

PRISCILA APARECIDA DAL POZO GOMES

Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira.

Coorientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira

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)

RESUMO

GOMES, P. A. D. P. **Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC).** 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A toxina de Shiga (Stx), produzida por linhagens de *Escherichia coli* (STEC), pode ocasionar diarreia, colite hemorrágica e, em alguns casos, a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) em humanos. A Stx2 é uma toxina do tipo AB5 composta de uma subunidade A monomérica e uma subunidade B pentamérica. A subunidade A é consiste em duas porções: o domínio A1 com atividade enzimática relacionada com a inibição da síntese proteica nas células humanas e o domínio A2 atóxico que conecta a porção A1 à subunidade B, envolvida na ligação ao receptor glicolipídico encontrado na superfície das células alvo. Neste estudo avaliamos o potencial imunogênico de uma forma recombinante atóxica da Stx2 (Stx2 Δ AB) constituída pela subunidade B e o fragmento A2 como estratégia para o desenvolvimento de uma vacina voltada para imunoproteção contra a SHU. A proteína Stx2 Δ AB foi administrada em camundongos combinada a diferentes adjuvantes: a toxina termo-lábil (LT), oriunda de linhagens de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a flagelina FliCi de *Salmonella entérica* – Typhimurium e hidróxido de alumínio. Cada animal recebeu quatro doses pela via subcutânea com 25 μ g da proteína Stx2 Δ AB em combinação com um dos adjuvantes mencionados acima. Adicionalment o efeito do adjuvante de Freund foi avaliado, sendo um grupo imunizado com CFA / IFA e o outro apenas com IFA em cada dose. Adicionalmente testamos a influência conformacional da proteína na proteção, imunizando os animais com a toxina desnaturada pelo aquecimento, juntamente com adjuvante completo/incompleto de Freund. O estudo revelou que os títulos séricos de IgG anti-Stx nos animais imunizados com o adjuvante de Freund foram os mais elevados, sendo mais proeminentes para ambas subclasses IgG1 e IgG2a. Adicionalmente, 77% dos animais vacinados com a preparação (CFA / IFA) ficaram protegidos após desafio com a dose letal da holotoxina Stx2, índice de proteção de 40% foi atingindo com o uso do adjuvante IFA. Animais imunizados com o toxóide desnaturado não apresentaram proteção, apesar dos elevados títulos séricos alcançados. Os resultados demonstram o potencial protetor do antígeno vacinal como vacina de subunidade e a importância da conformação da proteína na proteção. Os resultados suportam futuras avaliações da Stx2 Δ AB em formulações vacinais ou imunoterapia para o controle da SHU em humanos.

Palavras-chave: Toxina de Shiga. STEC. Adjuvantes. Síndrome Hemolítica Urêmica. Vacina.

ABSTRACT

GOMES, P. A. D. P. **Development of new vaccine approaches against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) based on nontoxic variants of the Stx2 toxin of Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC)**. 2013. 118 p. Thesis (Ph. D. Thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The Shiga toxin (Stx) produced by *Escherichia coli* (STEC), has been shown to cause diarrhea, hemorrhagic colitis and in some cases, Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) in humans. Stx2 is an AB5-type toxin composed of a catalytic A subunit monomer and a B subunit pentamer. The A subunit consists of two parts: the A1 domain with enzymatic activity related to inhibition of protein synthesis in human cells and the nontoxic A2 domain that connects the A1 moiety to the B subunit, involved in binding to the glycolipid receptor found on the surface of target cells. In this study we evaluated the immunogenic potential of a non toxic recombinant form of Stx2 (Stx2 Δ AB) consisting of the B subunit and the A2 fragment as a strategy for vaccine development focused on immunoprotection against HUS. The Stx2 Δ AB protein was administered to mice in combination with different adjuvants: the heat-labile toxin (LT), derived from enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains, the flagellin FliC_i of *Salmonella enteric*-Typhimurium, aluminum hydroxide. Each animal receive four subcutaneous doses of 25 μ g of Stx2 Δ AB in combination with one of the above mentioned adjuvants. Also, the effect of Freund's adjuvants was assessed, whereby one group receive CFA / IFA and the other only IFA in each dose. Additionally we tested the influence of protein conformation on protection, immunizing the animals with the denatured toxin by heating, along with complete (CFA) / incomplete (IFA) Freund adjuvant. The study identified the animals immunized with Freund's adjuvant to produce the highest anti-Stx IgG serum titers, with both IgG1 and IgG2a being the dominant subclasses. Additionally, 77% of the animals vaccinated with the preparation (CFA / IFA) were protected after challenge with a lethal dose of Stx2 holotoxin, while 40% protection was achieved with the use of IFA adjuvant. Animals immunized with the denatured toxoid showed no protection, despite the high serum titers produced. The results show the potential protective effect of the Stx2 Δ AB vaccine regimen and also reveals the importance of protein conformation on the induction of immunoprotection. The present results support future assessments of Stx2 Δ AB in vaccine formulations or immunotherapy for the control of HUS in humans.

Keywords: Shiga toxin. STEC. Adjuvants. Hemolytic Uremic Syndrome. Vaccine.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A descoberta da Síndrome Hemolítica Urêmica: um novo desafio para a saúde pública.

Os primeiros relatos de casos fatais em crianças com sintomas similares e característicos de uma síndrome como: forte anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda, foram descritos em 1955 na Europa, entretanto, naquela época sua etiologia era desconhecida. (GASSER et al., 1955). Alguns anos depois, em 1964, na América do Sul, o médico e pesquisador argentino Gianantonio observou os mesmos sintomas em 58 crianças em um hospital infantil em Buenos Aires, denominando-a naquele momento de Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), porém não foi esclarecido se os sinais clínicos apresentados caracterizavam uma mesma doença ou outras patologias que apresentavam sintomas similares. Em 1975 no Canadá foram descritos casos semelhantes de SHU e a partir de estudos epidemiológicos entre familiares, concluíram que se tratava de uma doença infecciosa (KAPLAN et al., 1975). Dois anos depois, uma nova citotoxina foi descrita em filtrados de culturas de *Escherichia coli*, obtidas de isolados clínicos de casos de diarreia infantil e em suíno, esta apresentava efeitos citotóxicos em células Vero distintos aos das toxinas LT (termo-lábel) e ST (termo-estável), sendo então denominada de VT (Verotoxina) (KONOWALCHUK, 1977).

