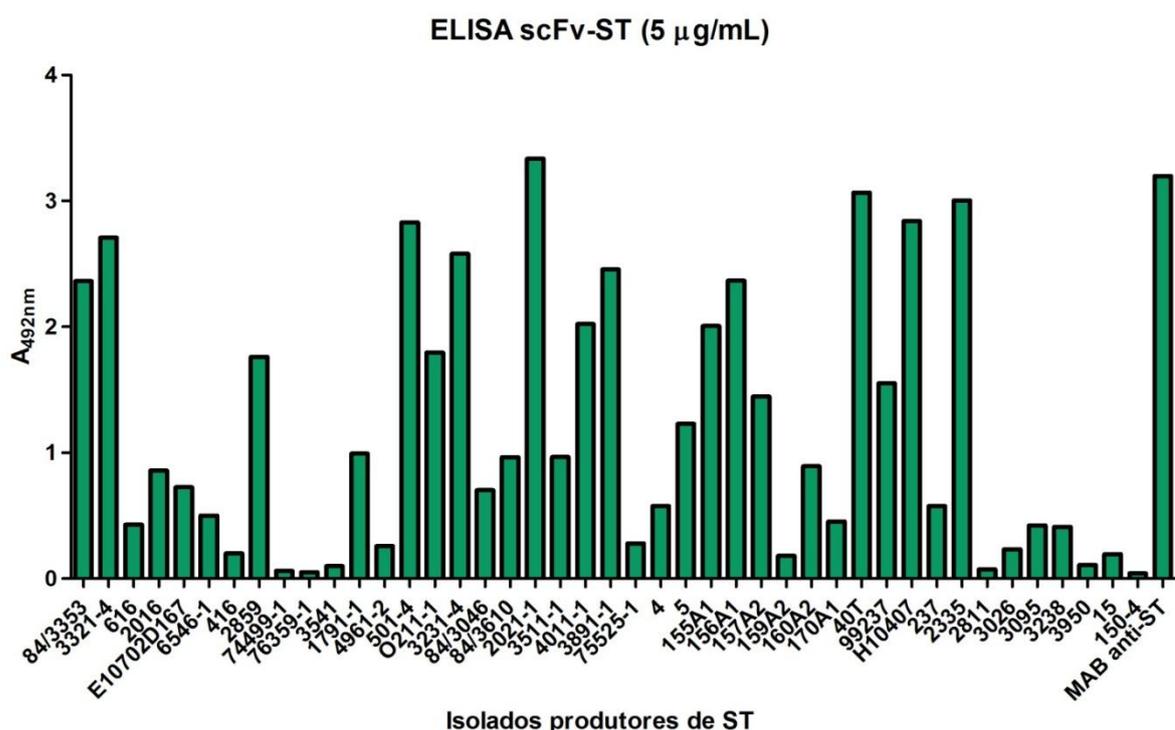


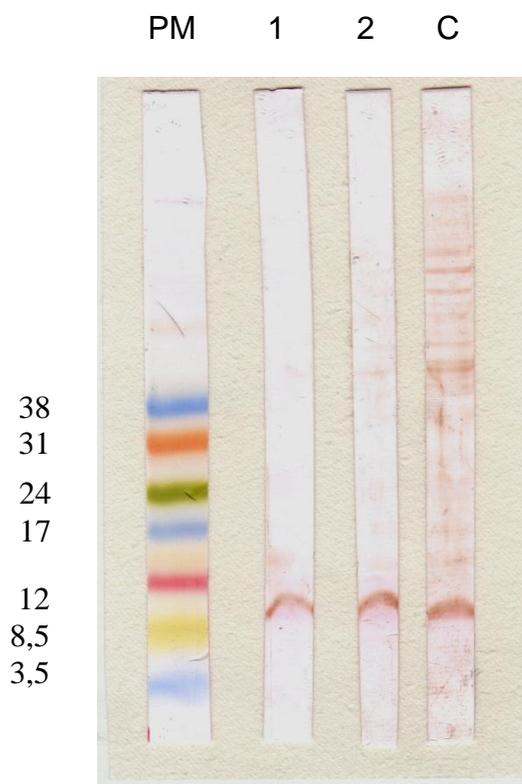
Gráfico 4 - Reatividade do scFv anti-ST a toxina ST de diversos isolados de ETEC. Ensaio de ELISA com a placa sensibilizada com os sobrenadantes dos isolados, seguido de incubação com o scFv na concentração de 5 µg/mL, outra do anticorpo anti-His, e por fim do conjugado peroxidase. Como controle positivo, foi utilizado o monoclonal anti-ST em substituição ao scFv.



