GABRIELLE RIBEIRO DE ANDRADE

**RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR UMA VACINA CONJUGADA CONTRA
Escherichia coli DIARREIOGÊNICAS PERTENCENTES AO SOROGRUPO O111**

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

GABRIELLE RIBEIRO DE ANDRADE

**RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR UMA VACINA CONJUGADA CONTRA
Escherichia coli DIARREIOGÊNICAS PERTENCENTES AO SOROGRUPO O111**

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

Orientadora: Dra. Marta de Oliveira Domingos

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

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

Andrade, Gabrielle Ribeiro de.

Resposta imune induzida por uma vacina conjugada contra
Escherichia coli diarreiogênicas pertencentes ao sorogrupo O111 /
Gabrielle Ribeiro de Andrade. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Marta de Oliveira Domingos.

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: Conjugação de polissacarídeo O111
e sua avaliação.

Versão do título para o inglês: Immune responses induced by a
conjugate vaccine against diarrheagenic *Escherichia coli* belonging to
serogroup O111.

1. *E. coli* 2. Polissacarídeo O111 3. Diarreia 4. Vacina conjugada
I. Domingos, Profa. Dra. Marta de Oliveira II. Universidade de São
Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0157/2013

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

Candidato(a): Gabrielle Ribeiro de Andrade.

Título da Dissertação: Resposta imune induzida por uma vacina conjugada contra
Escherichia coli diarreiogênicas pertencentes ao sorogrupo
O111.

Orientador(a): Profa. Dra. Marta de Oliveira Domingos.

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) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da resposta imune induzida pela vacina conjugada O111-LTB contra *Escherichia coli* diarreio gênicas pertencentes ao sorogrupo O111", protocolo nº 663/09, sob a responsabilidade de Marta de Oliveira Domingos e Gabrielle Ribeiro de Andrade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 08/09/2009.

"We certify that the Research entitled "Evaluation of immune response induced by the conjugated vaccine against O111-LTB diarrheagenic *Escherichia coli* belonging to serogroup O111", protocol nº 663/09, under the responsibility of Marta de Oliveira Domingos and Gabrielle Ribeiro de Andrade, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/08/2009".

Vigência do Projeto: 09/2009 – 09/2010	Nº de animais/espécie
	80 / camundongo – Balb/C/Fêmea
	02 / coelho –NZW/Macho

São Paulo, 11 de setembro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

Aos meus pais, Adilis e Demetrio e
minhas irmãs Natalia e Francine por
todo apoio, amor, carinho, incentivo e
dedicação.
Muito obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me abençoado e permitido a realização deste trabalho.

À minha orientadora Dra. Marta de Oliveira Domingos por toda dedicação, paciência, carinho, respeito, por me orientar cientificamente e também nas ciências da vida. Obrigada hoje e sempre!!! Com certeza você mudou a minha vida!

Ao Dr. Osvaldo Sant'Anna por toda colaboração, incentivo, auxílio, carinho.

À Dra. Roxane por ter acreditado e confiado no nosso trabalho e estar sempre disposta a nos ajudar.

À Dra. Denise por todo incentivo, conselhos, e auxílio na correção de algumas etapas do trabalho.

Ao Dr. Roger New por sempre estar disposto a me auxiliar, pela colaboração no processo de conjugação.

Aos pesquisadores do Lab. De Bacteriologia por toda ajuda, conselhos e incentivo Dr. Waldir, Dra. Martha Sonobe, Dra. Márcia Franzolin, Dra. Monamaris, Dra. Rita, Dra. Patrícia, Dra. Cecília, Dra. Angela.

À Dra. Kátia Bárbaro pelas colaborações, conselhos, auxílios e incentivo.

À Keyde pela grande amizade, disposição para sempre me ajudar, aconselhar, ensinar e me escutar. Muito obrigada!

À Chris pela amizade, orientações, conselhos e carinho. Muito obrigada!

À Model por todo companheirismo, ajuda, conselhos, amizade, carinho, incentivo. Muito obrigada!

À Marina e Rosely por todo carinho, ajuda, conselhos, companheirismo, e além de colegas de trabalho se tornaram minhas grandes amigas. Muito obrigada!

Ao trio: Márcio, Renato e Diego por todas risadas, conselhos, apoio, carinho e incentivo.

Aos amigos que ganhei durante esta etapa da minha vida, que sempre me apoiaram, escutaram, ajudaram: Silvia, Ana Cláudia, Rafael, Raphael, Tiago, Bruna,

Rosely, Juvenilia, Andressa, Nati, Dani Luz, Dani Munhoz, Caio, Bruno, Roberto, Livia, Luciano, Tatiane, Tatiane Nascimento, Letícia, Raquel, Cris Souza, Anderson, Fernando, Luciana, Karina, Bianca, Louise, Podé, Giulia, Marcela, Thaís, Matilde, Demetria, Claudia.

Ao Edson que sempre com muito carinho e dedicação, cuidou e me auxiliou na manipulação dos animais.

Aos funcionários do laboratório: Dona Maria, Dona Seba, Regina, Gerson, Chiquinho, Jucelino, Juliana, Marco, Suzana, Luiza, Nadja, Sr. Tersio, Reginaldo, Eliana.

Ao Dr. Daniel Pimenta e seu aluno Hugo pela colaboração com os experimentos de cromatografia.

Aos irmãos que a vida me deu, Michel e Juliano, minhas grandes amigas Taty, Dani e Gisela, e meus amigos de faculdade. Muito obrigada por sempre estarem ao meu lado.

A toda minha família (avós, avôs, tios, tias, primos, primas e padrinhos) por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida, com amor, respeito, conselhos e união.

Ao meu marido Helio por sempre me incentivar, apoiar, ter paciência e estar ao meu lado desde o início desta etapa. À minha segunda família (Lira, Deolindo, Danilo e Carol, por todo carinho, apoio e incentivo.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia.

À minha chefe Dra. Darci pela oportunidade e incentivo.

Aos meus novos colegas de trabalho do Laboratório Especial de Coleções Zoológicas do Instituto Butantan.

Ao apoio financeiro do CNPQ.

Ao apoio financeiro do Laboratório Cristália.

Ao apoio financeiro da Companhia Proxima Concepts.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

Muito obrigada!!!

“Determinação coragem e
autoconfiança são fatores decisivos
para o sucesso.

Se estamos possuídos por uma
inabalável determinação
conseguiremos superá-los.

Independentemente das
circunstâncias, devemos ser sempre
humildes, recatados e despidos de
orgulho”.

Dalai Lama

RESUMO

ANDRADE, G. R. **Resposta imune induzida por uma vacina conjugada contra *Escherichia coli* diarreiogênicas pertencentes ao sorogrupo O111.** 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

E. coli pertencentes ao sorogrupo O111 incluem bactérias que possuem diferentes mecanismos de virulência entre si que são responsáveis por gastroenterites, surtos de diarreia com sangue e síndrome hemolítico-urêmica em países desenvolvidos. Por causa da sua variabilidade fenotípica, uma vacina contra estes patógenos deve ter como alvo um antígeno comum a todos eles, como a molécula de LPS que demonstrou ser em resultados anteriores um excelente candidato a antígeno. No entanto, devido à sua toxicidade, sua utilização em humanos é proibida. Para solucionar este problema, o LPS O111 detoxificado foi conjugado ao citocromo c ou a molécula recombinante EtxB como proteínas carreadoras. O conjugado O111-citocromo foi incorporado em sílica SBA-15 como adjuvante e administrado pela via subcutânea em coelhos, enquanto que o conjugado O111- EtxB foi incorporado em Vaxcine™ (veículo oral à base de óleo) e administrado em camundongos por gavagem. Os resultados mostraram que na presença de nanopartículas de sílica SBA-15, o conjugado O111-citocromo c gerou anticorpos em coelhos até um ano após a imunização. Tais anticorpos foram capazes de reconhecer e inibir a adesão a células epiteliais humanas de todas as categorias de *E. coli* O111, mas não de bactérias pertencentes a um sorogrupo não relacionado. Além disso, o título dos anticorpos foi comparável aos obtidos pela imunização com a bactéria formalinizada ou o extrato bruto de LPS. Os camundongos imunizados por via oral com o conjugado O111-EtxB incorporado em Vaxcine™ foram capazes de gerar resposta imune sistêmica e de mucosa contra todas as categorias de *E. coli* O111. Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho, indicam que uma vacina conjugada oral que tenha como alvo o antígeno O111 tem o potencial de prevenir diarreia causada por cepas de *E. coli* O111, independente do mecanismo de virulência das mesmas..

Palavras-chave: *E. coli*. Polissacarídeo O111. Diarreia. Vacina conjugada.

ABSTRACT

ANDRADE, G. R. **Immune response induced by a conjugated vaccine against diarrheagenic *Escherichia coli* belonging to serogroup O111**. 2013. 75 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The *E. coli* O111 serogroup includes strains with different virulence factors that are responsible for enteritis throughout the world, and for outbreaks of blood diarrhea and hemolytic uremic syndrome in developed countries. Because of their phenotypic variability, a vaccine against these strains has to target an antigen that is common to all of them, and previous results have shown that LPS is such a candidate. However, because of its toxicity, its use in humans is forbidden. To overcome this problem, O111 LPS was detoxified, and then conjugated either to cytochrome c or EtxB as carrier protein. The O111- cytochrome c conjugate was incorporated in silica SBA-15 nanoparticles and administered subcutaneously in rabbits, while the O111-EtxB conjugate was incorporated in Vaxcine™, an oil-based oral delivery system, and administered to mice by gavage. The results show that in the presence of SBA-15 nanoparticles, the O111-cytochrome c conjugate was able to generate antibodies in rabbits, one year after immunization, which could recognize, aggregate and inhibit the adhesion to human epithelial cells of all categories of O111 *E. coli*, but not an unrelated serogroup. In addition, the titre of these antibodies was comparable to those generate by immunization with whole formalinized bacteria or crude LPS extract. Mice immunized orally with O111-EtxB conjugate incorporated in Vaxcine™ generated systemic and mucosal antibody responses against all categories of O111 *E. coli*. In summary, the results presented in this work indicate that an oral conjugated vaccine that targets the O111 antigen has the potencial to prevent diarrhea by O111 *E. coli* strains, regardless their mechanism of virulence.

Keywords: *E. coli*. Polysaccharide O111. Diarrhea. Conjugated vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Lesão <i>attaching and effacing</i> causada por EPEC.....	22
Figura 2- Mecanismo de patogenicidade de EPEC.....	23
Figura 3- Mecanismo de ação das toxinas de shiga.....	25
Figura 4- Mecanismo de patogenicidade de ETEC.....	26
Figura 5- Mecanismo de patogenicidade de EAEC.....	28
Figura 6- Mecanismo de patogenicidade de EIEC.....	29
Figura 7- Mecanismo de cooperação entre linfócitos T e B em uma vacina conjugada.....	33
Figura 8- Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15.....	34
Figura 9- Reconhecimento do conjugado O111-citocromo c por anticorpos contra o polissacarídeo O111.....	48
Figura 10- Análise do conjugado O111-citocromo c por cromatografia de exclusão molecular.....	49
Figura 11- Perfil eletroforético das amostras do conjugado BSA-Polissacarídeo O111 em gel de poliacrilamida.....	50
Figura 12- Reconhecimento do conjugado O111-EtxB por anticorpos contra o polissacarídeo O111.....	51
Figura 13- Análise do conjugado O111-EtxB por cromatografia de exclusão molecular.....	52
Figura 14- Resposta humoral de coelhos imunizados contra o antígeno O111 (seis meses).....	53
Figura 15- Resposta humoral de coelhos imunizados contra o antígeno O111 (um ano).....	54
Figura 16- Título do soro anti O111 com relação a diferentes amostras de <i>E.coli</i> diarreiogênicas pertencentes ao sorogrupo O111.....	55