A etiologia da SHU foi esclarecida somente alguns anos depois com a associação da produção da citotoxina produzida pelas linhagens de *Escherichia coli* com os sintomas da doença (KARMALI et al., 1983). No mesmo ano, surgiram surtos de colite hemorrágica e SHU, inicialmente foram associados ao consumo de carne (hambúrgueres) mal cozida servida em uma rede de “fast-food” (RILEY et al., 1983), os casos se sucederam em diferentes locais nos Estados Unidos e também em outros países como Canadá, Europa e Japão causando preocupação (SMITH e SCOTLAND, 1988). Uma característica comum nestes surtos era a presença de uma linhagem com um perfil sorológico considerado raro na época, o sorotipo O157:H7. No mesmo período constatou-se que a propriedade tóxica da *E. coli* O157:H7 era semelhante à linhagem de *Shigella dysenteriae* tipo I, esta toxina, portanto, passou a ser denominada

de “Shiga-like toxin” (O’BRIEN et al., 1983; KARMALI, 1989). Atualmente a toxina de Shiga e as linhagens bacterianas produtoras foram então denominadas de *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC), sendo as EHEC um subgrupo. Há mais de um século se conhece os efeitos da toxina de Shiga produzida pela bactéria do gênero *Shigella* (O’ BRIEN e HOLMES, 1987), a descrição de uma toxina produzida por *E. coli* com ação semelhante despertou o interesse e os esforços para caracterizar este novo problema de saúde pública. Estas observações formaram a base do nosso atual entendimento da SHU, gerando esforços multidisciplinares para prevenir e tratar a doença causada por este sorotipo virulento de *E. coli*.

1.2 Mecanismos de colonização e entrada da Stx na circulação.

A maioria dos casos de SHU inicia-se com a ingestão da bactéria presente em alimentos ou água contaminada (HUSSEIN, 2007), a dose de infecção, particularmente para o sorotipo O157:H7, é muito baixa (< 100 UFC) e a patogênese complexa (PATON e PATON, 1998, OBRIG, 2010). Após a ingestão, a bactéria atravessa o ambiente ácido do estômago e coloniza a mucosa intestinal induzindo uma lesão histopatológica definida como “attaching and effacing” (A/E), esta lesão é caracterizada por mudanças no citoesqueleto devido a acumulação de filamentos de actina polimerizada abaixo da bactéria, suprimindo as microvilosidades das células intestinais, isto ocasiona a formação de um pedestal, local onde a bactéria se adere intimamente (HACKER et al., 1997). Este complexo mecanismo de adesão, característico das *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) e enterohemorrágicas (EHEC), é governado por uma grande ilha de patogenicidade definida como região LEE (Locus of Enterocyte Effacement). A região LEE codifica as proteínas responsáveis pelo aparato secretor do tipo III (TTSS), as principais proteínas de montagem, (EspA, B e D), a intimina, principal adesina bacteriana e seu próprio receptor Tir (Translocated Intimin Receptor), trata-se de uma proteína transmembrana inserida dentro da membrana celular do hospedeiro pelo TTSS.

Além do Tir, outras duas proteínas eucariótica localizada na superfície das células funcionam como receptores para a intimina (SINCLAIR e O’BRIEN, 2004), uma

é a Beta-1 integrina (FRANKEL et al., 1996) e a outra é denominada de nucleolina, esta ocorre em abundância no núcleo e possui como função primária a biogênese do ribossomo, entretanto ela pode ser expressa na superfície celular. Pesquisas recentes demonstraram que a produção da Stx na mucosa intestinal aumenta a síntese de nucleolina eucariótica, isto eleva o número de receptores disponíveis para a adesão da EHEC antes da translocação do Tir, aumentando a efetividade da infecção (ROBINSON et al., 2006). Algumas STEC não contém a região LEE, como exemplo a O113:H21 que produz uma adesina denominada *saa* desempenhando papel na colonização da mucosa intestinal (PATON e PATON, 1998).

No lúmen intestinal a bactéria inicia a liberação da toxina Stx, esta atravessa o epitélio intestinal, cai na corrente sanguínea e liga-se a células que expressam quantidades elevadas do receptor específico. O mecanismo pelo qual a toxina Stx tem acesso a circulação sistêmica é objeto de estudo, evidências recentes mostram que a passagem pela barreira intestinal ocorre via rota celular, através da transcitose (LUKYANENKO et al., 2011). A colonização por EHEC estimula a macropinocitose, o que significativamente aumenta a captação de Stx e sua subsequente transcitose, Demonstrou-se que o remodelamento dos filamentos de actina, que ocorre no local da lesão A/E, também acontece globalmente na superfície celular, provendo assim uma rota para a disseminação sistêmica da holotoxina, contrapondo com o baixo conteúdo do receptor nos enterócitos (ZUMBRUN et al., 2010), ao longo do processo a toxina mantém sua integridade (LUKYANENKO et al., 2011).

Outro fator que contribui para a disseminação da toxina está associado à resposta inflamatória na lâmina própria intestinal, neste ambiente a presença da toxina Stx desencadeia a produção de quimiocinas pelas células epiteliais ou macrófagos residentes, levando ao influxo de células inflamatórias ao local, promovendo a injúria e causando hemorragia intestinal, este dano permite o acesso da Stx à corrente sanguínea, circulando livremente ou ligada aos polimorfonucleares (PMN), sendo então, distribuída aos órgãos-alvos (KING, 2002). Durante todo o processo infeccioso a EHEC não invade o organismo permanecendo aderida ao epitélio intestinal.