4.4.4. Immunoblotting

Para comprovação das especificidade do scFvST, um *immunoblotting* foi realizado. Na **figura 17**, pode ser observada a reatividade do scFvST com a toxina ST na forma de pré-pro-peptídeo de massa molecular relativa de 9.

Figura 17 - Membrana de nitrocelulose contendo o lisado de 3321-4 tratado. *Immunoblotting* com scFvST, anticorpo anti-His, e anti-IgG peroxidase.



PM: Peso molecula, 1: scFv na concentração de 15 µg/mL, 2: scFv na concentração de 30 µg/mL, C: controle positivo (monoclonal anti-ST na concentração de 30 µg/mL).5.

4 DISCUSSÃO

Os experimentos realizados visaram a clonagem, expressão, purificação e análise da reatividade dos anticorpos recombinantes (scFv) contra a toxina termoestável ST de ETEC.

Para a obtenção dos anticorpos recombinantes (scFv), foi utilizado o gene sintético como molde para amplificação com iniciadores específicos desenhados, a amplificação do fragmento do gene que corresponde ao anticorpo recombinante entre 850 pb e 650 pb, tendo este 762 pb. Além disso foi adicionado o sítios de BamHI e XhoI para auxiliar a ligação tanto no vetor pET28a como para o pSMT3.

A construção utilizada foi em plasmídeo pET28a, pelo fato do plasmídeo pSMT3 ser de baixa cópia, sendo pouco reproduzível nos ensaios iniciais. Esta construção foi um sucesso, pelas análises de restrição realizada com as enzimas citadas acima, podemos observar a liberação do fragmento correspondente ao anticorpo recombinante.

Quanto à expressão, o protocolo de indução utilizando o meio 2YT foi considerado eficiente, pois este propiciou melhores condições para que as bactérias produzissem maior concentração de anticorpo, uma vez que não interferiu na solubilidade do anticorpo, já que mesmo no meio LB, a proteína recombinante foi encontrada principalmente na fração do sedimento.

Na fração não induzida ocorre uma expressão basal da proteína, mas no entanto pode ser verificado um aumento significativo com o tempo de incubação de 4 horas na presença de IPTG a 37 °C. Os ensaios de *immunoblotting* confirmam a presença da proteína expressa, além disso, a acessibilidade da cauda de histidina facilitou a purificação da proteína por cromatografia de afinidade com níquel (IMAC) na presença de ureia, seguida pela etapa de renaturação, para garantir a funcionalidade do anticorpo.

O protocolo de renaturação utilizado, se apresentou eficiente para o scFvST, pois o anticorpo apresenta bastante estabilidade a 4 °C, além de não apresentar alteração na massa molecular relativa após o tratamento com altas concentrações

de ureia. Além disso, o anticorpo apresentou uma boa reatividade em testes imunossorológicos.

Podemos observar que baixas concentrações do scFvST são necessárias para altas de absorvâncias a 492 nm, sendo as concentrações de 2,5 µg/mL e 5 µg/mL as escolhidas para serem utilizadas nos testes posteriores, pelo fato de apresentarem um perfil de alta leitura mas sem apresentar densidades óticas em saturação para diferentes concentrações de ST.

O teste de ELISA para os isolados de ETEC produtores de ST foi realizado para verificar a reatividade do scFvST para as toxinas produzidas. Os resultados demonstram que o anticorpo recombinante é positivo para um grande espectro de isolados, embora seja difícil de inferir a concentração de toxina secretada por estes. Aos isolados cujos resultados foram negativos no teste sugere-se que estes tenham perdido a capacidade de expressão da toxina ST.