Figura 17- Inibição da adesão de amostras de <i>E. coli</i> diarreiogênicas por soro de coelhos imunizados com conjugado O111-citrocomo c.....	56
Figura 18- Resposta imune humoral induzida pelo conjugado O111-citocromo c.	57
Figura 19- Resposta imune humoral induzida pelo conjugado O111-BSA após imunização oral em camundongos.....	58
Figura 20- Resposta imune sistêmica contra o polissacarídeo O111, após imunização oral.....	59
Figura 21- Resposta imune de mucosa contra o polissacarídeo O111, após imunização oral.....	60
Figura 22- Título do soro anti O111 com relação a diferentes amostras de <i>E. coli</i> diarreiogênicas pertencentes ao sorogrupo O111.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E- *attaching and effacing*

AA- Adesão agregativa

AD- Adesão difusa

ADH- *Adipic Acid Dihydrazide*

AL- Adesão localizada

ALL- Adesão localizada-like

AMPc- Monofosfato cíclico de adenosina

Bfp- *bundle forming pilus*

BSA- *Bovine Serum Albumin*

CT- Toxina da cólera

DAEC- *Escherichia coli* que apresentam padrão de adesão difuso em células epiteliais

DEC- *Escherichia coli* diarreio gênica

EAEC- *Escherichia coli* enteroagregativa

EAF- *EPEC adherence factor*

EIEC- *Escherichia coli* enteroinvasiva

EDAC- 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

ETEC- *Escherichia coli* enterotoxigênica

EHEC- *Escherichia coli* enterohemorrágica

E. coli- *Escherichia coli*

ELISA- Ensaio imunoenzimático de fase sólida

EtxB- Subunidade B da toxina termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC- *Escherichia coli* extra- intestinais

GM1- Monosialogangliosídeo

GMPc- Monofosfato cíclico de guanosina

HlyE- Hemolisina E

IgG- Imunoglobulina G

IgA- Imunoglobulina A

kDa- Quilodáltons

LEE- *Locus of enterocyte effacement*

LPS- Lipopolissacarídeo

LT- Toxina termolábil de ETEC

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

Pet- Toxina mediada por plasmídeos

Pic- proteína envolvida na colonização

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

ShET1- *Shigella enterotoxin 1*

SHU- Síndrome hemolítico-urêmica

SPATE- Serino- proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae*

SSTT- Sistema de Secreção do Tipo III

ST- Toxina termoestável de ETEC

STEC- *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

STx1- Toxina de Shiga 1

STx2- Toxina de Shiga 2

Tir- *Translocates intimin receptor*

UPEC- *Escherichia coli* uropatogênica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Diarreia: impacto socioeconômico	19
1.2 Agentes etiológicos responsáveis por diarreia	20
1.3 <i>Escherichia coli</i> diarreiogênicas	21
1.3.1 <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC)	21
1.3.2 <i>E. coli</i> produtoras da toxina de Shiga (STEC)	24
1.3.3 <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	25
1.3.4 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	27
1.3.5 <i>E. coli</i> enteroinvasora (EIEC)	28
1.3.6 <i>E. coli</i> com padrão de adesão difuso (DAEC)	29
1.4 Sorogrupo O111- epidemiologia	30
1.5 Resposta imune contra polissacarídeos- vacina conjugada	32
2 OBJETIVO	36
3 JUSTIFICATIVA	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Reagentes utilizados	38
4.2 Isolados Bacterianos	38
4.3 Linhagem celular	39
4.4 Animais	39
4.5 Formulação e avaliação dos conjugados	40
4.5.1 Conjugação do polissacarídeo O111 com a proteína citocromo c ou BSA	40
4.5.2 Conjugação do polissacarídeo O111 com a proteína EtxB	40
4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	41
4.5.4 <i>Immunoblotting</i> : conjugado O111- citocromo c e O111-EtxB	41
4.5.5 Quantificação de proteínas	41

4.6 Análise do perfil cromatográfico dos conjugados por Gel filtração	42
4.7 Imunização e avaliação da resposta imune	42
4.7.1 Bactérias utilizadas na imunização de coelhos	42
4.7.2 Obtenção do extrato de LPS bruto para imunização	42
4.7.3 Incorporação em sílica SBA-15	43
4.7.4 Incorporação em Vaxcine™	43
4.7.5 Imunização de coelhos	43
4.7.6 Imunização de camundongos com o conjugado O111-EtxB	44
4.7.7 Coleta de amostras de sangue e fezes	44
4.7.8 Teste de ELISA: avaliação dos soros de coelhos e camundongos	44
4.7.9 Teste de aglutinação em tubos: avaliação dos soros de coelhos e camundongos	45
4.7.10 Teste de adesão bacteriana a células HEP-2	45
4.7.11 Teste de inibição de adesão de <i>E.coli</i> diarreiogênicas O111 em células epiteliais humanas utilizando soro de coelho anti O111	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Conjugação do polissacarídeo a proteína carreadora	47
5.2 Análise do conjugado O111-citocromo c	47
5.3 Análise do conjugado O111-BSA	49
5.4 Conjugado O111-EtxB	50
5.5 Resposta imune humoral induzida pelo conjugado O111-citocromo c incorporado em sílica SBA-15	52
5.6 Resposta imune induzida em camundongos imunizados pela via oral	56
6 DISCUSSÃO	62
6.1 Conjugados O111-citocromo c e O111-BSA	62
6.2 Imunização oral	64
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

1.1 INTRODUÇÃO

1.2 Diarreia: impacto socioeconômico

Anualmente, 1,7 bilhões de casos de diarreia são relatados em todo o mundo, sendo o índice de mortalidade infantil entre eles muito elevado (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). A diarreia mata mais crianças do que a malária e a tuberculose, seis vezes mais que conflitos armados e cinco vezes mais que a AIDS, resultando em 800 mil óbitos por ano (UNICEF; WHO, 2009; WHO, 2013).

Apesar do saneamento básico poder reduzir significativamente os casos de diarreia, estudos epidemiológicos demonstraram que 2,5 bilhões de pessoas não têm acesso a esgotamento sanitário devido ao alto custo financeiro gerado para sua implantação, que é estimado em 10 bilhões de dólares anuais ao longo de duas décadas (PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO, 2006; UNICEF, 2012).

Com o intuito de solucionar o problema de saneamento no Brasil, foi estabelecido como uma das metas do projeto Milênio (série de metas socioeconômicas estabelecidas por países da ONU em 2000) proporcionar esgotamento sanitário a 68 % da população brasileira até 2015. No entanto, uma pesquisa solicitada pelo Ministério das Cidades apontou que, mantida a atual tendência, o Brasil dificilmente conseguirá atingir essa meta no prazo determinado. Segundo esse estudo, a probabilidade de que 141 milhões (68%) de brasileiros tenham acesso à rede de esgotos até 2015 é de apenas 30 % (PNUD, 2008).

Apesar disso, as melhorias efetuadas nas condições de saneamento básico, juntamente com outras medidas como: campanhas de aleitamento materno, reidratação oral e redução dos níveis de pobreza absoluta no país contribuíram para o gradual declínio do número anual de morte infantil por diarreia no país (VICTORA, 2009).

1.2 Agentes etiológicos responsáveis por diarreia

Os principais patógenos responsáveis por diarreia em âmbito global são: rotavírus, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* e *Shigella*. Alguns protozoários como *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Entamoeba histolytica* também podem causar diarreia, porém a incidência é menor que a induzida por bactérias e vírus (WHO, 2009). A frequência desses patógenos varia epidemiologicamente, sendo o rotavírus o agente etiológico mais isolado (CDC, 2011). No entanto, estudos realizados no Brasil, México e África do Sul demonstraram que *E. coli* é responsável por 30 a 40 % dos casos de diarreia infantil, sendo que em alguns lugares, suplantam em frequência nos demais agentes etiológicos, incluindo o rotavírus (NATARO; KAPER, 1998). *E.coli* diarreiogênicas também são os patógenos mais encontrados em episódios de diarreia do viajante, sendo responsáveis por até 60 % das ocorrências (WAGNER; WIEDERMANN, 2009).

Apesar do transtorno causado por algumas espécies de *E. coli*, a maior parte dessas bactérias fazem parte da microbiota intestinal normal do homem e de outros animais, onde mantém uma relação comensal de benefício mútuo com o hospedeiro (SANTOS et al., 2009). Todavia devido à presença de uma combinação muito bem sucedida de vários fatores de virulência, algumas linhagens tornaram-se patogênicas e, portanto, capazes de causar infecção em indivíduos sadios (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Devido a grande variabilidade genética e fenotípica encontrada em *E. coli* patogênicas, elas foram classificadas de acordo com o sítio de infecção em dois grupos: *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) e *E. coli* diarreiogênicas (DEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000). As ExPEC podem ser subdivididas da seguinte maneira: *E. coli* responsáveis por infecção urinária, denominadas de UPEC (*E. coli* uropatogênica), as que causam meningite, denominadas de MNEC (*E. coli* associada à meningite) e as causadoras de sepse, denominadas de SEPEC (*E. coli* associada à sepse) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As DEC, diferentemente das ExPEC, são responsáveis por diarreia e agrupadas em seis categorias de acordo com os seguintes fatores: tipo de mecanismo de virulência, síndromes clínicas que causam, aspectos epidemiológicos e/ou padrão de adesão a células epiteliais HEp-2, sendo essas adesão localizada

(AL), adesão agregativa (AA), adesão localizada- *like* (ALL) e adesão difusa (AD) (SACALETSKY et al., 1999).

1.3 *Escherichia coli* diarreio gênicas

As categorias de DEC foram nomeadas da seguinte maneira: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* que apresentam padrão de adesão difuso em células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998). As principais características de cada categoria estão descritas a seguir.

1.3.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC são as principais responsáveis por diarreia em crianças menores de dois anos em países em desenvolvimento, (OCHOA et al., 2008). Essas bactérias são caracterizadas pela formação da lesão *attaching and effacing* (A/E), que resulta na aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal promovendo a destruição das microvilosidades dos enterócitos e o rearranjo das proteínas do citoesqueleto, o que leva a formação de um pedestal no local da adesão (MOON et al., 1983).

As proteínas envolvidas na formação da lesão A/E (Figura 1) são produzidas pelo sistema de secreção do tipo III (SST3) codificado por genes localizados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) situada no cromossomo bacteriano (McDANIEL et al., 1995).

Figura 1- Lesão *attaching and effacing* causada por EPEC.

Fonte: (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O processo de patogênese dessas bactérias pode ser dividido em quatro etapas: primeiramente ocorre a adesão à célula hospedeira mediada por fímbria e flagelo, seguida pela produção e translocação de proteínas bacterianas através do SST3. No terceiro estágio ocorre a adesão íntima da bactéria ao enterócito através da interação das proteínas intimina (adesina presente na membrana externa da bactéria) e Tir (receptor da intimina, translocado da bactéria para a superfície das células epiteliais). Esse processo resulta no acúmulo de actina e outros componentes do citoesqueleto no local da adesão, levando a alterações celulares que culminam na formação de um pedestal na membrana do enterócito, no local onde a EPEC se encontra aderida (CLARKE et al., 2003; GOMES; GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2010) (Figura 2).

Figura 2- Mecanismo de patogenicidade de EPEC.

Fonte: (DONNENBERG, 2010).

EPEC são divididas em duas subcategorias, EPEC típicas e EPEC atípicas. A diferença entre esses dois subgrupos é a presença nas EPEC típicas do plasmídeo EAF (EPEC *adherence factor*), que codifica a fímbria BFP (*bundle forming pilus*) e a expressão dessa fímbria, cujo fenótipo é evidenciado pelo padrão de adesão AL em células HEp-2 (ABE et al., 2009).

EPEC típicas foram até meados de 90 as principais responsáveis por diarreia persistente em crianças menores de dois anos de idade nos países em desenvolvimento, todavia, na última década, o número de casos de diarreia causado por EPEC típicas diminuiu drasticamente e foi suplantado por EPEC atípicas tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (WILLIAMS; TORRES; LLOYD, 2010). Outra diferença entre essas duas subcategorias de EPEC é o fato de EPEC típicas serem espécies específicas tendo sido isoladas até hoje somente em humanos. EPEC atípicas, por sua vez, podem ser encontradas no homem e em diversos animais como cães, gatos e aves (SILVA; SILVA, 2005).