1.3 A patogênese da toxina de Shiga.

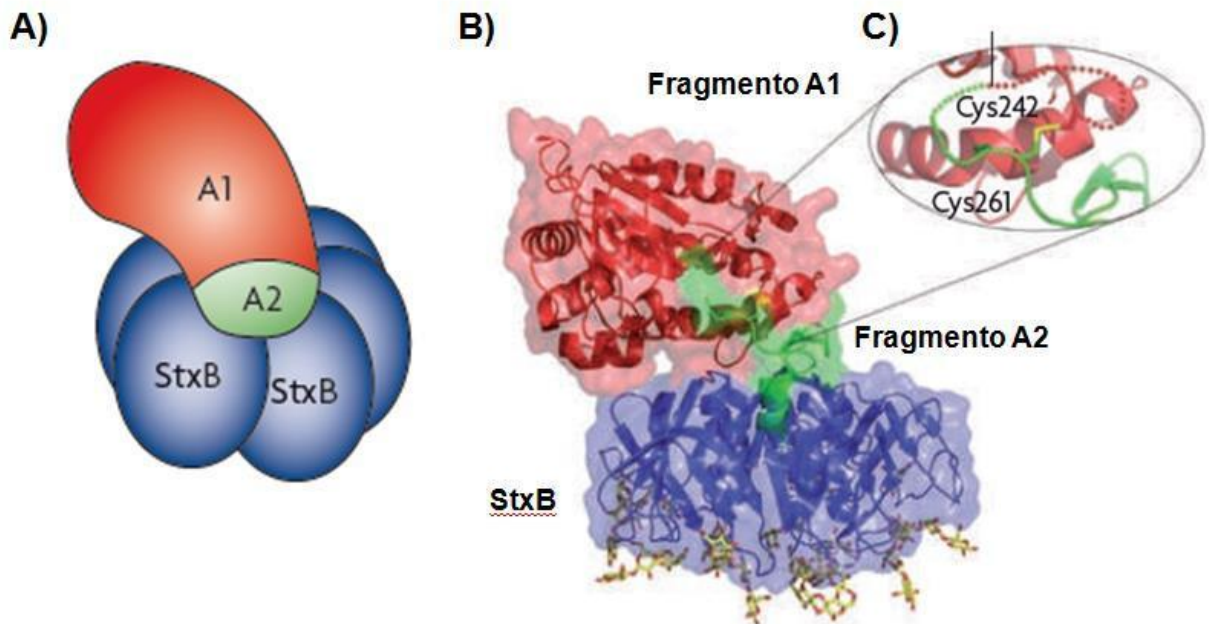
A toxina Stx é caracterizada por ser uma toxina do tipo AB₅, isto é, uma toxina formada por duas subunidades independentes com estrutura e função própria. A subunidade A é responsável pelos efeitos tóxicos no organismo, promovendo o bloqueio da síntese proteica, possuindo atividade de RNA N-glycosidase, clivando uma base de adenina na posição 4324 da subunidade ribossomal 28S, inativando a alongação proteica. Durante o trânsito intracelular, a subunidade A é clivada em dois fragmentos (A1 e A2) sendo que a atividade tóxica está relacionada à subunidade A1. A segunda porção, ou domínio ligante da toxina Stx é representada por cinco subunidades B que se organizam na forma de um barril no qual se encaixa a subunidade A tóxica (Figura 1). As subunidades B têm como função o reconhecimento e a ligação a um receptor celular glicolipídico, denominado Gb₃ (globotriaosil ceramida Gal α [1-4]Gal β [1-4]glicosil ceramida), com exceção da variante Stx2e que liga preferencialmente ao Gb₄. (PATON et al., 2000; FRASER et al., 2004). O receptor Gb3 é encontrado na superfície de muitas células do corpo, como no epitélio do intestino delgado, mas é particularmente abundante em células de endotélio microvascular renal e cerebral, assim como no pâncreas e pulmões (BIELASZEWSKA et al., 1997, OBRIG, 2010, PATON et al., 2000),

A resposta inflamatória do hospedeiro potencializa a toxicidade da Stx. Inicialmente notou-se uma ação sinérgica entre a toxina de Shiga e o fator de necrose tumoral (TNF) em células endoteliais das veias umbilicais humanas (LOUISE e OBRIG, 1991), e células do endotélio cerebral (EISENHAUER, et al., 2001), este mesmo efeito foi observado com a presença de LPS e Stx, esse mecanismo deve-se ao fato de LPS induzir a expressão de interleucinas e TNF pelos macrófagos (LOUISE e OBRIG, 1992). A maneira como estes mediadores inflamatórios aumentam a citotoxicidade é estimulando a síntese de Gb3 nas células endoteliais, isto ocorre pela indução da atividade da galactosil-transferase (VAN DE KAR et al., 1995, EISENHAUER, et al., 2001), as interleucinas (IL-1 α , IL-1 β) agem pelo mesmo mecanismo, porém em menor extensão (VAN DE KAR et al., 1992, EISENHAUER, et al., 2001) estes mediadores

inflamatórios apresentaram o mesmo efeito em células mesangiais (SIMON et al., 1998).

De fato, a toxina Stx em concentrações subinibitórias, também demonstrou capacidade de mediar a resposta inflamatória aumentando a transcrição de vários genes envolvidos na produção de quimiocinas, citocinas e fatores de transcrição envolvidos na resposta imune e apoptose (MATUSSEK et al., 2003).

Figura 1- Estrutura da Toxina de Shiga



A) Ilustração da toxina de Shiga, demonstrando a subunidade A, a qual é clivada nos fragmentos A1 e A2, a subunidade B pentamérica. B) Diagrama da toxina de Shiga, destacando os sítios de ligação ao receptor Gb3 na subunidade B. C) Destaque para o sítio de clivagem da subunidade A gerando os fragmentos A1 e A2.

Fonte: Adaptado de Johannes e Romer (2009)

1.4 Epidemiologia e progressão das infecções com linhagens de STEC

A SHU caracteriza-se por surtos ou casos isolados, com o aumento crescente de casos da doença a preocupação relacionada à segurança dos alimentos aumentou, sendo que, em todo o mundo a *E. coli* O157:H7 e demais sorogrupos que causaram doenças em humanos, foram isolados com maior prevalência de carnes de gado e derivados, especialmente carne moída. Além da ingestão de carne bovina crua ou mal passada outros alimentos, como frutas, vegetais, água e contato pessoal são fontes alternativas de infecção para os seres humanos (HUSSEIN, 2007), de fato, muitas pessoas podem albergar EHEC como parte da sua microflora transiente sem apresentar sinais da doença (CAPRIOLI et al., 2005). Estudos avaliando a presença de STEC na pecuária são realizados em todo o mundo. Na América do Norte, Europa e Oceania, STEC é isolada tanto no gado de corte como no leiteiro (CAPRIOLI et al., 2005), sendo prevalente também no Brasil (OLIVEIRA et al., 2008, TIMM et al., 2007), outros animais ruminantes também podem ser vetores de STEC (CAPRIOLI et al., 2005). A ocorrência pode ser minimizada pela aplicação de técnicas com alto padrão de higiene em todas as etapas da cadeia de produção de alimentos.

As maiores vítimas são crianças menores de 5 anos e idosos, sendo a principal causa de falência renal aguda em crianças nos EUA (EKLUND et al., 2002) e Argentina, e respondem por 20% dos casos de transplantes renais na Argentina tanto em crianças como em adolescentes (EXENI, 2001). O primeiro sintoma, a colite hemorrágica é caracterizada por diarreia com presença de sangue nas fezes, fortes dores abdominais, febre e vômitos (HUSSEIN, 2007). As lesões mais graves, característica da SHU, estão associadas à presença da toxina na circulação sanguínea, causando, falência renal aguda, anemia hemolítica microangiopática e trombocitopenia (PATON et al., 2001). Uma fração significativa dos indivíduos infectados (aproximadamente 25%) podem apresentar sequelas como: disfunção renal crônica, hipertensão, crise convulsiva, cefaleia severa, cegueira, paralisia, letargia e diabetes (PATON e PATON, 1998, NATARO e KAPER, 1998). A SHU normalmente é uma condição ameaçadora à vida e a letalidade pode chegar a mais de 6% e, entre idosos, pode atingir a 50% dos indivíduos infectados (CDC 2006, 2009). Os pacientes mais

severamente afetados requerem transfusões de sangue e terapia com diálise (diálise peritoneal e hemodiálise) que apesar de reduzirem a mortalidade não extingue a possibilidade de sequelas (JOHANNES e ROMER, 2010).

