

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

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*.

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 patotipos 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).

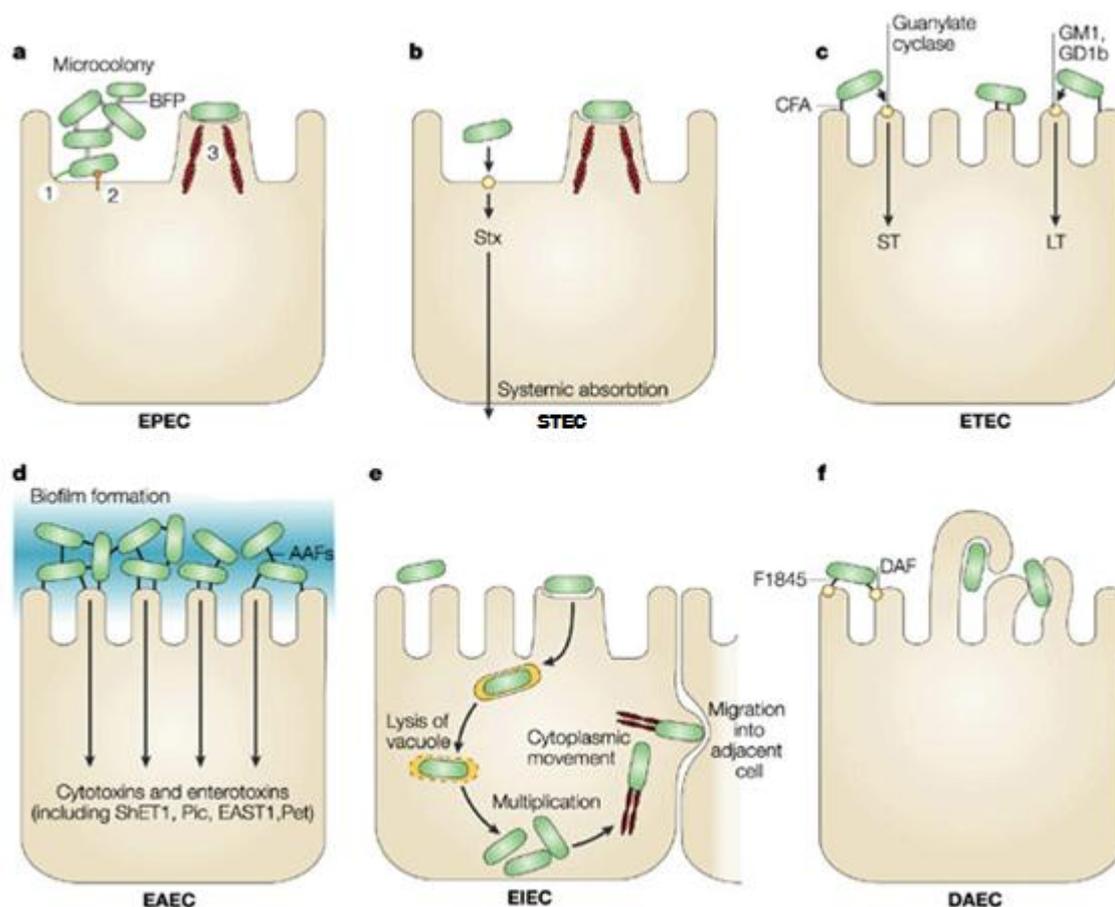
DAEC é a categoria de *E. coli* diarreiogênica que apresenta um padrão de adesão difusa em células epiteliais em cultura (ELLIOTT; NATARO, 1995). Além de causar várias infecções entéricas, como diarreia em crianças, também estão relacionadas com infecções no trato urinário (pielonefrite, cistite e bacteriúria 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)

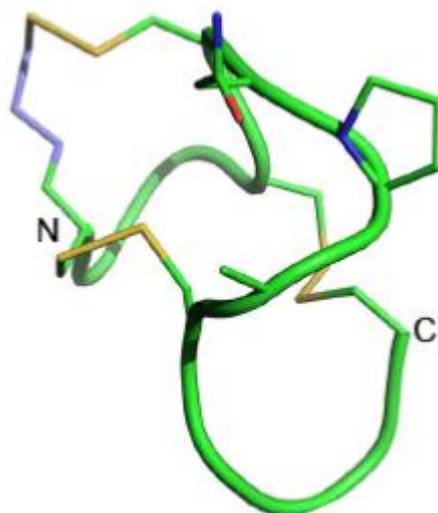
Devido à similaridade com a toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae*, a enterotoxina termolábil (LT) pode ser considerada o fator de virulência de ETEC melhor caracterizado.