1.3.2 *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC)

Essas bactérias estão associadas a graves doenças humanas como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) atribuídas à produção de toxinas do tipo Shiga por esses patógenos (GYLES, 2007). As toxinas do tipo Shiga podem ser classificadas como Stx1 e Stx2. Quanto a estrutura, essas toxinas possuem 56.8 % de homologia, todavia, Stx2 é cerca de 100 a 400 vezes mais potente e associada ao desenvolvimento de SHU e ao agravamento da doença (GALLEGOS et al., 2012). Ambas são toxinas do tipo AB₅, portanto, compostas por uma subunidade A (35 kDa) e 5 subunidades B (7,5 kDa cada). A subunidade A é clivada em A1 (que possuiu atividade enzimática) e A2 (que liga a subunidade A à subunidade B) (GYLES, 2007).

A subunidade A, parte tóxica da molécula, inibe a síntese de proteínas do hospedeiro e induz apoptose, enquanto a subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor de globotriasilceramida (Gb₃) presente na superfície de células eucarióticas (NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Os genes que codificam as toxinas Shiga estão localizados no genoma de bacteriófagos lisogênicos integrados no cromossoma bacteriano. Um isolado de STEC pode produzir Stx1, Stx2 ou ambas toxinas (SCHEUTZ et al., 2001).

As toxinas Shiga atravessam as monocamadas epiteliais intestinais, e se disseminam através da circulação sanguínea até encontrar o alvo que são as células endoteliais. Após se ligarem ao receptor glicolipídico dessas células, as toxinas são transportadas em vesículas até o retículo endoplasmático. A célula endotelial alterada pela toxina atua então como um ninho de ativação para a cascata de coagulação, o que pode resultar no desenvolvimento de SHU (Figura 3) (DONNENBERG, 2010).

Existe um subgrupo de STEC denominado EHEC (*Escherichia coli* enteroemorrágica) cuja característica diferencial é a presença da região LEE no cromossomo bacteriano ausente nas outras linhagens de STEC. Devido à presença da região LEE as EHEC assim como demonstrado anteriormente para EPEC também são capazes de induzir a formação da lesão A/E pelo sistema de secreção do tipo III (GUTH et al., 2010; OHLAND et al., 2012).

A infecção humana se dá pela ingestão de alimentos e água contaminados. Sendo o gado o principal reservatório dessa categoria, diarreias causadas por STEC

também estão associadas ao consumo de carne, leite e derivados (CAPRIOLI et al., 2005).

Figura 3- Mecanismo de ação das toxinas de shiga.

Fonte: (DONNENBERG, 2010).

1.3.3 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

ETEC são as bactérias mais isoladas em crianças menores de cinco anos em países em desenvolvimento, sendo responsável por cerca de 200 milhões de casos de diarreia por ano (FLORES; OKHUYSEN, 2010; ISIDEAN et al., 2011). *E. coli* enterotoxigênicas também acometem adultos, sendo os principais agentes etiológicos responsáveis pela diarreia dos viajantes em países emergentes (QADRI et al., 2005).

A diarreia causada por ETEC é mediada pela secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), ou a combinação das mesmas. ST é uma pequena toxina que se liga ao receptor guanilato ciclase dos enterócitos e estimula sua atividade, o

que gera o aumento dos níveis de GMPc que altera o fluxo eletrolítico da célula com a inibição de absorção de sódio e estímulo de cloretos e consequentemente diarreia (CLEMENTS et al., 2012; GIANNELA, 1995) (Figura 4).

Figura 4- Mecanismo de patogenicidade de ETEC.

Fonte: (DONNENBERG, 2010).

A toxina LT é semelhante à toxina da cólera. Ela é classificada como AB₅, sendo composta por uma subunidade A, parte tóxica da molécula e 5 subunidades B que em sua forma pentamérica interagem fortemente com os receptores GM1 (monogangliosídeo) da célula hospedeira e fracamente com diversos glicoesfingolipídios (GDE1b, GD1a, dentre outros) e algumas glicoproteínas. Ao se ligar no receptor, a toxina LT é internalizada por endocitose, ocorrendo assim à dissociação das subunidades A e B, o que leva ao aumento do AMP cíclico resultando em diarreia (HAAN; HIRST, 2004; TENBERG et al., 1994). (Figura 4).

Existem dois tipos de toxina termolável, a LTI geralmente isolada em humanos e a LTII, mais frequente em animais (CLEMENTS et al., 2012). LTI

apresentam 75 % e 77% de homologia com a toxina CT entre as subunidades A e B. As toxinas LTII, apesar de possuírem a mesma atividade biológica que LTI, não apresentam reação imunológica cruzada.

1.3.4 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC são responsáveis por surtos de diarreia infantil em países em desenvolvimento e surtos de origem alimentar em países desenvolvidos (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Estes patógenos também são a segunda causa de diarreia do viajante nos Estados Unidos da América (KAUR et al., 2010).

Uma das características desses patógenos é o padrão de adesão do tipo agregativo (AA) a células epiteliais humanas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A patogênese de EAEC envolve três etapas: aderência à mucosa intestinal através de fímbrias e fatores de adesão, seguida por aumento da produção de muco na superfície do enterócito, formação de biofilme e a liberação de toxinas o que resulta em diarreia (WEINTRAUB, 2007) (Figura 5).

As cepas de EAEC produzem uma variedade de SPATEs (Serino- proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae*) classificadas em classe I ou citotóxicas e classe II, não citotóxicas. Como exemplo de classe I temos Pet (toxina mediada por plasmídeos) que cliva a ligação da actina à espectrina no citosol do hospedeiro causando arredondamento celular. Como SPATE da classe II temos Pic (proteína envolvida na colonização) que auxilia a penetração da bactéria na camada de muco. Outras toxinas como EAST-1 (Toxina termoestável de EAEC), ShET1 (Enterotoxina 1 de *Shigella*) e HlyE (Hemolisina E) também podem ser produzidas por EAEC (CLEMENTS et al., 2012).

Figura 5- Mecanismo de patogenicidade de EAEC.

Fonte: (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

1.3.5 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

EIEC tal como *Shigella* sp., são capazes de invadir e se multiplicar em células epiteliais intestinais causando colite inflamatória e disenteria (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), no entanto a doença causada por EIEC é menos severa comparada à causada por *Shigella*, o que pode estar relacionado com o baixo nível de expressão de fatores de virulência de EIEC (PARSOT, 2005).

O mecanismo de patogênese da EIEC consiste na invasão da mucosa intestinal através da fagocitose desses patógenos pelos enterócitos, seguida por rompimento do vacúolo e proliferação no citoplasma com subsequente passagem para as células adjacentes (PARSOT, 2005) (Figura 6).

Figura 6- Mecanismo de patogenicidade de EIEC.

Fonte: (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.3.6 *E. coli* com padrão de adesão difuso (DAEC)

DAEC são amostras de *E. coli* que aderem de forma difusa em células epiteliais HEP-2 e HeLa, devido a ação de adesinas fimbriais e afimbriais. Essas adesinas se ligam aos enterócitos resultando no aumento de microvilosidades ao redor do local de fixação da bactéria (CLEMENTS et al., 2012). Essas bactérias podem interagir com neutrófilos que são induzidos a sofrer apoptose, o que prolonga a persistência da bactéria no intestino. DAEC acometem principalmente crianças entre 18 meses e 5 anos de idade onde colonizam o intestino delgado (CROXEN; FINLAY, 2010). O único fator de secreção descrito em infecções causadas por DAEC é a SPATE Sat (toxina autotransportadora), que altera as junções celulares das células epiteliais intestinais (DAUTIN, 2010).

Apesar da grande diferença encontrada entre as categorias de *E. coli* diarreiogênicas, alguns sorogrupos podem ser encontrados em duas ou mais categorias, por exemplo, *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 podem ser caracterizadas como EPEC, STEC e EAEC (CAMPOS et al., 1994; CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

A importância desse sorogrupo é muito vasta em termos socioeconômicos desde que *E. coli* pertencentes a ele são responsáveis entre si por um alto índice de morte infantil por diarreia em regiões endêmicas e surtos de diarreia com sangue e SHU em países desenvolvidos (CALIN et al., 2013; ELLIOT et al., 2001; GERBER et al., 2002; GYLES, 2007; KATO et al., 2005; MORABITO et al., 1998; WIGHT et al., 2007).

Devido à importância clínica e epidemiológica das *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111, mais detalhes sobre esses patógenos, alvo desse projeto, estão descritos a seguir.

1.4 Sorogrupo O111- epidemiologia

E. coli pertencentes ao sorogrupo O111 são a segunda causa de SHU nos Estados Unidos (BROOKS et al., 2004). Surtos de diarreia com sangue e SHU causados por esses patógenos podem ser muito graves como o que ocorreu em 2008 em Oklahoma onde causaram diarreia em 341 pessoas sendo que dessas, 70 foram hospitalizadas, 17 desenvolveram SHU e uma morreu (CALDERON et al., 2010). Em 2011 no Japão, *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 foram responsáveis por um surto de diarreia com sangue e SHU onde 56 pessoas ficaram doentes e quatro morreram (FSN, 2011).

E. coli O111 também são consideradas patógenos emergentes devido ao surgimento, de novas linhagens patogênicas dentro desse sorogrupo. Um bom exemplo de *E. coli* O111 emergente pode ser ilustrado pelo surto ocorrido em 1996 em Picardy, França, onde um clone de *E. coli* O111 foi responsável pelo desenvolvimento de SHU em 10 crianças. A característica desse clone emergente foi verificada por sua capacidade de produzir toxinas de Shiga, característica de STEC, e apresentar marcadores genéticos e padrão de adesão do tipo AA de EAEC. Em acréscimo, esse clone não apresentava marcadores genéticos da região LEE, característico de EHEC, que é um subgrupo de STEC responsável pela maioria dos surtos de diarreia e SHU em países desenvolvidos. (MORABITO et al., 1998). Esse mesmo fenômeno foi observado no clone de *E. coli* responsável pelo surto ocorrido em 2011 na Europa, onde uma EAEC O104:H recebeu através de transmissão horizontal, genes para produção de toxinas shiga, característica de STEC. Esse surto resultou em 852 casos de SHU e 32 mortes somente na Alemanha (BIELASZEWSKA et al., 2011).

Além disso, tem sido observado nos últimos anos um grande aumento na prevalência de clones emergentes altamente virulentos de *E. coli* O111 de origem aviária. Tal fato resulta em sérias implicações na saúde pública desde que *E. coli* O111 de aves e gado são patógenos zoonóticos podendo, assim, infectar humanos (JOHNSON et al., 2008; MORA et al., 2009, 2010; MOULIN-SCHOULEUR et al.,

2006, 2007;). Essa situação torna-se ainda mais crítica devido a capacidade desses patógenos de sobreviver no meio ambiente por até 8 semanas entre temperaturas de 5 °C a 25 °C. Resultados obtidos no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan também demonstraram que *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 provenientes de cães e gatos formam biofilme em superfícies abióticas principalmente em temperaturas ambiente (aproximadamente 26 °C) (Resultados em fase de submissão, 2013). Esses dados indicam que essas bactérias possuem mecanismos de proteção contra adversidades ambientais, (FUKUSHIMA et al., 1999).

Apesar da grande importância socioeconômica das *E.coli* pertencentes ao sorogrupo O111, não existe disponível no mercado qualquer vacina contra esses patógenos (BROOKS et al., 2004; GOMES et al., 1991; FRANZOLIN et al, 2005; FSN, 2011; ROSA et al., 1998; SPANO et al., 2008; TOLEDO et al., 1983; TRABULSI et al., 1985; VAZ et al., 2004).

Todavia, a formulação de uma vacina contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 não é uma tarefa fácil devido à grande variedade genética e fenotípica existente entre as linhagens pertencentes a esse sorogrupo. Deste modo, independente do mecanismo de virulência das cepas de *E. coli* O111, a vacina contra estes patógenos deve ter como alvo um antígeno que esteja presente em todas elas.

Resultados obtidos no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan mostraram que anticorpos contra o polissacarídeo O111 foram capazes de inibir a adesão de todas as categorias de *E. coli* pertencentes a esse sorogrupo. Em acréscimo, esses anticorpos também aumentaram a fagocitose de *E. coli* O111 por macrófagos na presença de complemento (SANTOS et al., 2010). Esses resultados indicam que o polissacarídeo O111 é um bom candidato a antígeno para formulação de uma vacina contra todas as cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111.