O intervalo entre a ingestão do veículo contaminado e o início da diarreia é em média 3 dias, inicialmente não há presença de sangue nas fezes, porém, em mais 2-3 dias, torna-se sanguinolenta em 90% dos casos (TARR et al., 2005, OBRIG, 2010). Os sintomas da SHU aparecem nos indivíduos infectados cerca de duas semanas após a infecção com a bactéria (TARR et al., 2005). O patógeno e fatores do hospedeiro contribuem para as manifestações clínicas da infecção por EHEC, caracterizando a SHU como uma doença multifatorial, e o processo patogênico não é totalmente esclarecido (CAPRIOLI et al., 2005). Uma vez em contato com as células alvo, não é possível neutralizar a toxina e, conseqüentemente, evitar os danos celulares e teciduais associados à SHU.

Dentre os vários sorotipos de EHEC, linhagens do sorotipo O157:H7 receberam maior destaque pois foram responsáveis por surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos, Canadá, Japão, Argentina, Chile e alguns países europeus (BANATVALA et al., 2001, SCOTLAND et al., 1985; KARMALI et al., 1986; FRIEDRICH et al., 2002). Recentemente (2011), um surto na Alemanha e mais 15 países Europeus e Norte Americanos, apresentaram dados incomuns, com 22% dos casos progredindo para a SHU, afetando 88% adultos, sendo causado por um organismo híbrido, apresentando características comuns a *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e STEC, este surto mostrou que a troca de material genético entre organismos pode gerar um patógeno hipervirulento aumentando a incidência da doença em adultos (PETRUZZIELO-PELLEGRINI e MARSDEN, 2012).

São conhecidos dois grandes grupos de toxinas Stx produzidas por linhagens de STEC: Stx1 e Stx2, ambas possuem variantes, sendo a toxina Stx2 mais heterogênea, subdividindo-se em Stx2c, Stx2d, Stx2d ativável Stx2e e Stx2f. A toxina Stx1 é mais conservada está relacionada à toxina de Shiga produzida por *S. dysenteriae* tipo I, sendo, portanto, neutralizada por anticorpos preparados contra essa toxina, a Stx2 não pode ser neutralizada pelos anticorpos anti-toxina de Shiga, possuindo propriedades imunológicas distintas (KARMALI et al., 1986; SCOTLAND et al., 1985,

STROCKBINE et al., 1986). A toxina Stx2 é responsável pela maior severidade da doença, fato epidemiologicamente comprovado pela associação da maioria dos casos de SHU com as linhagens produtoras apenas da toxina Stx2 ou em combinação (Stx2/Stx2c ou Stx2/Stx1) (ORTH et al., 2007, EKLUND et al., 2002). Realmente as células endoteliais micro e macrovasculares apresentam diferentes susceptibilidades à ação da Stx1 e Stx2, sendo a Stx2 mais tóxica ao microendotélio que a Stx1, tornado este fator relevante para a patogênese da SHU, pois o microendotélio vascular é o tecido mais afetado (BAUWENS et al., 2011). A comprovação do potencial tóxico da Stx2 também ocorreu nos ensaios *in vivo* (ACHESON et al., 1995; BIELASZEWSKA et al., 1997; FRIEDRICH et al., 2002, WADOLKOWSKI et al., 1990), em ratos a Stx2 demonstrou uma LD₅₀ 400 vezes menor que Stx1 (TESH et al., 1993). Linhagens que produzem os variantes Stx2d e Stx2e são associadas a diarreias em humanos, mas não a SHU e linhagens produtoras de Stx2f parecem não ser patogênicas aos humanos (FRIEDRICH et al., 2002).

Os variantes da Stx, portanto, são diferenciados pela atividade biológica, reatividade imunológica e afinidade aos receptores ao qual se ligam (FRASER et al., 2004), de fato moléculas de Gb3 apresentam na superfície celular diferentes domínios com diferentes ceramidas, podendo estar arrançadas na membrana diversamente levando a uma diferencial interação com Stx1 e Stx2, apesar da cadeia de trissacarídeo ser idêntica (OBRIG, 2010).

1.5 Estratégias de prevenção e controle da SHU.

1.5.1 Bloqueio da infecção.

Como o TTSS é essencial para a colonização da STEC, ele é o principal alvo das pesquisas para a obtenção de uma vacina que possa impedir a transmissão da STEC aos humanos. Na tentativa de obter uma resposta imunológica apropriada, especialmente de mucosa, fez com que na última década, pesquisas de novas estratégias vacinais, que visassem o bloqueio da adesão bacteriana ao epitélio

intestinal do gado, principalmente o sorotipo O157:H7, fossem relatadas em vários estudos (MOXLEY et al., 2009, MCNEILLY et al., 2010, PETERSON et al., 2007, SMITH et al., 2009, VAN DONKERSGOED et al., 2005), o objetivo é impedir a adesão, reduzir a colonização e conseqüente eliminação dos micro-organismos pelas fezes do gado, reduzindo o risco da exposição humana a este patógeno. Um grupo de pesquisadores testou uma vacina que está para ser comercializada, baseada em sobrenadante concentrado de proteínas secretadas de *E. coli*, como um coquetel e a eficácia foi evidente em vários estudos, em condições de exposição natural ou após inoculação da própria STEC (MOXLEY et al., 2009, PETERSON et al., 2007, SMITH et al., 2009), adicionalmente, nestes estudos foi observado que a vacinação da maioria dos animais oferece efeito protetor (imunidade de rebanho) aos não vacinados que convivem no mesmo local (PETERSON et al., 2007). Este efeito também foi confirmado em larga escala em estudos feitos com gado comercial, resultando em diminuição de 92% na colonização pela *Escherichia coli* O157:H7 (SMITH et al., 2009).

O benefício de usar proteínas do sobrenadante, abordagem que está mais próxima de ser comercializada, é o conteúdo da preparação, que consiste em uma mistura de vários antígenos que podem contribuir para a eficácia da vacina, incluindo proteínas do TTSS, flagelina e LPS, apesar da probabilidade de não conter a intimina, por não ser uma proteína secretada, estas estratégias vacinais apresentam resultados promissores.

1.5.2 Estratégias terapêuticas.

A exposição à bactéria STEC ainda é um problema em alguns países e a indisponibilidade de tratamento um desafio atual, isto incentivou as pesquisas que visam encontrar alternativas terapêuticas mais efetivas para combater a doença. O uso de análogos sintéticos do receptor da toxina Stx e o uso de anticorpos monoclonais são as principais, a finalidade de ambas é adsorção ou neutralização da toxina, seja no intestino ou na circulação, impedindo sua ligação ao receptor Gb3.