O scFvST foi utilizado no *immunoblotting* onde o componente correspondente a ST foi revelado, mostrando a especificidade. O controle utilizado foi o monoclonal anti-ST produzido pelo hibridoma do qual a sequência do fragmento foi extraída. A respeito da massa molecular relativa da toxina ST apresentada nos géis de SDS e no *immunoblotting*, podemos verificar que esta é maior que 2 kDa como é descrito pela literatura. Isto se deve ao fato que se trata de uma toxina imatura, ou seja, ainda não sofreu o processamento. No protocolo empregado, as bactérias são lisadas, liberando assim as toxinas pré-secretadas. Segundo Taxt et al., 2010, a toxina ST é codificada por um plasmídeo transmissível e é expressa com 72 aminoácidos, dentre eles existe uma sequência de peptídeo sinal a qual permite que a proteína seja exportada por um sistema sec e se diferencia da sua forma precursora por processamento.

Outras construções podem ser realizadas na tentativa de produzir um anticorpo solúvel, o que viabilizaria a produção deste em termos de custo, praticidade e rapidez. Além disso, técnicas de mutagênese sítio-dirigida podem ajudar a aumentar a afinidade deste anticorpo.

Por fim, os resultados mostram que este anticorpo recombinante pode ser uma ferramenta promissora para ser utilizada na elaboração de kits diagnósticos.

5 CONCLUSÃO

O fragmento de anticorpo (scFv) foi produzido em sistema de expressão em bactérias (*E.coli*) e o protocolo de renaturação empregado possibilitou que a molécula se tornasse funcional como o verificado em ensaios imunossorológicos. Além disso, este anticorpo conseguiu reconhecer um espectro grande de toxinas ST produzidas por diferentes isolados de ETEC, o que indica que este pode ser uma ferramenta promissora para o diagnóstico de ETEC produtoras da toxina ST.

REFERÊNCIAS¹

- ABU-ELYAZEED, R. et al. Epidemiology of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea in a Pediatric Cohort in a Periurban Area of Lower Egypt. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 382-389, 1999.
- BEAUSOLEIL, H. E.; LABRIE, V.; DUBREUIL, J. D. Trypan blue uptake by chinese hamster ovary cultured epithelial cells: a cellular model to study *Escherichia coli* STb enterotoxin. **Toxicon**, v. 40, p. 185-191, 2002.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, n. 6, p. 1513-1523, 1979.
- BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 839-844, 2007.
- 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.
- CHAPMAN, P. A.; DALY, C. M. Evaluation of non-radioactive trivalent DNA probe (LT, ST1a, ST1b) for detecting enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Pathol.**, v.46, p. 309-312, 1993.
- CRYAN, B. Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, p. 792-794, 1990.
- EDWARDS, P. R. **Identification of Enterobacteriaceae**. 4. ed. New York: Elsevier. Scientific Publishing Co., 1986.
- ELLIOT, S. J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Vet. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 196-206, 1995.
- FLECKENSTEIN, J. M.; HARDWIDGE, P. R.; MUNSON, G. P.; RASKO, D. A.; SOMMERFELT, H.; STEINSLAND, H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes Infect.**, v. 12, n. 2, p. 89-98, 2010.
- 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.
- GIANNELLA R. A.; DRAKE, K. L.; LUTTRELL, M. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Infec. Immun.**, v. 33, p. 186-192, 1981.

¹ De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

GIANNELLA, R. A. Escherichia coli heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do?. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 125, n. 2, p. 173-181, 1995.

GIVOL, D. The minimal antigen-binding fragment of antibodies-Fv fragment. **Mol. Immunol.**, v. 28, p. 1379-1385, 1991.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 77-87, 2009.

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.

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

HARLOW, E.D.; LANE, D. **Antibody a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. v. 726.

HERNANDES, R. T.; ELIAS, W. P.; VIEIRA, W.; GOMES, T. A. Na overview of atypical enteropathogenic Escherichia coli. v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 9, p. 1126-1136, 2005.

HONDA, T.; ARITA, M.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Further evaluation of the Biken test (modified Elek test) for detection of enterotoxigenic Escherichia coli producing heat-labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat-stable enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 60-62, 1981.

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.**, v. 85, p. 5879-5883, 1988.

ITO, T.; KUWAHARA, S.; YOKOTA, T. Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v.17, p. 7-12,1983.