Todavia, polissacarídeos O111 são antígenos Timo independente do tipo II e, portanto, não induzem altos níveis de anticorpos ou memória imunológica em crianças menores de 2 anos de idade, cuja maior parte dos linfócitos B são imaturos (POLLARD; PERRET; BEVERLY, 2009). Para induzir altos níveis de anticorpos e memória imunológica em crianças é necessário conjugar o polissacarídeo a uma proteína carreadora, processo utilizado em vacinas conjugadas.

1.5 Resposta imune contra polissacarídeos- vacina conjugada

Para obtenção de anticorpos contra polissacarídeos, as vacinas conjugadas foram elegantemente construídas com base no mecanismo imunológico de cooperação entre linfócitos T e B. Para que isso ocorra é necessário construir um conjugado, ligando o polissacarídeo a uma proteína (FRASCH, 2009).

O processo de cooperação entre linfócitos T e B ocorre da seguinte forma: primeiramente o linfócito B reconhece o polissacarídeo da molécula conjugada através de suas imunoglobulinas de membrana que são seus receptores de antígeno. A molécula conjugada inteira é endocitada, processada nas vesículas celulares onde fragmentos peptídicos da proteína carreadora (ou seja, da proteína conjugada ao polissacarídeo) são associados às moléculas de MHC da classe II, formando um complexo que é exposto na superfície da célula B. O linfócito B então apresenta através do complexo de MHC da classe II os fragmentos peptídicos às células T auxiliares, específicas para a proteína carreadora. Ao reconhecer o fragmento peptídico da proteína carreadora, a célula T induz a ativação e a diferenciação das células B imaturas tornando-as células imuno-competentes capazes de produzir anticorpos protetores contra polissacarídeos (Figura 7) (DAGAN; POOLMAN; SIEGRIST, 2010).

Figura 7- Mecanismo de cooperação entre linfócitos T e B em uma vacina conjugada.

Fonte: (POLLARD; PERRET; BEVERLY, 2009).

No entanto, polissacarídeos mesmo quando conjugados a uma proteína carreadora não induzem resposta imune eficaz sem o auxílio de um adjuvante. O hidróxido de alumínio é o adjuvante mais utilizado na rotina médica, porém com antígenos polissacarídicos, esse adjuvante é pouco eficiente (GONZÁLEZ et al., 2008; LINDBLAD, 1995). Por essa razão, estudos vêm sendo realizados a fim de encontrar um adjuvante que seja capaz de aumentar a resposta de anticorpos induzida por vacinas conjugadas para recém-nascidos.

Desde que diferentes tipos de componentes têm sido utilizados na fabricação de adjuvantes, como por exemplo, partículas de sílica, partículas oleosas, proteínas recombinantes, o tamanho, porosidade, material e as propriedades do adjuvante devem ser levados em consideração na escolha do processo de formulação da vacina.

Um dos adjuvantes que têm demonstrado possuir propriedades imunomodulatórias, capacidade de aumentar a expressão de moléculas coestimuladoras na superfície das células apresentadoras de antígenos e aumentar a fagocitose de partículas por macrófagos, são as partículas mesopórosas de sílica SBA-15 (figura 8).

Figura 8- Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15.

(A) Estrutura de poros arranjados hexagonalmente. (B) interior dos poros interconectados. Tamanho médio da partícula: 30 μm . Tamanho dos poros: 3,1 – 6 nm.
Fonte: (SCARAMUZZI et al., 2011).

O potencial adjuvante da sílica já foi verificado com diferentes antígenos, como a proteína 1 β de *E.coli*, proteínas do veneno da serpente *Micrurus ibiboboca* e a proteína BSA, em que a sílica foi capaz de induzir imunidade duradoura em camundongos isogênicos e geneticamente modificados (CARVALHO et al., 2010; MERCURI et al., 2006).

Outro fator a ser considerado é a via de administração a ser utilizada. No caso de patógenos entéricos, a melhor maneira para se administrar uma vacina é a via oral, devido aos seguintes fatores: menor custo de produção, dispensa a utilização de agulhas e pessoal especializado para sua administração, além de ser de fácil distribuição em áreas endêmicas localizadas em regiões geográficas de difícil acesso. Todavia, existe uma desvantagem associada à vacina oral, a tolerância imunológica induzida aos antígenos administrados (DOMINGOS, SANT'ANNA, 2005).

Para quebrar a tolerância oral e induzir imunidade na mucosa intestinal é necessária a inclusão de um adjuvante na formulação vacinal. As moléculas de CT (toxina da cólera) e LT (toxina termolábil de *E.coli* enterotoxigênica) são consideradas um dos mais potentes adjuvantes orais descritos (DOMINGOS et al., 2009). No entanto, na sua forma natural essas moléculas são extremamente tóxicas, o que impossibilita a utilização das mesmas na formulação de vacinas. Assim, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se obter moléculas recombinantes que mantenham a propriedade adjuvante das toxinas sem a toxicidade das mesmas (FRASER et al., 2003). Resultados decorrentes desse esforço mostraram que

algumas moléculas recombinantes de LT e CT mantêm a propriedade adjuvante da molécula nativa apesar de possuírem baixa toxicidade. Foi também verificado que algumas recombinantes como a EtxB, subunidade B da toxina LT são capazes de quebrar a tolerância oral e induzir imunidade sistêmica e de mucosa ao antígeno coadministrado (FINGERUT et al., 2006; MILLAR et al., 2001; WILLIAMS, 2000).

Outra característica importante em vacinas orais é a incorporação do antígeno em veículos capazes de proteger o antígeno durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Partículas a base de lipossomas e outros materiais como óleo têm sido comumente utilizados como veículos carreadores de antígeno pela via oral (DOMINGOS et al., 2008; WOODROW et al., 2012.).

Um bom exemplo de adjuvante oral descrito na literatura com capacidade de proteger o antígeno após administração oral é a formulação Vaxcine™. Essa formulação possui uma tecnologia que permite a incorporação do antígeno em partículas oleosas sem danificar a estrutura e as propriedades da molécula. Em acréscimo, Vaxcine™ é capaz de direcionar o antígeno as células M das placas de Peyer, que são sítios imunodominantes do intestino. Além disso, ele apresenta outras vantagens como: estabilidade a temperatura ambiente, rapidez, facilidade de produção e aprovação para uso em humanos (ALVES et al., 2011). Foi também demonstrado que Vaxcine™ é capaz de aumentar a resposta imune oral induzida por adjuvantes orais como a CT e LT (DOMINGOS et al., 2008).

Apesar de toda tecnologia disponível para construção de vacinas contra patógenos entéricos, a Dukoral é a única vacina disponível capaz de gerar proteção em curto prazo contra *E. coli*, no caso ETEC (GIRARD et al., 2006).

Portanto, estudos que visem o desenvolvimento de vacinas para prevenção de um número maior e mais diversificado de patógenos entéricos bacterianos poderão contribuir para reduzir os elevados gastos públicos direcionados, atualmente, no tratamento de doenças diarreicas que ainda são negligenciadas. Desta forma, este trabalho apresenta estudos preliminares que sugerem que a formulação de uma vacina conjugada utilizando o polissacarídeo O111 é viável contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111, que são patógenos de grande importância para a saúde pública.

2 OBJETIVO

Determinar o potencial do polissacarídeo O111 como candidato a antígeno para formulação de uma vacina conjugada contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111.

Os seguintes aspectos foram analisados:

- 1- Resposta imune induzida em coelhos imunizados pela via subcutânea com o polissacarídeo O111 detoxificado conjugado a proteína citocromo c;
- 2- Resposta imune humoral sistêmica e de mucosa de camundongos imunizados pela via oral com o polissacarídeo O111 detoxificado conjugado a proteína recombinante EtxB (subunidade B da toxina termolábil de ETEC).

3 JUSTIFICATIVA

Resultados obtidos por Santos e colaboradores (2010) indicaram que o LPS O111 de *E. coli* seria um bom antígeno para ser utilizado na formulação de uma vacina contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111. Todavia os resultados desse estudo foram obtidos com a bactéria inteira formalinizada ou com o LPS bruto não purificado. Por essa razão, anticorpos contra epítomos bacterianos não pertencentes ao LPS poderiam estar influenciando a resposta encontrada por eles. Outrossim, o LPS é considerado um antígeno Timo Independente do tipo I, ou seja, ele tem a capacidade de ativar diretamente os linfócitos B através do receptor Toll4 e gerar uma resposta imune humoral policlonal. Além disso, na sua forma íntegra o LPS O111 é tóxico e por essa razão não permitido para uso em humanos. Dessa maneira a melhor maneira de verificar se o LPS é um bom candidato a antígeno é detoxificá-lo, retirando o lipídio A (parte tóxica da molécula). A parte não tóxica do LPS é constituída em sua maior parte por polissacarídeos sendo o antígeno O predominante. Entretanto, o antígeno O do LPS por ser constituído de polissacarídeos é considerado um antígeno Timo independente do tipo II o que o diferencia da molécula de LPS íntegra.

Os polissacarídeos diferentemente do LPS, interagem com os receptores de antígeno presentes na membrana dos linfócitos B através de seus epítomos

repetitivos o que dá um sinal a célula para produção de anticorpos. No entanto, os linfócitos B de crianças menores de 2 anos de idade são imaturos e a ligação dos receptores de antígeno dessas células com epítopos repetitivos como no caso dos polissacarídeos podem tornar essas células não respondedoras. Esse fato é crucial para o desenvolvimento de uma vacina contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 desde que essa faixa etária é a que mais sofre com doenças diarreicas. Todavia, o problema da falta de resposta imune para polissacarídeos em crianças menores de dois anos de idade pode ser solucionado através da conjugação dos polissacarídeos a uma proteína carreadora, processo esse utilizado no presente projeto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes utilizados

O polissacarídeo O111- Lipopolissacarídeo detoxificado de *E. coli* sorotipo O111:B4 (L3023), citocromo c (C2037), reagente de Schiff (Kit-PAS), reagentes EDAC (567248), ADH (217824) e a minicoluna Sephadex G 25 (G255150) foram comprados da Sigma, St.Louis, EUA. O substrato usado no teste de ELISA SIGMA-Fast (Sigma Fast N2770 Lot 083K820L) e os conjugados marcados com fosfatase alcalina: IgG de cabra anti-IgG de coelho (A8025), IgG de cabra anti-IgG de camundongo (A1682) e IgG de cabra anti-IgA de camundongo (A4937) também foram adquiridos da Sigma, UK, Ltd. O Soro Fetal Bovino Inativado (901104) foi comprado da Laborclin e o meio Dulbecco Mem (DMEM) (000545) para cultura de células foi comprado da companhia Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil. As soluções para quantificação de proteínas: Ácido Bicinconínico (B9643) e sulfato de cobre (C2284) bem como a proteína padrão BSA (*Protein Standard liquid*) (P0914) foram obtidas da Sigma. O meio TSB (*Tryptic Soy Broth*) (211825) foi obtido da Biosciences, San José, EUA (BD). Os corantes “Giensa” (1092041002) e May-Grunwald’s eosine methyleni Blue solution (1014241002) foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha. Agarose (15510019) foi obtida da Invitrogen. A proteína recombinante EtxB (subunidade B da toxina termolábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica) foi produzida e gentilmente cedida pelo Dr. Neil Williams da Universidade de Bristol (UK). O veículo oral carreador de antígenos Vaxcine™ foi formulado pela Proxima Concepts e autorizado para utilização neste projeto pelo diretor científico Dr. Roger R. C. New. A sílica SBA-15 foi cedida pelo Dr. Osvaldo Sant’Anna do laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, São Paulo. Os demais reagentes empregados foram da melhor qualidade comercial possível.

4.2 Isolados Bacterianos

As cepas de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho (Tabela 1) são provenientes da coleção de amostras de *Escherichia coli* diarreiogênicas pertencente ao laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Tabela 1- Isolados de *E. coli* utilizados no presente estudo.