1.5.3 Uso de análogos sintéticos do receptor Gb3.

As pesquisas voltadas para encontrar uma molécula que mimetize o receptor apresentaram bons resultados *in vitro* e em animais. Teoricamente, os receptores análogos podem ser administrados tanto oralmente como parenteralmente, a primeira forma, adsorveria a toxina no intestino impedindo sua entrada na circulação e o uso parenteral bloquearia a Stx já circulante de ligar aos tecidos alvos. Testes em animais foram bem sucedidos usando *E. coli* recombinante, viva ou morta, expressando o oligossacarídeo na sua superfície (PATON et al., 2000, PATON et al., 2001). Outros estudos avaliando a eficácia do uso oral de polímeros de Gb3 sintetizados quimicamente (Synsorb-PK), foram bem sucedidos em teste clínicos de fase I, porém inconclusivos em fase II, em três estudos diferentes, e prematuramente interrompido em teste de fase III (KARMALI, 2004). Outros testes em animais foram bem sucedidos utilizando outros receptores sintéticos, com afinidades à Stx muito maiores que o Synsorb-PK, inclusive pela via parenteral, (Super Twig, Starfish, Daisy, “Gb3 polymer”), porém até o momento, não foram testados clinicamente (KARMALI, 2004).

1.5.4 Uso de anticorpos monoclonais

O uso de anticorpos monoclonais atualmente adquiriu importante destaque no campo terapêutico, seja o uso de quiméricos, humanizados ou totalmente humanos. Realmente, a administração passiva de anticorpos representa uma alternativa real para o tratamento da SHU em pessoas infectadas, sendo efetiva em prevenir a doença em modelos experimentais, em camundongos (KIMURA, et al., 2002, SHEORAN et al., 2003) e suínos (SHEORAN et al., 2005, JEONG et al., 2010). O uso de monoclonais murinos para terapia em humanos é limitado, isto se deve pela geração de resposta contra o anticorpo terapêutico e a meia-vida do anticorpo murino na circulação humana ser curta (1-2 dias), para contornar esta desvantagem, anticorpos quiméricos (murino/humano) foram desenvolvidos, apesar de uma pequena melhora, os problemas continuaram, (KIMURA et al., 2002). Para reduzir a imunogenicidade do monoclonal, o

uso de anticorpos humanizados ou humanos, atualmente são as melhores opções, apresentando menor da toxicidade ou efeito adverso (TZIPORI et al., 2004), entretanto, a humanização de anticorpos é um processo complicado e caro.

O grau de proteção depende da dose do anticorpo e do tempo de administração (TZIPORI et al., 2004, SHEORAN et al., 2005), quanto maior o intervalo de tempo entre a infecção e a administração do anticorpo, maiores doses são requeridas. (MATISE et al., 2001, TZIPORI et al., 2004), os monoclonais que reconhecem a subunidade A, mostraram-se mais promissores em neutralizar os variantes da Stx2 (TZIPORI et al., 2004). Testes clínicos de fase I realizados na Argentina demonstraram que monoclonal humanizado contra a subunidade B da toxina Stx2 é bem tolerado, persistiu por longos períodos na circulação e apresentou baixa imunogenicidade (LÓPEZ et al., 2010). Considerando que os resultados com os anticorpos monoclonais mostram-se promissores, o maior desafio é determinar quando estes agentes devem ser administrados para conseguir o desejável efeito de impedir o desenvolvimento da SHU, já que há uma estreita janela de oportunidade de intervenção terapêutica (KARMALI , 2004). No entanto, o custo elevado e as dificuldades inerentes a um diagnóstico rápido e preciso limitam a aplicação desses reagentes.

1.6 Estratégias Profiláticas

1.6.1 Vacinas baseadas em bactérias recombinantes.

O uso de vetores bacterianos vivos baseia-se na geração de linhagens bacterianas recombinantes que expressam formas atóxicas da toxina Stx de forma a promover a produção de anticorpos específicos na mucosa intestinal e na corrente sanguínea. Foram descritos resultados de imunização em condições laboratoriais com linhagens vacinais de *Vibrio cholerae* (BUTTERTON et al., 1997), *Salmonella enterica* (SU et al., 1992, ROJAS et al., 2010), *Shigella dysenteriae* (WU et al., 2011) e *Bacillus subtilis* (GOMES et al., 2009). As linhagens são modificadas geneticamente para

expressar a subunidade B da Stx ou derivados de Stx constituídos pela subunidade B e porções não tóxicas da subunidade A. Em 2011, Gu e colaboradores avaliaram uma estratégia de “prime boost” utilizando salmonela recombinante pela via oral expressando as proteínas Esp A, a porção terminal da intimina e a StxB (denominada EIS) primando o sistema imune, este mesmo fragmento na forma de proteína recombinante purificada foi usado como estímulo pela via parenteral. Os animais ficaram protegidos ao desafio oral com EHEC, porém esta proteção não pode ser atribuída à presença apenas dos anticorpos protetores contra a Stx, pois uma resposta gerada contra os fatores de adesão presentes na vacina também ocorre, impedindo a colonização pela EHEC, protegendo os animais ao desafio.

A administração pela via oral, especialmente utilizando bactérias recombinantes como vetor, promove a indução de imunidade de mucosa (anticorpos IgA no trato intestinal), porém a relevância destes anticorpos na proteção ainda não foi comprovada. A utilização de linhagens patogênicas atenuadas, como a *Salmonella* entérica, *Shigella dysenteriae* e *Vibrio cholerae* trazem um potencial risco de reversão para a forma virulenta, além disso, a presença de LPS compromete sua validação como veículo vacinal. Em geral, os resultados revelam baixa imunogenicidade sistêmica (anticorpos IgG específicos na corrente sanguínea) e proteção parcial a desafios com a toxina nativa em modelo experimental murino.

1.6.2 Vacinas baseadas em toxóides.

Toxóides são obtidos pela inativação de toxinas por métodos físicos ou químicos. Nessa estratégia de imunização, a toxina Stx é utilizada na sua composição completa, o que preserva suas propriedades imunogênicas, possibilitando a obtenção de anticorpos que reconhecem e neutralizam a toxina nativa. No caso das estratégias voltadas para o controle da SHU, os toxóides são inativados quimicamente por tratamento com glutaraldeído (BIELASZEWSKA et al., 1997, LUDWIG et al., 2002). Embora os resultados tenham sido promissores em modelo experimental, receios

inerentes à inativação completa da Stx criam restrições em relação à segurança da vacina para uso em humanos.

Como alternativa ao uso de toxóides, laboratórios pesquisam o uso de toxinas recombinantes contendo mutações que reduzem ou inativem as propriedades tóxicas da Stx. Tal estratégia mostra-se atraente, pois dispensa o tratamento químico da toxina, o que simplifica o processo de produção do imunógeno. No caso específico de Stx foram descritas mutações na subunidade A que reduzem a toxicidade sem comprometimento da imunogenicidade (ISHIKAWA et al., 2003, SMITH et al., 2006, WEN et al., 2006), e também mutação na subunidade B da Stx1, prejudicando a ligação ao receptor (BAST et al., 1997), ambas gerando anticorpos protetores.