JOOSTEN, V. et al. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. **Microbial Cell Factories**, v. 2, n. 1, 2003.

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

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

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KORTT, A. A. et al. Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. **Protein Eng.**, v. 10, n. 4, p. 423-433, 1997.

KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.

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

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

LEVINE, M. M. et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiol. Rev.**, v. 47, p. 510-550, 1983.

MENEZES, C. A. **Anticorpos monoclonais para detecção de amostras de Escherichia coli produtoras de ST-I e LT-I**. 2002, 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

MENEZES, C. A.; IMAMURA, S. Y.; TRABULSI, L. R.; FERNANDES-FILHO, A.; MARTINEZ, M. B.; GUTH, B. E.; GIRÃO, D. M.; PIAZZA, R. M. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 875-880, 2006.

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, p. 331-341. 2001.

MORENO, A. C.; FILHO, A. F.; GOMES, T. DO A.; RAMOS, S. T.; MONTEMOR, L. P.; TAVARES, V. C.; FILHO, L. DOS S.; IRINO, K.; MARTINEZ, M. B. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2008.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology**. 7th ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2008.

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

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V.; VIAL, P.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis.**, v. 6, p. 829-831, 1987.

PONTECORVO, G. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment. **Somat. Cell Genet.**, v. 1, n. 10, p. 397-400, 1975.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

RASHEED, J. K.; GUZMAN-VERSEZCO, L. M.; KUPERSZTOCH, Y. M. Two precursors of the heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: evidence of extracellular processing. **Mol. Microbiol.**, v. 4, p. 265-273, 1990.

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.

SACK, D. A.; HUDA, S.; NEOGL, P. K. B.; DANIEL, R. R.; SPIRA, W. M. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for vibrio and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxins. **J. Clin. Microbiol.**, v. 11, p. 35-40, 1980.

SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, n. 3, p. 779-815, 1993.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.

SAVARINO, S. J.; MCVEIGH, A.; WATSON, J.; CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; ECHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M.; FASANO A. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 173, n. 4, p. 1019-1022, 1996.

SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SCOTLAND, S. M.; RICHMOND, J. E.; ROWE, B. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) to HEp-2 cells is not dependent on the presence of fimbriae. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 20, p. 191-195, 1983.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, n. 60, p. 167-315, 1996.

SO, M.; MCCARTHY, B. J. Nucleotide sequence of transposon Tn1681 encoding a heat-stable toxin (ST) and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)**, v. 77, p. 4011-4015, 1980.

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

SVENNERHOLM, A. M.; HOLMGREN, J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA). **Current Microbiol.**, v. 1, p. 19-23, 1978.

SVENNERHOLM, A. M.; WIKLUND, G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p.596-600, 1983.

TAXT, A.; AASLAND, R.; SOMMERFELT, H.; NATARO, J.; PUNTERVOLL, P. Heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* as a vaccine target. **Infect. Immun.**, n. 78, n. 5, p. 1824-1831, 2010.

THOMPSON, M. R.; GIANNELLA, R. A. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 47, p. 834-836, 1985.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 1, p. 18-29, 2005.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Pro. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

TRABULSI, L. R.; FERNANDES, M. R.; ZULIANI, M. E. New intestinal bacteria pathogenic to man. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 9, n. 1, p. 31-39, 1967.

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

WARK, K. L.; HUDSON, P. J. Latest technologies for the enhancement of antibody affinity. p. 657-670, 2006.

WENNERAS, C.; QADRI, F.; BARDHAN, P.; SACK, R. B.; SVENNERHOLM, A. M. Intestinal responses in patients infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccinees. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 6234-6241, 1999.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Relevé épidémiologique hebdomadaire. **Weekly epidemiological record**, v. 81, p. 97-104, 2006.

YAMAMOTO, T; ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infect. Immun.**, v. 64, n. 4, p. 1441-1445, 1996.

YOLKEN, R. H.; GREENBERG, H. B.; MERSON, M. H.; SACK, R. B.; KAPIKIAN, A. Z. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 439-444, 1977.

ZDANOV, A. et al. Structure of a single-chain antibody variable domain (Fv) fragment complexed with a carbohydrate antigen at 1.7-Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 14, p. 6423-6427, 1994.