Sorotipo	Patotipo	Referência
O127: H6	t- EPEC	IGUCHI et al., 2009
O111: H	EHEC	CAMPOS et al., 1994
O111: H12	EAEC	CAMPOS et al., 1994
O111: H2	t- EPEC	CAMPOS et al., 1994
O111: H25	a- EPEC	CAMPOS et al., 1994
O111: H21	EAEC	CAMPOS et al., 2004

t- EPEC: EPEC típica, a- EPEC: EPEC atípica

4.3 Linhagem celular

Para os testes de inibição de adesão foram utilizadas células HEp-2 provenientes do banco de células do Instituto Adolfo Lutz. A manutenção das células foi feita em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino.

4.4 Animais

Camundongos BALB/c fêmeas (6-8) semanas de idade e coelhos adultos NZW de 60 dias pesando 1,5 Kg foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan (São Paulo). A utilização dos animais foi aprovada pela Comissão de ética no uso de animais do Instituto Butantan (CEUAIB), protocolo número 663/09. Todos os procedimentos seguiram os princípios do código de ética para uso de animais de laboratório.

4.5 Formulação e avaliação dos conjugados

4.5.1 Conjugação do polissacarídeo O111 com a proteína citocromo c ou BSA

Dois miligramas de polissacarídeo detoxificado O111 foram dissolvidos em 0,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,5. Subsequentemente 44 mg de ADH foram adicionados a solução de polissacarídeo e homogeneizados. Em seguida, 26 mg da resina EDAC foram adicionados a solução que foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente em rotação baixa. Após a incubação, o polissacarídeo foi purificado em uma minicoluna de Sephadex G25 equilibrada com água, para eliminar moléculas de ADH livres. A minicoluna foi centrifugada por duas vezes a 541 g por 2 minutos cada. Após purificação a solução com o polissacarídeo foi liofilizada por 18 horas. O material liofilizado foi ressuspenso em 200 µL de uma solução contendo 7 mg de citocromo c ou em tampão fosfato 0,2 M pH 7,5. Subsequentemente foi adicionado a solução 10 mg de resina EDAC e a mistura foi então incubada por 3 horas a temperatura ambiente em baixa rotação. Após incubação, o conjugado obtido foi coletado e armazenado a 4° C.

4.5.2 Conjugação do polissacarídeo O111 com a proteína EtxB

Dois miligramas de polissacarídeo detoxificado O111 foram dissolvidos em 0,4 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 7,5. Subseqüentemente 44 mg de ADH foram adicionados a solução de polissacarídeo-ADH e incubados por 18 horas a 55° C. Após a incubação, 400 µL da solução (polissacarídeo-ADH) foram purificados em Sephadex G25 equilibrada com água, afim de eliminar moléculas de ADH livres. Subsequentemente, 0,4 mL da solução de polissacarídeo foram adicionados a 2mg de proteína recombinante EtxB e 100 mg da resina EDAC. Para retirar moléculas não conjugadas, a solução foi diluída em 15 mL de PBS e purificada em Centriprep (Millipore) com membrana de 30 kDa. Esse procedimento foi realizado duas vezes, após purificação o conjugado foi armazenado a 4° C.

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O perfil eletroforético das amostras dos conjugados O111-citocromo c, O111-BSA, O111-EtxB, das proteínas citocromo c, BSA, EtxB e do polissacarídeo O111 foi observado após fracionamento por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e coloração por nitrato de prata para polissacarídeos (HITCHCOCK; BROWN, 1983) e para proteínas (BLUM et al., 1987).

4.5.4 *Immunoblotting*: conjugado O111- citocromo c e O111-EtxB

As amostras dos conjugados O111-citocromo c e O111-EtxB, polissacarídeo O111, proteínas citocromo c, EtxB e LPS O111 bruto foram separadas através de SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose sob ação de corrente elétrica (*Western blot*). A membrana foi bloqueada em solução contendo PBS-Molico® (Nestlé-Brasil) 5% por 18 horas, a 4 °C. Em seguida, lavada três vezes por 10 minutos cada com tampão de lavagem contendo PBS-tween 20 0,05%, o soro anti O111 (controle positivo gerado pela imunização de coelhos com *E. coli* O111) foi adicionado em uma diluição de 1:100 em PBS-Molico® 1% por 18 horas, a 4 °C. Após incubação, a membrana foi submetida a três lavagens e o conjugado anti IgG de coelho 1: 2000 diluído em PBS-Molico® 1% foi adicionado por 2 horas a temperatura ambiente. A membrana foi então lavada novamente e o ensaio foi revelado com PBS contendo 0,033 mg/mL de DAB e 5 µL de H₂O₂. A reação foi interrompida com água destilada.

4.5.5 Quantificação de proteínas

A concentração protéica dos conjugados foi determinada utilizando ácido Bicinonínico e sulfato de cobre, tendo como proteína padrão albumina bovina (SMITH et al., 1985).

4.6 Análise do perfil cromatográfico dos conjugados por Gel filtração

O experimento foi realizado utilizando-se um sistema de cromatografia líquida AKTApurifier (GE Healthcare, Sweden) usando a técnica de separação por exclusão molecular, em coluna TSKgel Super SW 2000 que separa moléculas de 5-100kDa (TOSOH BIOSCIENCE 4,6mm x 30,0 cm). Como solvente foi utilizado 0.2M de fosfato em H₂O, em fluxo constante de 0.2mL/min, utilizando um método isocrático em 40 min de corrida. A análise cromatográfica dos conjugados foi realizada pelo doutorando Hugo Vigerelli de Barros sob a orientação do Dr. Daniel Pimenta do Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan.

4.7 Preparo de antígeno para Imunização de Coelhos

4.7.1 Bactérias utilizadas

Amostras da bactéria O111:H2 foram semeadas em LB ágar e incubadas em estufa a 37 °C. O crescimento bacteriano foi ressuspendido em salina formalinizada 0,5% e armazenada a 4 °C até o momento da imunização. A concentração foi ajustada para 9×10^8 células/mL na escala de MacFarland.

4.7.2 Obtenção do extrato de LPS bruto para imunização

Amostras da bactéria O111:H2 foram cultivadas em meio TSB por 18 horas a 37 °C. Após a incubação, as bactérias foram centrifugadas. O precipitado resultante das amostras foi então ressuspendido em tampão de lise e aquecido por 10 minutos a 100 °C. Após resfriamento, o lisado foi incubado com proteinase K e posteriormente fracionado em 15% de gel de poliacrilamida. O gel foi então cortado em tiras (5 mm de largura) e homogenizado em 1 mL de PBS e mantido a -20 °C até uso.

4.7.3 Incorporação em sílica SBA-15

O conjugado O111-citocromo c foi incorporado em sílica SBA-15 em uma proporção de 1: 25 e incubado por 24 horas a 4 °C antes da imunização dos animais. As amostras foram diluídas em PBS.

4.7.4 Incorporação em Vaxcine™

O conjugado O111-EtxB foi incorporado na formulação Vaxcine™ através da co-dispersão do antígeno com a molécula anfipática em solução aquosa, seguida pela remoção de água por liofilização. O óleo foi então adicionado ao resíduo seco até a obtenção de uma solução homogênea e translúcida para posterior imunização.

4.7.5 Imunização de coelhos

Três coelhos foram depilados e imunizados seis vezes pela via subcutânea (4 pontos na região dorsal) com intervalos de um mês entre as imunizações, com a suspensão bacteriana O111:H2 formalinizada, extrato de LPS da amostra O111:H2 ou O111-citocromo C (concentração 10 µg/0,2 mL) incorporado em Sílica SBA-15 (1/25). Amostras de sangue foram coletadas antes da primeira imunização, seis meses e um ano após a última. O soro foi obtido por centrifugação a 500 g (Eppendorf 5804R) e estocado a - 20° C até uso. As amostras foram utilizadas para os testes de ELISA, floculação e Inibição de Adesão.

4.7.6 Imunização de camundongos com os conjugados O111-citocromo c e O111-BSA

Camundongos foram divididos em grupos de cinco animais e imunizados três vezes pela via oral com os conjugados O111-citocromo C, O111-BSA (concentração de 10 µg/0,2 mL por animal) incorporado ou não em Vaxcine™ (50 µL de antígeno em 1 mL de Vaxcine™). Como controle, camundongos foram imunizados com Vaxcine™ apenas em PBS. Antes da primeira imunização e dez dias após última imunização, amostras de sangue e fezes foram coletadas para determinação de

anticorpos específicos contra o polissacarídeo. As análises das amostras foram realizadas três vezes.

4.7.7 Imunização de camundongos com o conjugado O111-EtxB

Camundongos foram divididos em grupos de cinco animais e imunizados três vezes pela via oral com o conjugado O111-EtxB (concentração de 10 µg/0,2 mL por animal) incorporado ou não em Vaxcine™ (50 µL de antígeno em 1 ml de Vaxcine™) em um intervalo de 30 dias entre as imunizações. Como controle, camundongos foram imunizados com Vaxcine™ apenas em PBS. Antes da primeira imunização e dez dias após última imunização, amostras de sangue e fezes foram coletadas para determinação de anticorpos específicos contra o polissacarídeo. As análises das amostras foram feitas em triplicata.

4.7.8 Coleta de amostras de sangue e fezes

Amostras de sangue dos camundongos foram coletadas em forma de *pool* pela veia caudal utilizando um capilar heparinizado. As amostras foram centrifugadas a 3214 g por 5 minutos para obtenção do sobrenadante. As amostras de fezes foram coletas em *pool*, pesadas e adicionas a 5ml de uma solução de PBS 3% BSA contendo 1 mM *phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF) como inibidor de protease. As amostras subsequentemente foram então incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, homogenizadas e incubadas por 24 horas a 4 °C. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 4 minutos a 3214 g e os sobrenadantes coletados e analisados para detecção de anticorpos.

4.7.9 Teste de ELISA: avaliação dos soros de coelhos e camundongos

A amostra de *E. coli* O111:H21 (amostra padrão de formação de biofilme em plástico) foi previamente incubada em 3 mL de TSB a 37 °C por 18 horas. Após crescimento da amostra, foi feita diluição de 1/10 em meio DMEM sem antibiótico e a sensibilização feita em placas de 96 poços de cultura celular (TPP) que foram incubadas por 18 horas em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após incubação as placas

foram fixadas por 1 hora a temperatura ambiente com metanol 100% (100 µL por poço) e lavadas 3 vezes com PBS estéril. Após lavagem, as placas foram bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente com 3% de leite Molico® em PBS. Após bloqueio, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS + 0,05% de tween 20) por 3 vezes. Diferentes diluições dos soros de coelho ou camundongos em tampão de incubação (PBS + 1% leite molico) foram então adicionadas em poços sensibilizados ou não com bactéria. Subsequentemente, as placas foram incubadas *overnight* a 4 °C. Após incubação, as placas foram lavadas 6 vezes e incubadas por 1 hora com diferentes diluições dos conjugados marcados com fosfatase alcalina: anti IgG de coelho, anti IgG de camundongos e anti IgA de camundongos, dependendo do protocolo experimental. As placas foram então lavadas e reveladas com o substrato p-nitrofenil fosfato. A leitura do teste foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan 405 nm).

4.7.10 Teste de aglutinação em tubos: avaliação dos soros de coelhos e camundongos

A titulação dos anticorpos anti O111 gerados em coelhos e camundongos foi feita pela técnica de aglutinação em tubos, segundo as recomendações de EWING et al. (1963). As amostras utilizadas para o teste de floculação com o soro de camundongos e coelhos foram: O111:H12 (EAEC), O111:H (EHEC), O111:H2 e O127:H6 (ambas EPEC típicas), e EPEC atípica (confirmar amostra) crescidas em meio TSB, a 37° C, por 18 horas. A primeira diluição do soro anti O111 foi feita em cultura bacteriana, na proporção de 1:50, e a partir desta foram feitas as demais diluições seriadas na proporção de 1:2. A incubação das diluições ocorreu em estufa a 37° C, com a leitura realizada após 2 horas. O título do soro foi expresso em log na base 10.