1.6.3 Vacinas baseadas em proteínas purificadas ou peptídeos.

O maior alvo das pesquisas nessa linha é a subunidade B da Stx, responsável pela ligação ao receptor das células alvo. Por não estar envolvida com o efeito tóxico da Stx, não há necessidade de etapas adicionais relacionadas à inativação da proteína purificada. No entanto, dificuldades encontradas na expressão da proteína em sistemas heterólogos, a montagem na sua conformação pentamérica, pequeno tamanho e reduzida imunogenicidade, têm sido os principais fatores que restringiram as pesquisas de vacinas baseadas na subunidade B da Stx a condições laboratoriais. O uso de adjuvantes é fundamental para tornar a vacinação eficaz, como demonstrado em diversos trabalhos que caracterizaram o potencial imunogênico da subunidade B (BYUN et al., 2001, IMAI et al., 2004, TSUJI et al., 2008a, 2008b, ZHU et al., 2008, MARCATO et al., 2001, 2005, GAO et al., 2009, GU et al., 2009, CAI et al., 2011, GUPTA et al., 2011).

Outra estratégia envolve o uso de peptídeos sintéticos correspondendo a sequências da subunidade B (HARARI et al., 1988, 1990, BOYD et al., 1991). Esses peptídeos correspondem geralmente a regiões hidrofílicas da proteína, ou seja, trechos da molécula que estão expostos na toxina, permitindo o reconhecimento por anticorpo.

Embora resultados iniciais tenham sido promissores em condições experimentais, o alto custo de produção e a baixa imunogenicidade restringiram o aprimoramento dessa estratégia vacinal.

1.6.4 Vacinas baseadas em ácidos nucleicos purificados (vacinas de DNA).

Vacinas de DNA empregam a informação genética do patógeno para a geração de plasmídeos purificados como constituintes da formulação vacinal. O DNA plasmidial consiste em promotor capaz de controlar a expressão de um ou mais antígenos em células de mamíferos após a inoculação em tecido muscular resultando na produção do antígeno vacinal alvo. Resultados promissores foram obtidos em condições experimentais com formulações que codificam a subunidade B e porções atóxicas da subunidade A (CAPOZZO et al., 2003, BENTANCOR et al., 2009). Como principais vantagens dessa estratégia estão o baixo custo de produção e a simplicidade do processo de preparação que prescinde da purificação do antígeno alvo. No entanto, a baixa imunogenicidade das formulações testadas, sobretudo, para a produção de anticorpos específicos, indica que aprimoramentos ainda devem ser alcançados antes que essas vacinas possam ser testadas em seres humanos.

1.7 Uso de adjuvantes em estratégias vacinais contra a SHU.

Os adjuvantes têm sido usados em combinação às vacinas convencionais para obtenção de uma resposta imune elevada e duradoura, sendo fundamental para vacinas de subunidades e proteínas purificadas, que são fracamente imunogênicas. Com o uso de adjuvantes a quantidade do antígeno é menor e poucas doses podem ser requeridas para estimular a resposta imune, economizando no custo da vacina (GUPTA e SIBER, 1995). O potencial adjuvante da maioria das formulações desenvolvidas está associado a efeitos adversos, como reação local, estimulação exacerbada das células do sistema imune, mas estes mecanismos envolvidos são na

sua maioria atribuídos a adjuvanticidade (GUPTA et al., 1993). Contudo, o adjuvante deve ser estável em consideração a sua toxicidade e função, sem qualquer interação com o antígeno, deve ser biodegradável e não gerar imunogenicidade contra si. Nenhum adjuvante disponível até o momento atende todos esses critérios (GUPTA E SIBER, 1995).

Na tentativa de bloquear o processo de internalização da toxina, a subunidade B ligante da toxina de Shiga tornou-se alvo, dentre os vários trabalhos focados na subunidade B associada a adjuvantes, destacamos apenas um estudo comparativo sobre o papel de vários adjuvantes na resposta contra a Stx2B, os resultados de proteção ficaram aquém do esperado, a sobrevivência dos animais não alcançou 144 horas (MARCATO et al., 2005), melhoraram apenas após o uso de uma molécula carreadora (KLH – Keyhole Limpet Hemocyanin) em combinação com o adjuvante RAS-TDM (Ribi Adjuvant System).

A utilização preferencialmente da toxina Stx1B de *E. coli* ou *S. dysenteriae* (IMAI et al., 2004, ZHU et al., 2008, CAI et al., 2011, GUPTA et al., 2011), dificulta uma análise comparativa, pois trata-se de um imunógeno diferente, e com pouca relevância clínica. Os poucos trabalhos descritos para a Stx2 não foram muito promissores, podemos destacar o uso Stx2B purificada na qual a proteção obtida foi apenas após a administração do imunógeno com uma alta contaminação com LPS (MARCATO et al., 2001). Outros autores também falharam na obtenção de anticorpos anti-Stx2B e na neutralização dos mesmos (ACHESON et al., 1995, BYUN et al., 2001). Em outro experimentos utilizando a proteína Stx2B a proteção obtida foi decepcionante (10%), a melhora nos resultados foi obtida após a co-administração com Stx1B (Stx2B+Stx1B) ou após a fusão de ambas subunidades (GAO et al., 2009), estes poucos trabalhos demonstram a dificuldade de se obter uma potencial imunoterapia usando a subunidade B da toxina Stx2.

Em nosso laboratório foi previamente reportado que camundongos imunizados com linhagens recombinantes de *Salmonella* e *Bacillus* modificados para expressar uma forma recombinante de Stx (Stx2 Δ AB) geraram anticorpos em soro e mucosas e, no caso de *Salmonella*, proteção parcial a desafios com doses letais da toxina Stx2 (GOMES et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Neste estudo, damos continuidade à

avaliação do antígeno Stx2 Δ AB (subunidade B mais o fragmento A2) previamente testado pelo nosso grupo em animais imunizados com vacina de DNA e linhagens *S. Typhimurium* recombinantes como vetor oral, ambas abordagens vacinais apresentaram características promissoras (BENTANCOR et al., 2009, ROJAS et al., 2010). Iniciamos o trabalho testando a estratégia de “prime boost” utilizando a vacina de DNA (BENTANCOR et al., 2009) para sensibilização e como estímulo linhagens recombinantes de *B. subtilis* expressando o antígeno Stx2 Δ AB intracelularmente como reforço. Aprofundamos nossos ensaios utilizando a proteína recombinante como vacina de subunidade, complementando a análise do fragmento Stx2 Δ AB em diferentes abordagens: vacinas de DNA, bactéria recombinante e proteína purificada. O toxóide Stx2 Δ AB foi produzido em linhagens de *E. coli* BL21(DE3)pLysS e o seu potencial vacinal foi avaliado em combinação com adjuvantes clássicos (Freund e hidróxido de alumínio) ou bem caracterizados em nosso laboratório (enterotoxina termo-lábil (LT) e flagelina. (FliCi), assim como seu estado conformacional, como estratégia de prevenção da síndrome hemolítica urêmica (SHU).