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”.



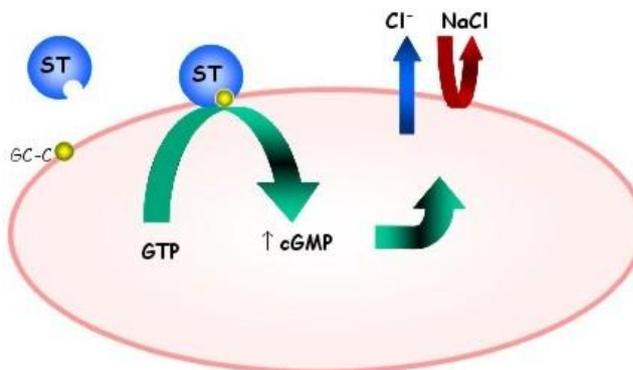
FONTE: Taxt et. al., 2010

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.

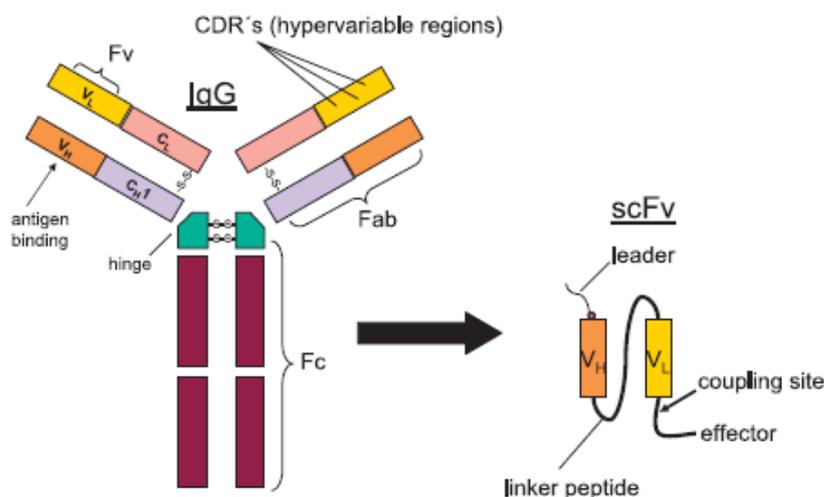
1.8 Anticorpos recombinantes

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.

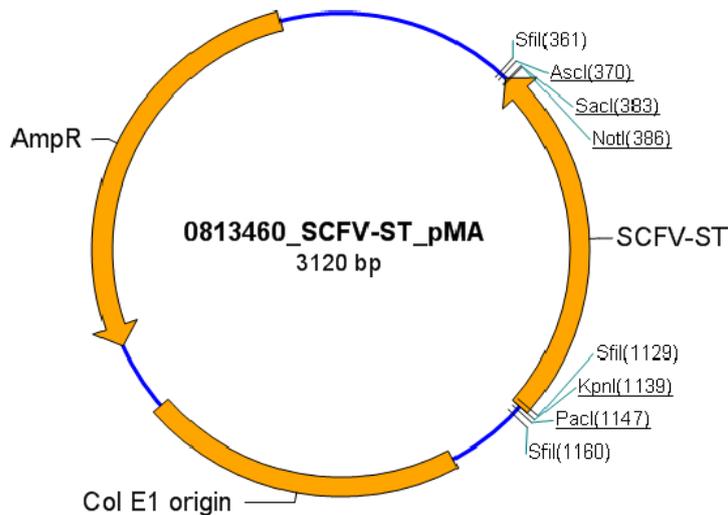
Dentre as bactérias utilizadas como sistema de expressão, a *Escherichia coli* tem sido amplamente utilizada para expressão de proteínas recombinantes, devido a facilidade de seu manuseio, baixo custo e rápido crescimento. Diversos trabalhos têm descrito alto rendimento da expressão de fragmentos de 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
GACGGCCTTCGCCA

2 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. **Infect. 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.