4.7.11 Teste de adesão bacteriana a células HEp-2

Os testes de adesão foram realizados, de acordo, com Scaletsky et al. (1984). Células HEp-2 foram transferidas, na concentração de 5×10^4 células/mL em meio DMEM contendo 10% de SFB (soro fetal bovino inativado), para placas de cultura de

células de 24 poços (TPP) forradas com lamínulas esterilizadas. As células foram incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ até formarem monocamadas com 70% de confluência. As monocamadas foram então lavadas 1x com PBS estéril. Subsequentemente 10⁵/mL de cultura bacteriana previamente crescida em TSB por 18 horas foram acrescentadas em 960 µL de meio DMEM sem antibiótico (Cultilab) contendo 2% de SFB e adicionadas nos poços em triplicata. Após 3 horas de incubação, a 37° C em estufa de CO₂ a 5%, as placas foram lavada 6 x com PBS, e as células fixadas com metanol 100% por 10 minutos. A coloração foi feita com corante May-Grünwald (Merck) diluído 1:2 em tampão Sorensen (33 mM KH₂PO₄, 55 mM Na₂HPO₄, pH 7,3), por 5 minutos, e corante Giemsa (Merck) diluído 1:3 com o mesmo tampão, por 20 minutos. O excesso do corante foi retirado com água corrente, as lamínulas foram secas a temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia para posterior visualização em microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes (objetiva 100 X e ocular 10 X).

4.7.12 Teste de inibição de adesão de *E.coli* diarreiogênicas O111 em células epiteliais humanas utilizando soro de coelho anti O111

Os testes de inibição de adesão foram realizados conforme descrito no item 4.7.11. As amostras contendo diferentes diluições do soro de coelho anti O111, provenientes da imunização com o conjugado O111-citocromo c, foram previamente incubadas por uma hora, a 37 ° C. Após incubação, todas as amostras foram adicionadas nos poços em triplicatas e incubadas por 3 horas a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂. Como controle positivo, 20 µL de cultura bacteriana foram adicionados na placa de 24 poços sem incubação prévia com o soro. Após incubação, as células foram lavadas, fixadas com metanol e coradas para posterior visualização.

5 RESULTADOS

5.1 Conjugação do polissacarídeo a proteína carreadora

De acordo com a literatura científica, o melhor método para conjugar o polissacarídeo O111 a uma proteína carreadora é através da utilização do ADH como ligante (GUPTA et al., 1995). Portanto, essa metodologia foi utilizada neste estudo e padronizada com várias modificações pelo Dr. Roger R. Charles New (Diretor Científico da Companhia Proxima Concepts, Londres). A padronização do conjugado foi efetuada de forma que evitasse a reatividade cruzada excessiva entre as moléculas e a perda de colitose que é a parte mais antigênica da molécula de O111.

5.2 Análise do conjugado O111-citocromo c

Para verificar se o polissacarídeo O111 foi ligado à proteína carreadora citocromo c, o conjugado foi analisado por SDS-PAGE e *Western blotting*. Os resultados obtidos com esses experimentos mostraram que os anticorpos anti polissacarídeo O111 gerados em coelhos foram capazes de reconhecer o conjugado e o LPS O111 não detoxificado usado como controle no lugar do polissacarídeo O111 detoxificado cuja massa molecular é abaixo de 20 kDa. Todavia, não foram capazes de reconhecer a amostra de citocromo c (figura 9).

Figura 9- Reconhecimento do conjugado O111-citocromo c por anticorpos contra o polissacarídeo O111.

a- Análise por SDS-PAGE 15%. Padrão molecular de proteínas (linha 1) , conjugado O111-citocromo c (linha 2); em comparação com o citocromo c apenas (linha 3). b- Análise por *Western blotting* do conjugado O111-citocromo c (linha 1), comparando com a proteína citocromo c apenas (linha 2) e o LPS O111 (linha 3).

Resultados obtidos através de cromatografia de exclusão molecular mostraram que na amostra do conjugado foram encontrados componentes com massas moleculares maiores que os encontrados na amostra do polissacarídeo derivatizado (O111-ADH) (figura 10).

Figura 10- Análise do conjugado O111-citocromo c por cromatografia de exclusão molecular.

Preto= Polissacarídeo O111-ADH, Azul= Conjugado O111-citocromo c. Leitura de 220nm, fluxo de 0.2 mL/min.

5.3 Análise do conjugado O111-BSA

Apesar do conjugado O111-BSA não ter sido analisado por *Western blotting* ou por cromatografia de exclusão de massa, podemos observar pelos resultados de SDS-PAGE que a conjugação ocorreu sem formação de complexos moleculares de tamanhos muito distintos (Figura 11).

Figura 11- Perfil eletroforético das amostras do conjugado BSA-Polissacarídeo O111

Amostras da proteína BSA (1); polissacarídeo O111 (2) e conjugado O111-BSA (3), foram fracionadas em gel de poliacrilamida 15% e coradas com nitrato de prata para polissacarídeo (a) e para proteína (b).

5.4 Conjugado O111-EtxB

A terceira proteína carreadora utilizada foi a subunidade B recombinante da toxina termolábil de *E. coli* enterotoxigênica, denominada EtxB. As análises do conjugado feitas por SDS-PAGE e *Western blotting* mostraram que os anticorpos de coelho contra o polissacarídeo O111 foram capazes de reconhecer as amostras do conjugado e do LPS O111 bruto “mas” não as amostras de EtxB sozinha (figura 12).

Figura 12- Reconhecimento do conjugado O111-EtxB por anticorpos contra o polissacarídeo O111.

a- Análise por SDS-PAGE 15% do conjugado O111-EtxB (linha 3); em comparação com EtxB apenas (linha 2), padrão molecular de proteínas (linha 1). b- Análise por *Western blotting* do conjugado O111-EtxB (linha 1), comparando com a proteína EtxB apenas (linha 2) e o LPS O111 (linha 3).

Além disso, foi observado por cromatografia de exclusão molecular que grande quantidade de polissacarídeo livre (O111-ADH) foi separada do conjugado O111-EtxB após sua purificação em centriprep de membrana de 30.000 kDa (figura 13).

Figura 13- Análise do conjugado O111-EtxB por cromatografia de exclusão molecular.

a- conjugado O111-EtxB depois da purificação em centripeg de 30MW (azul escuro), polissacarídeo O111-ADH (preto); proteína EtxB (azul claro). Leitura de 220nm, fluxo de 0.2 mL/min.

5.5 Resposta imune humoral induzida pelo conjugado O111-citocromo c incorporado em sílica SBA-15

Com o intuito de determinar a capacidade do conjugado O111-citocromo c de gerar anticorpos contra diferentes isolados de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111, coelhos foram imunizados pela via subcutânea com o conjugado na presença ou ausência de sílica SBA-15 como adjuvante.

A resposta imune gerada pelo conjugado O111-citocromo c foi avaliada pela técnica de ELISA.

Os resultados obtidos mostraram que seis meses e um ano após a última imunização o conjugado conseguiu gerar anticorpos IgG contra o polissacarídeo apenas quando incorporado em sílica SBA-15 como adjuvante, sendo o nível de anticorpos gerados equivalentes aos obtidos com os grupos imunizados com o LPS bruto ou com a bactéria inteira formalinizada, ambos proibidos para uso em humanos (Figuras 14 e 15).

Figura 14- Resposta humoral de coelhos imunizados contra o antígeno O111 (seis meses).

Coelhos foram imunizados pela via subcutânea com o conjugado O111-citocromo c incorporado em sílica SBA-15, com a bactéria O111:H2 formalinizada ou com o extrato bruto de LPS proveniente de bactéria O111:H2. Amostras de soro foram coletadas seis meses após a última imunização e testadas pela técnica de ELISA para detecção de IgG anti O111. A densidade óptica é referente à diluição do soro de 1/100.

Figura 15- Resposta humoral de coelhos imunizados contra o antígeno O111 (um ano).

Coelhos foram imunizados pela via subcutânea com o conjugado O111-citocromo c incorporado em sílica SBA-15, com a bactéria O111:H2 formalinizada ou com o extrato bruto de LPS proveniente de bactéria O111:H2. Amostras de soro foram coletadas um ano após a última imunização e testadas pela técnica de ELISA para detecção de IgG anti O111. A densidade óptica é referente à diluição do soro de 1/100.

Para determinar a capacidade dos anticorpos gerados em coelho de reconhecer diferentes categorias (EPEC, STEC e EAEC) pertencentes ao sorogrupo O111, utilizamos o teste de aglutinação em tubos onde bactérias vivas foram submetidas ao anticorpo. Os resultados obtidos com esse ensaio mostraram que os

anticorpos gerados em coelhos pela imunização com o conjugado foram capazes de reconhecer amostras vivas de *E. coli* O111 pertencentes a todas as categorias desse sorogrupo, e não uma amostra proveniente de um sorogrupo não relacionado como o O127 (figura 16).

Todavia, além de reconhecer, os anticorpos devem ser capazes de inibir a adesão desses patógenos às células epiteliais do intestino. Sendo assim verificamos *in vitro* a capacidade dos anticorpos gerados pelo conjugado de inibir a adesão de diferentes categorias de *E. coli* O111 a células HEp2. Os resultados mostraram que todos os anticorpos provenientes da imunização de camundongos com o conjugado O111-citocromo c foram capazes de inibir a adesão de todos os isolados testados independente do mecanismo de virulência dos mesmos (Figura 17).

Figura 16- Título de aglutinação anti O111 com relação a diferentes amostras de *E.coli* diarreiogênicas pertencentes ao sorogrupo O111.

Diluições seriadas dos soros de coelhos imunizados com: conjugado O111-citocromo c incorporado em sílica SBA-15, extrato de LPS bruto e bactéria O111 formalinizada foram incubados com as amostras O111:H2, O111:H12, O111:H e O127:H6 por 2 horas a 37 °C.

Figura 17 - Inibição da adesão de amostras de *E. coli* diarreiogênicas por soro de coelhos imunizados com conjugado O111-citrocomo c.

Células epiteliais HEp-2 foram incubadas por 3 horas com as bactérias O111 ou O127). As amostras bacterianas foram incubadas na ausência (A) ou presença (B) de anticorpos anti O111 induzidos pela imunização com o conjugado. Ocular 10 Objetiva (100x).

5.6 Resposta imune induzida em camundongos imunizados pela via oral

Uma vez que os resultados obtidos através da imunização de coelhos com o conjugado O111-citocromo c pela via subcutânea foram bem sucedidos este conjugado foi incorporado em Vaxcine™ (veículo oral carreador de antígenos) e subsequentemente administrado pela via oral. No entanto, os resultados obtidos mostraram que mesmo na presença de Vaxcine™, não foi detectada na mucosa ou no sangue resposta imune humoral contra o polissacarídeo (Figura 18).

Figura 18- Resposta imune humoral induzida pelo conjugado O111-citocromo c

Coelhos foram imunizados pela via subcutânea com o conjugado O111-citocromo c incorporado em Vaxcine™. Camundongos foram imunizados pela via oral com o conjugado O111-citocromo c incorporado em Vaxcine™. Amostras de sangue e fezes foram coletadas dez dias após a última imunização e testadas pela técnica de ELISA para detecção de IgG anti O111.

Desta maneira, outro conjugado foi formulado utilizando BSA como proteína carreadora. Os resultados mostraram que a imunização de camundongos com o conjugado O111-BSA pela via oral, mesmo quando incorporado em Vaxcine™, induziu resposta imune baixa contra o polissacarídeo O111 (Figura 19).

Figura 19- Resposta imune humoral induzida pelo conjugado O111-BSA após imunização oral em camundongos. Diluição do soro (1/40). Diluição das fezes (1/5).

Camundongos foram imunizados pela via oral com o conjugado O111-BSA incorporado em Vaxcine™. Amostras de sangue e fezes foram coletadas dez dias após a última imunização e testadas pela técnica de ELISA para detecção de IgG anti O111.