6 CONCLUSÃO

As conclusões obtidas neste trabalho são:

- I) O protocolo do regime vacinal “prime-boost” não apresentou o efeito desejado em potencializar as respostas já obtidas com a vacina de DNA ou *B. subtilis* separadamente.
- II) Foi possível obter a proteína Stx2 Δ AB com características funcionais e imunológicas preservadas.
- III) A imunidade protetora foi obtida após imunização com adjuvante de Freund correlacionando com os títulos de anticorpos anti- Stx2 Δ AB.
- IV) A substituição do componente tóxico do CFA por outros adjuvantes mostraram imunidade protetora para desafios menos restridentes.
- V) A imunidade protetora conferida pelos anticorpos é dependente da conformação correta da Stx.

6.1 Conclusões gerais

A proteína Stx2 Δ AB representa uma alternativa promissora para o desenvolvimento de estratégias vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica.

7 PERSPECTIVAS

Novas formulações podem ser testadas a partir do antígeno Stx2 Δ AB, alterações na dose e no uso de novos adjuvantes combinados ao IFA podem ser explorados, assim como, combinações de estratégias vacinais, tipo “prime-boost”. Os resultados obtidos abrem perspectivas interessantes para o desenvolvimento de novos procedimentos profiláticos e terapêuticos frente aos sintomas associados à SHU.

8 REFERÊNCIAS

ACHESON, D. W. K. et al. Expression and purification of Shiga-like toxin II B subunits. **Infect. Immun.**, v 63, p. 301-308, 1995.

AUSTIN, P. R. e HOVDE, C. J. Purification of recombinant Shiga-like toxin type I B subunit. **Protein Expr. Purif.** v. 6, p. 771-779, 1995.

BANATVALA N., GRIFFIN P.M., GREENE K.D. et al. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: Microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. **J. Infect. Dis.** v. 183, p. 1063–1070, 2001.

BARGIERI, D. Y. et al. New malaria vaccine candidates based on the *Plasmodium vivax* Merozoite surface protein-1 and the TLR-5 agonist *Salmonella Typhimurium* FliC flagelin. **Vaccine**, v. 26. p. 6132-6142, 2008.

BARGIERI, D. Y. et al. Immunogenic properties of a recombinant fusion protein containing the C-terminal 19 kDa of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 and the innate immunity agonist FliC flagellin of Salmonella Typhimurium. **Vaccine**, v. 16. p. 2818-2826, 2010

BAST, D. J. et al. Toxicity and immunogenicity of a verotoxin 1 mutant with reduced globotriaosylceramide receptor binding in rabbits. **Infect. Immun.**, v 65(6), p. 2019-2028, 1997.

BAUWENS, A. et al. Differential cytotoxic actions of Shiga toxin 1 and Shiga toxin 2 on microvascular and macrovascular endothelial cells. **Thromb. Haemost.**, v. 105(3), p. 515-528, 2011.

BENTANCOR, L. V. et al. DNA vector encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Shiga-like toxin 2 (Stx2) A₂ and B subunits confers enhanced immunogenicity and protective immunity to Stx challenge in the murine model. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 16, p. 712-718, 2009.

BIELASZEWSKA, M. et al. Localization of intravenously administered verocytotoxins (Shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 2509-2516, 1997.

BOYD , B., RICHARDSON, S., GARIÉPY, J. Serological response to the B subunit of Shiga-Like Toxin 1 and its peptide fragments indicate that the B subunit is a vaccine candidate to counter the action of the toxin. **Infect. Immun.** v. 59, p. 750-757, 1991.

De acordo com:

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

BRAGA, C. J. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* vaccine formulations based on the gp43-derived P10 sequence and the *Salmonella enterica* FliC flagelin. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 1700-1707, 2009.

BRANDO, R. J. F. et al. Renal damage and death in weaned mice after oral infection with Shiga toxin 2-producing *Escherichia coli* strains. **Clin. Exp. Immunol.** v. 153, p. 297–306. 2008.

BUTTERTON, J.R. et al. Coexpression of the B Subunit of Shiga toxin 1 and EaeA from enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Vibrio cholerae* vaccine strain. **Infect Immun.**, v. 65, p. 2127-2135, 1997.

BYUN, Y. et al. Nasal immunization with *E. coli* Verotoxin 1 (VT1)-B subunit and a nontoxic mutant of cholera toxin elicits serum neutralizing antibodies. **Vaccine**, v. 19, p.2061-2070, 2001.

CALDERWOOD, S. B. et al. A system for production and rapid purification of large amounts of Shiga toxin/Shiga like toxin 1B subunit. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 2977-2982, 1990.

CAI, K. et al. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Vaccine**, v. 29, p. 946-952, 2011.

CAPOZZO, A. et al. Development of DNA vaccines against Hemolytic Uremic Syndrome in a murine model. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3971-3978, 2003

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

DE GREGORIO, E., TRITTO, E., RAPPUOLI, R. Alum adjuvanticity: Unraveling a century old mystery. **Eur. J. Immunol.** v. 38, p. 2068-2071, 2008.

DONOHUE-ROLFE, A. et al. Purification of Shiga toxin and Shiga like toxin I and II by receptor analog affinity chromatography with immobilized P1 glycoprotein and production of cross-reactive monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, v.57, p. 3888-3893, 1989.

DUC, L. H. et al. Intracellular fate and immunogenicity of *B.subtilis* spores. **Vaccine**, v. 22, p. 1873-1885, 2004.

DUC, L. H. et al. Bacterial spores as vaccine vehicles. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 2810-2818, 2003

EISENHAUER, P.B. et al. Tumor necrosis factor alpha increases human Cerebral endothelial cell Gb3 and sensitivity to shiga toxin. **Infect. Immun.** v. 69, p. 1889-1894, 2001.

EKLUND, M., LEINO, K., SIITONEN, A. Clinical *Escherichia coli* strains carrying stx genes: stx variants and stx-positive virulence profiles. **J. Clinical Microbiol.** v. 40, p. 4585-4593, 2002.

EXENI R. Síndrome Urémico Hemolítico. **Arch. Latin. Nefr. Ped.** v. 1, p. 35-56. 2001.

FRANKEL, G. et al. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta (1) integrins. **J Biol Chem.** v. 271, p. 20359–20364, 1996.

FRASER, M. E. et al. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. **J. Biol.Chem.**, v. 279, p. 27511-27517, 2004.

FREYTAG, L. C. e CLEMENTS, J. D. Mucosal adjuvants. **Vaccine.** v. 23, p. 1804-13, 2005.

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

GAO, X. et al. Immunogenicity of a novel Stx2B-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. **Vaccine.** v. 27, p. 2070-2076, 2009.

GASSER, C., GAUTIER, E., EHECK, A. Hamolytisch-uramische syndrome: Bilaterale Nierenrindennekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen Anamien. **Schweiz Med Wochenschr** v. 85, p. 905-909, 1955.

GIANANTONIO, C. A. et al. The hemolytic—uremic syndrome. **J. Pediatr.** v. 54, p. 478-491. 1964.

GOMES, P. A. D. P. et al, Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Brazilian Journal Microbiol.** v.40, p. 332-337, 2009.