Consequentemente, o polissacarídeo O111 foi conjugado a proteína recombinante EtxB, que possui a propriedade de quebrar a tolerância oral ao antígeno coadministrado. O conjugado O111-EtxB foi então incorporado em Vaxcine™ e administrado oralmente em camundongos. Os resultados obtidos por ELISA demonstraram que animais imunizados com o conjugado incorporado ou não em Vaxcine™ geraram anticorpos IgG e IgA no sangue e nas fezes contra o polissacarídeo O111, todavia, o nível dos anticorpos foi maior nos animais imunizados com o conjugado incorporado em Vaxcine™ (figuras 20A, 20B, 21A e 21B).

Figura 20- Resposta imune sistêmica contra o polissacarídeo O111, após imunização oral.

Camundongos foram imunizados três vezes pela via oral com os conjugados O111-citocromo c e O111-EtxB, em PBS apenas ou incorporado em Vaccine™. Dez dias após a última imunização amostras do soro e dos animais foram analisadas por ELISA para detecção de anticorpos IgG (A) e IgA(B) contra o polissacarídeo O111.

Figura 21- Resposta imune de mucosa contra o polissacarídeo O111, após imunização oral.

Camundongos foram imunizados três vezes pela via oral com os conjugados O111-citocromo c e O111-EtxB, em PBS apenas ou incorporado em Vaccine™. Dez dias após a última imunização, amostras de fezes dos animais foram analisados por ELISA para detecção de anticorpos IgG (A) e IgA(B) contra o polissacarídeo O111.

Já que o nível de anticorpos sistêmicos gerados pelo conjugado incorporado em Vaccine™ foi superior aos níveis obtidos nos outros grupos experimentais, esses anticorpos foram utilizados no ensaio de aglutinação de tubos, a fim de se determinar a capacidade dos mesmos em reconhecer bactérias vivas. Os resultados mostraram que os anticorpos foram capazes de reconhecer as diferentes categorias de *E. coli* O111. Em contraste, não foram capazes de reconhecer um sorogrupo não correlacionado (O127: H6) (Figura 22).

Figura 22- Título da aglutinação do soro anti O111 com relação a diferentes amostras de *E. coli* diarreiogênicas pertencentes ao sorogrupo O111.

Diluições seriadas dos soros de camundongos imunizados oralmente com conjugado O111-EtxB incorporado em VaxcineTM foram incubados com as amostras O111:H12, O111:H2, O111:H e O127 de *E. coli* diarreiogênicas por 2 horas a 37 °C.

6 DISCUSSÃO

É de conhecimento comum, que o processo de purificação e conjugação de um polissacarídeo com uma proteína deve ser escolhido com muita cautela para evitar perda de partes da molécula e/ou formação de complexos moleculares inadequados. No caso do polissacarídeo O111, não é aconselhável a utilização de ácido acético durante o processo de purificação do LPS, pois este pode reduzir a concentração de colitose que é a parte mais imunogênica da molécula (GUPTA et al., 1995).

Como descrito anteriormente, Gupta e colaboradores (Gupta et al, 1996) demonstraram que a conjugação do polissacarídeo O111 com uma proteína carreadora era capaz de gerar anticorpos contra o polissacarídeo O111, todavia, a capacidade desses anticorpos de reconhecer diferentes categorias de *E. coli* O111 e de inibir a adesão das mesmas as células epiteliais não foi analisada. Sendo assim nesse estudo utilizando ADH como ligante conjugamos o polissacarídeo O111 as seguintes proteínas carreadoras: citocromo C, BSA e EtxB. A construção desses três conjugados teve como intuito determinar a capacidade dos anticorpos gerados pelos conjugados de reconhecer e inibir a adesão de EPEC, STEC e EAEC pertencentes ao sorogrupo O111 a células epiteliais humanas.

6.1 Conjugados O111-citocromo c imunização subcutânea

Utilizamos primeiramente o citocromo c como proteína carreadora por vários motivos: ele é uma molécula muito bem caracterizada e de fácil aquisição, possui 18 resíduos de lisina em sua superfície que são facilmente acessíveis a agentes modificadores e possui coloração alaranjada, que possibilita sua visualização a olho nu durante todo o processo de conjugação. Além disso, pode ser quantificado por espectometria de massa e absorção.

Quanto aos resultados, observamos através da análise de seu perfil em SDS-PAGE que complexos de diferentes massas moleculares foram encontrados na amostra do conjugado, todavia, o mesmo não foi observado na amostra de citocromo C utilizado em forma monomérica. Os resultados obtidos através de cromatografia de exclusão de massa também mostraram que na amostra do conjugado foram

encontros componentes com massas moleculares maiores que as encontradas na amostra de polissacarídeo O111 derivatizado (O111-ADH). Esse fato, provavelmente está relacionado com a tendência das moléculas de citocromo c durante a conjugação formarem polímeros. Essa característica do citocromo c foi bem ilustrada por Chu Y. e Whitesides (1993) que conjugaram citocromo c com maltohexoses. A formação de complexos moleculares formados por polímeros de citocromo c e moléculas de polissacarídeo O111 no conjugado é auspiciosa, pois o citocromo c em sua forma polimérica é muito mais imunogênico que em forma de monômeros.

Para testar a resposta imune induzida pelo conjugado O111-citocromo c escolhemos o coelho como modelo animal devido ao fato do volume de soro por animal, ser maior que o volume obtido em camundongos, o que resulta em número menor de animais por grupo experimental. Em acréscimo, como primeiro grupo experimental utilizamos a via parenteral, pois a mesma evita as desvantagens da administração por gavagem. As nanopartículas mesoporosas de sílica SBA-15 foram utilizadas como adjuvante pelo fato de serem excelentes adjuvantes parenterais, sendo que para vários antígenos são capazes de induzir uma resposta imune humoral maior que a obtida pela imunização dos animais com o antígeno na presença de hidróxido de alumínio ou de adjuvante incompleto de Freund.

Quanto à resposta imune gerada pelo conjugado O111-citocromo c, os resultados mostraram que na presença de sílica SBA-15 o conjugado gerou anticorpos capazes de reconhecer todas as categorias de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 mas não a de um sorogrupo não relacionado como o O127. Dados semelhantes aos nossos foram obtidos por Paton et al, 1998, que demonstraram que anticorpos contra *E. coli* O157:H7 foram capazes de inibir a adesão a células epiteliais do intestino de cepas pertencentes a esse sorogrupo mas não cepas pertencentes a um sorogrupo heterólogo.

Os resultados também demonstraram que a resposta obtida com o conjugado O111-citocromo c foi longa (até um ano após a imunização). Esse resultado é de grande significância em termos de vacinação desde que uma longa e eficiente resposta humoral é fundamental na proteção de crianças menores de dois anos de idade independentemente da presença de memória imunológica (BLANCHARD-ROHNER; POLLARD, 2011; McVERNON et al., 2003; TRUCK; POLLARD, 2010).

Demonstramos também que esses anticorpos também foram capazes de inibir a adesão de cepas de *E. coli* O111 pseudocapsuladas como por exemplo a cepa O111:H2 à células epiteliais. Nesse caso, a resposta se torna ainda mais importante desde que anticorpos gerados contra o polissacarídeo O111 da membrana de *E. coli* não são capazes de reconhecer eficientemente *E. coli* pseudocapsuladas. Esse fato foi elegantemente demonstrado por Goldman e colaboradores (1982) que mostraram que anticorpos gerados por uma *E. coli* cuja capsula foi retirada, não reconhecem eficientemente a mesma bactéria com a pseudocápsula.

Em acréscimo, observamos em nosso laboratório que anticorpos anti O111 na presença de complemento aumenta a fagocitose de *E. coli* O111 pseudocapsuladas por macrófagos (SANTOS et al., 2010). Esses resultados aumentam a importância dos anticorpos anti O111 no combate de *E. coli* pertencentes a esse sorogrupo desde que a presença de capsula também é um importante fator de evasão desses patógenos contra o sistema imune inato do organismo. Por essa razão, vacinas conjugadas contra patógenos entéricos capsulados foram construídas, uma delas é a vacina conjugada capsular contra *Campylobacter jejuni*, que no momento está em fase de ensaio clínico em humanos (MONTEIRO, 2009).

6.2 Imunização oral

Uma vez que os resultados obtidos através da imunização de coelhos com o conjugado O111-citocromo c pela via subcutânea foram bem sucedidos este conjugado foi incorporado em Vaxcine™ (veículo oral carreador de antígenos) e subsequentemente administrado pela via oral. No entanto, os resultados obtidos mostraram que mesmo na presença de Vaxcine™, não foi detectada na mucosa ou no sangue resposta imune humoral contra o polissacarídeo.

Desta maneira, outro conjugado foi formulado utilizando BSA como proteína carreadora, desde que o BSA é uma proteína bem caracterizada e de massa molecular muito maior que o citocromo c em sua forma monomérica. No entanto, os resultados mostraram que a imunização de camundongos com o conjugado O111-BSA pela via oral, mesmo quando incorporado em Vaxcine™, induziu resposta imune baixa contra o polissacarídeo O111.

Consequentemente, o polissacarídeo O111 foi conjugado a proteína recombinante EtxB, que possui a propriedade de quebrar a tolerância oral ao antígeno coadministrado (referencia). O conjugado O111-EtxB foi então incorporado em Vaxcine™ e administrado oralmente em camundongos.

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que de todas as formulações orais testadas pela via oral os melhores resultados foram obtidos com o conjugado O111-EtxB cujos resultados demonstraram que mesmo sem o auxílio do veículo oral carreador de antígenos (Vaxcine™) foi capaz de resistir a passagem pelo sistema gastro intestinal e quebrar a tolerância oral ao antígeno coadministrado. Todavia, a presença de Vaxcine™ resultou num aumento significativo da resposta humoral. Este efeito adjuvante de Vaxcine™ está provavelmente relacionado à sua propriedade de direcionar o antígeno às células M das Placas de Peyer que são os sítios imunodominantes do intestino (DOMINGOS et al., 2008).

Em acréscimo, o conjugado O111-EtxB foi o único entre vários outros conjugados testados por nós, com capacidade de induzir resposta imune humoral sistêmica e de mucosa contra todas as categorias de *E. coli* O111. Estes resultados indicam que o conjugado O111-EtxB é capaz de gerar duas linhas de defesa contra *E. coli* O111, uma no local que protege o organismo contra colonização passo que precede a infecção, e outra sistêmica que defende o organismo contra patógenos que ultrapassam a barreira da mucosa. Além disso, Mackelin e colaboradores (2003) demonstraram que a imunidade sistêmica também pode auxiliar a proteção local desde que observaram que a maioria das moléculas de IgG intestinal são derivadas de transudato do sangue. Por isso, em termos de proteção, uma resposta humoral sistêmica é muito importante já que forma uma segunda linha de defesa contra patógenos entéricos. Esse fato está provavelmente relacionado à eficácia das vacinas conjugadas parenterais contra *Shigella*, cólera e *Salmonella typhi* (McGREGOR et al., 2013; SEALE; FINN, 2011; STEELE et al., 2012).

Em resumo, os dados apresentados sugerem que é viável o desenvolvimento de uma vacina universal contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111. Os resultados também indicam que por ser conjugada a vacina poderá ser administrada a crianças menores de 2 anos de idade, que são as mais acometidas por doenças diarreicas e, por ser oral, poderá ser distribuída facilmente à populações carentes localizadas em áreas de difícil acesso, como por exemplo, regiões

ribeirinhas do norte do país onde os residentes chegam a viajar dois dias de barco para chegarem a um posto de atendimento.

Com os resultados obtidos neste estudo também podemos “hipotetizar” que essa vacina poderá ser eficaz contra outras espécies de patógenos como a *Samonella greenville* e a *Salmonella Adelaide* cujo antígeno O35 é idêntico ao polissacarídeo O111 de *E. coli* (KENNE, 1983).

Todavia, muito trabalho ainda deve ser realizado para que uma vacina universal contra *E. coli* O111 seja desenvolvida. No presente estudo seria necessário testar moléculas carreadoras com maior habilidade de quebrar a tolerância oral, desde que já foi demonstrado que a EtxB apesar de induzir após administração oral resposta imune humoral sistêmica e de mucosa ao antígeno coadministrado tem um poder adjuvante mais fraco quando comparada a outras recombinantes como a LTR72 (GIULIANI et al., 1998).

Dessa maneira, podemos apenas considerar que os dados desse estudo abrem uma nova perspectiva para o desenvolvimento de uma vacina entérica contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o polissacarídeo O111 é um bom candidato a antígeno na construção de uma vacina conjugada contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111.

A utilização da proteína recombinante EtxB na formulação de uma vacina conjugada oral utilizando Vaxcine como veículo carreador de antígeno é capaz de induzir resposta humoral sistêmica e de mucosa contra diferentes categorias de *E. coli* O111.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx- genetic profile. **Diag. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.
- ALVES, R. C. B. et al. Vaxcine™: na oil-based adjuvant for influenza vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 1052-1054, 2011.
- BALNCHARD-ROHNER, G.; POLLARD, A. J. Long-term protection after immunization with protei-polysaccharide conjugate vaccines in infancy. **Expert Review of Vaccines**, v.10, p. 673-684, 2011.
- BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a Microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 671-676, 2011.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93-99, 1987.
- BROOKS, J. T. et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8. Infections among attendees of a high school cheerleading camp. **Clin. Infect Dis.**, v. 38, p. 190-198, 2004.
- CALDERON, V. E. et al. Outbreak caused by cad-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111, Oklahoma. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 107-109, 2010.
- CALIN, O. et. al. Total Synthesis of the *Escherichia coli* O111 O-Specific Polysaccharide Repeating Unit. **Chem. Eur. J.**, v. 19, p. 3995-4002, 2013.
- CAMPOS, L. C. et al. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282-3288, 1994.
- CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the Traditional Enteropathogenic *E.coli* O serogroups- A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 545-552, 2004.
- CAPRIOLI, A. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v. 36, p. 289–311, 2005.

* De acordo com:

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

CARVALHO, L. V. et al. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, p. 7829-7836, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2011. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/rotavirus/default.htm>>. Acesso 12 de fev de 2012.

CHU, Y.; WHITESIDES, G. M. Preparation of Conjugates of Proteins with Amyloses by Elongation of Covalently Attached Primers Using Glycogen Phosphorylase a1. **Bioorganic Chemistry**, v. 21, p. 319-329, 1993.

CLARKE, S. C. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, v. 3, p. 365-378, 2003.

CLEMENS, J. Evaluation of vaccines against enteric infections: a clinical and public health research agenda for developing countries. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 366: p. 2799-2805, 2011.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes.**, v. 2, p. 71-87, 2012.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature**, v. 8, p. 26-38, 2010.

DAGAN, R.; POOLMAN, J.; SIERGRIST, C. A. Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review. **Vaccine**, v. 28, p. 5513-5523, 2010.

DAUTIN, N. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. **Toxins**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DOMINGOS, M. O.; SANT'ANNA, O. A. Vacinas. In: ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.16, p. 137-142.

DOMINGOS, M. O. et al. A new oil-based antigen delivery formulation for both oral and parenteral vaccination. **The Open Drug Delivery Journal**, v. 2, p. 52-60, 2008.

DOMINGOS, M. O. et al. Influence of the A and B subunits of cholera toxin (CT) and *Escherichia coli* toxin (LT) on TNF-alpha release from macrophages. **Toxicon**, v. 5, p. 570-577, 2009.

DONNENBERG, M.S. Infections due to *E. coli* and other enteric Gram-negative bacilli. **ACP Medicine**, p. 1-10, 2010.

ELLIOTT, E. J. et al. Nationwide Study of Haemolytic Uraemic Syndrome: clinical, microbiological and epidemiological features. **Arch. Dis. Child.**, v. 85, p. 125-131, 2001.

EWING, W. H. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. **Elsevier Science Publishing Co.**, New York, NY, 1986.

FINGERUT, E. et al. subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 112, p. 253-263, 2006.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 84-94, 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, p. 359-363, 2005.

FRASCH, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide protein conjugates: analytical and manufacturing challenges. **Vaccine**, v. 46, p. 6468-6470, 2009.

FRASER, S. A. et al. Mutant *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin B Subunit That Separates Toxoid-Mediated Signaling and Immunomodulatory Action from Trafficking and Delivery Functions. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 127-1537, 2003.

FOOD SAFETY NEWS (FSN). Four deaths in *E. coli* O111 outbreak in Japan. 2011. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2011/05/two-deaths-in-e-coli-o111-outbreak-in-japan/>>. Acesso: 25 out 2011.

FUKUSHIMA, H.; KEN, H.; GOMYODA, M. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in bovine feces. **Appl. Environmental Microbiol.**, v. 65, p. 5177-5181, 1999.

GALLEGOS, K. M. Shiga toxin binding to glycolipids and glycans. **PloS ONE**, v. 07, p. 01-10, 2012.

GERBER, A. et al. Clinical course and the role of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection in the hemolytic-uremic syndrome in pediatric patients, 1997-2000, in Germany and Austria: a prospect study. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 493-500, 2002.

GIANNELA, 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, p. 173-181, 1995.

GIRARD, M. P. et al. A review of vaccine research and development: human enteric infections. **Vaccine**, v. 24, p. 2732-3750, 2006.

GIULIANI, M. M. et al. Mucosal Adjuvant activity and Immunogenicity of LTR72, a Novel Mutant of *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin with Partial Knockout of ADP-ribosyltransferase Activity. **J. Esp. Med.**, v. 187, p. 1123-1132, 1998.

GOLDMAN, L. C. D. et al. A surface polysaccharide of *Escherichia coli* O111 contains O-antigens and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. **J. Bacteriol.**, v. 151, p. 1210-1221, 1982.

GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 331-7, 1991.

GOMES, T. A. T.; GONZÁLEZ- PEGRAJO, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 25-47, 2010.

GONZÁLEZ-FERNANDEZ, A.; FARO, J.; FERNÁNDEZ, C. Immune responses to polysaccharides: lessons from humans and mice. **Vaccine**, v. 26(3), p. 292-30, 2008.

GUPTA, R. K. et al. Comparative Immunogenicity of Conjugates Composed of *Escherichia coli* O111 O-Specific Polysaccharide, Prepared by Treatment with Acetic Acid pr Hydrazine, Bound to Tetanus Toxoid by Two Synthetic Schemes. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2805-2810, 1995.

GUTH, B. E. C. et al. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 65-83, 2010.

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

HAAN, L.; HIRST, T. R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 21, p. 77-92, 2004.

HARRINGTON, S. M. et al. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HITCHOCK, P. J.; BROWN, T. M. Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes and Silver staining polyacrylamide gels. **J Bacteriol.**, v. 154, p. 269-77, 1983.

IGUCHI, A. et al. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 347-354, 2009

ISIDEAN, S. D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**, v. 29, p. 6167-6178, 2011.

JOHNSON, R. P. et al. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, p. 201-215, 2008.

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

KATO, K. et al. Outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 among high school participants in excursion to Korea. **J. Infect. Dis.**, v. 58, p. 332-333, 2005.

KAUR, P. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 1-10, 2010.

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

LINDBLAD E. B. Aluminium adjuvants, in *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Stewart-Tull, D. E. S., Ed.) Wiley, Chichester, 1995; 21-35.

MECKELIN, B. et al. Contribution of serum immunoglobulin transudate to the antibody immune status of murine intestinal secretions: influence of different sampling procedures. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 831-834, 2003.

MERCURI, L. P. et al. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response. **Small**, v. 2, p. 254-256, 2006.

MILLAR, D. G.; HIRST, T. R.; SNIDER, D. P. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infect. Immun.**, v. 5, p. 3476–3482, 2001.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

McVERION, J. et al. Immunologic memory with no detectable bactericidal antibody response to a first dose of meningococcal serogroup C conjugate vaccine at four years. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 22, p. 659-661, 2003.

McGREGOR, A. C. et al. Prospects for prevention of *Salmonella* infection in children through vaccination. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 254-262, 2013.

MONTEIRO, M.A. Capsule Polysaccharide Conjugate Vaccine against Diarrheal Disease Caused by *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.**, p. 1128-1136, 2009.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORA, A. et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-11, 2009.

MORABITO, S. et al. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of Hemolytic Uremic Syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 840-842, 1998.

MOULIN-SCHOULER, M. et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p. 3484-3492, 2006.

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

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative *E. coli*. **Gut Microbes**, v. 2, p. 13-24, 2011.

NGUYEN, Y.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Cell. Infect. Microbiol.**, v. 02, p. 01-07, 2012.

OCHOA, T. J. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102(9), p. 852–856, 2008.

OHLAND, C. L. et al. *Escherichia coli*-induced epithelial hyporesponsiveness to secretagogues is associated with altered CFTR localization. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 447-459, 2012.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. Pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p. 125-136, 2005.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 252, p. 11-18, 2005.

PATON, A. W. et al. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 21, p. 57-63, 1998.

PETROVSKY, N.; COOPER, P. D. Carbohydrate-based immune adjuvants. **Expert Rev. Vaccines**, v. 10, p. 523-537, 2011.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD): PNUD: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento: Falta de esgoto mata 1 criança a cada 19s. 2006. Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/saneamento/reportagens/index.php?id01=2392&lay=san>>. Acesso em 12 out de 2011.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD): Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento: Brasil dificilmente alcançara ODM de esgoto. 2008. Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/saneamento/reportagens/index.php?id01=3004&lay=san>>. Acesso em 12 out de 2011.

POLLARD, A. J.; PERRETT, K. P.; BEVERLEY, P. C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. **Nat Rev Immunol.**, v. 09, p. 213-220, 2009.

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.

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

RUSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SANTOS, M. F. et al. Lipopolysaccharide as an antigen target for the formulation of a universal vaccine against *Escherichia coli* O111 strains. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 11, p.1772-80, 2010.

SEALE, A.; FINN, A. What is the best way to use conjugate vaccines? **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 24, p. 219-224, 2011.

SCALETSKY, I. C. A. et al. A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, nº 07, p. 3410-3415, 1999.

SCARAMUZZI, K. et al. Utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações com a vacina para hepatite B. **Einstein**, v. 9, p. 436-441, 2011

SCHEUTZ, F. et al. Nomenclature of verotoxins. In: DUFFY, G.; GARVEY, P.; MACDOWELL, D.A. Verocytotoxigenic *E. coli*. Trmbull: **Food and Nutrition Press**, p. 447-452, 2001.

SILVA, J.A.; SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Echerichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Rev. Patol. Trop.**, v. 34, p. 175-196, 2005.

SPANO, L. C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute Diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 359–363, 2008.

STEELE, D. et al. Vaccines for enteric diseases: a meeting summary. **Expert Rev. Vaccines.**, v.11, p. 407-409, 2012.

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

VAZ, T. M. I. et al. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, p. 903-905, 2004.

TRABULSI, L. R. et al. Epidemiology of infantile bacterial diarrheal disease in Brazil. **Bacterial Diseases**, p. 25-35, 1985.

TRUCK, J.; POLLARD, A. J. Challenges in immunization against bacterial infection in children. **Early Human Development** ., v. 86, p. 695-701, 2010.

VICTORA, C. G. Mortalidade por diarreia. **Jornal de Pediatria**, v. 85, p. 03-05, 2009.

UNICEF (The United Nations Children`s Fund). Pneumonia and diarrhea. Tackling the deadliest diseases for the world`s poorest children. p. 1-86, 2012.

UNICEF (The United Nations Children`s Fund), WHO (World Health Organization) Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, p. 1-68, 2009.

WAGNER, A.; WIEDERMANN, U. Travellers' diarrhoea – pros and cons of different prophylactic measures. *Wien Klin Wochenschr.*, v. 121, p. 03-18, 2009.

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 4-8, 2007.

WIGHT, J. P. et al. Outbreaks of food poisoning adults due to *Escherichia coli* O111 and campylobacter associated with coach trips to Northern France. **Epidemiol. Infect.**, v. 119, p. 9-14, 2007.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). Diarrhoeal disease. Initiative for Vaccine Research (IVR) 2009. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/>. Acesso em: 15 fev 2012.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO): Diarrhoeal disease. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

WILLIAMS, N. A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins B subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 4-5, p. 447–453, 2000.

WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 08-24, 2010. 2010.

WOODROW, K. A.; BENNETT, K. M.; LO, D. Mucosal vaccine design and delivery. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 14, p. 17-46, 2012.