GU, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalente recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. **Microbes Infect.** v.11, p. 835-841, 2009.

GU, J. et al. Vaccination of attenuated EIS-producing *Salmonella* induces protective immunity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* in mice. **Vaccine.** v. 29, p. 7395-7403, 2011.

GUPTA, R. K. e SIBER, G. R. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13(14), p. 1263-1276, 1995.

GUPTA, R.K. et al. Adjuvants-a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**. v. 11, p. 293-306, 1993.

GUPTA, P. et al. Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. **Vaccine**. v. 29, p. 8094-8100, 2011.

GUNZER, F. e KARCH, H. Expression ao A and B subunits of shiga-like toxin II as fusion with glutathione S-transferase and their potential for use in seroepidemiology. **J. Clin. Microbiol.** v. 31 (10), p. 2604-2610, 1993.

HARARI, I. et al. Synthetic peptides of Shiga toxin B subunit induce antibodies which neutralize its biological activity. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1618-1624, 1988.

HARARI, I. e ARNON, R.; Carboxi-terminal peptides from the B subunit of Shiga toxin induce a local and parenteral protective effect. **Mol. Immunol.**, v. 27(7), p. 613-21, 1990.

HACKER, J. et al. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.** v. 23, p. 1089–1097, 1997.

HUSSEIN, H.S.Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. **J. Anim. Sci.** v. 85, p. 63-72. 2007.

IMAI, Y. et al. Production of secretory immunoglobulin A against Shiga toxin-binding subunits in mice by mucosal immunization. **Infect. Immun.** v. 72, p. 889-895, 2004.

ISHIKAWA, S. et al. Protection against Shiga toxin 1 challenge by immunization of mice with purified mutant Shiga toxin 1. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 3235-3239, 2003.

JEONG, K., TZIPORI, S., SHEORAN, A. S. Stx2- but not Stx1-specific human monoclonal antibody protects piglets challenged with enterohemorrhagic *Escherichia coli* producing Stx1 and Stx2. **J. Infect. Dis.** v. 201(7), p. 1081–1083. 2010.

JOHANNES, L. e ROMER, W. Shiga toxin – from cell biology to biomedical applications. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 8, p. 105-116, 2010.

KAPLAN, B. S., CHESNEY, R. W. , DRUMMOND, K. N. Hemolytic uremic syndrome in families. **N. Engl. J. Med.** v. 292, p. 1090–1093. 1975.

KARMALI, M. A. et al. Sporadic cases of Hemolytic Uremic Syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, 619-620, 1983.

KARMALI, M. A. et al. Antigenic heterogeneity of *Escherichia coli* verotoxins. **Lancet**. 164-165, 1986.

KARMALI, M. A. Infection by Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 2, p. 15-38. 1989.

KARMALI, M. A. Prospects for Preventing Serious Systemic Toxic Complications of Shiga toxin-Producing *Escherichia coli* using Shiga toxin Receptor Analogues. **J. Infectious Diseases.** v. 189, p. 355-359, 2004.

KIMURA, T. et al. Development of humanized monoclonal antibody TMA-15 which neutralizes Shiga toxin 2. **Hybrid Hybridomics.** v. 21(3), 161-168, 2002.

KING, A. J. Acute inflammation in the pathogenesis of hemolytic-uremic syndrome. **Kidney International.** v. 61, p. 1553-1564. 2002.

KONOWALCHUK, J., SPEIRS, J. I., STRAVIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 18, p. 775-779, 1977.

LASARO, M. A. et al. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** v. 55(1), p. 93-9. 2009.

LÓPEZ, E. L. et al. Safety and pharmacokinetics of Urtoxazumab, a Humanized Monoclonal Antibody, against Shiga-Like Toxin 2 in Healthy Adults and in Pediatric Patients Infected with Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 54(1), p. 239-243. 2010.

LOUISE, C. B.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated Hemolytic Uremic Syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin, Interleukin-1 β , and Tumor Necrosis Factor Alpha on human vascular endothelial cells *in vitro*. **Infect. Immun.** v. 59, p. 4173-4179, 1991.

LOUISE, C. B.; OBRIG, T. G. Shiga toxin-associated Hemolytic Uremic Syndrome: combined cytotoxic effects of Shiga toxin and Lipopolysaccharide (endotoxin) on human vascular endothelial cells *in vitro*. **Infect. Immun.** v. 60, p. 1536-1543, 1992.

LUDWIG, K. et al. Cross-protection against challenge by intravenous *Escherichia coli* verocytotoxin 1 (VT1) in rabbits immunized with VT2 toxoid. **Can. J. Microbiol.**, v. 48, p. 99-103, 2002.

LUKYANENKO, V. et al. Enterohemorrhagic infection stimulates Shiga toxin 1 macropinocytosis and transcytosis across intestinal epithelial cells. **Am. J. Physiol Cell Physiol.** v. 301, p. 1140-1149. 2011.

MARCATO P. et al. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2B subunit. **J. Infect. Dis.** v. 183, p. 435-443, 2001.

MARCATO, P. et al. Recombinant Shiga toxin B subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from shigatoxemia. **Infect Immun.**, v. 73, p. 6523-6529, 2005

MATUSSEK, A. et al. Molecular and functional analysis of Shiga toxin-induced response patterns in human vascular endothelial cell. **Blood.** v. 102(4), p. 1323-1332, 2003.

MATISE, I. et al. Intervention with Shiga Toxin (Stx) Antibody after Infection by Stx-Producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** v.183, p. 347–350, 2001.

MCNEILLY, T. N. et al. Immunization of cattle with a combination of purified intimin-531, EspA and Tir significantly reduces shedding of *Escherichia coli* O157:H7 following oral challenge. **Vaccine.** v. 28, p. 1422–1428, 2010.

MOXLEY, R. A. et al. *Escherichia coli* O157:H7 Vaccine Dose–Effect in Feedlot Cattle. **Foodborne Pathog. Dis.** v. 6,(7), p. 879-884, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11 p. 142-201, 1998.

O'BRIEN, A.D. et al. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colits in the United States produce a Shigella dysenteriae I (SHIGA) like cytotoxin. **Lancet.** v.1, p. 702, 1983.

O'BRIEN, A.D. e HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-Like Toxins. **Microbial Rev.** v. 51, p. 206-220, 1987,

OBRIG, T. G. *Escherichia coli* Shiga Toxin Mechanisms of Action in Renal Disease. **Toxin.** v.2, p. 2769-2794, 2010.

OLIVEIRA, M. G. et al. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes in food-producing animals in Brazil. **Int. J. Food Microbiol.** v. 127(1-2), p. 139-146. 2008.

O'HAGAN, D. T., MACKICHAN, M. L., SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomol. Eng.** v. 18, p. 69-85, 2001

ORTH, D. et al. The Shiga toxin genotype rather than the amount of Shiga toxin or the cytotoxicity of Shiga toxin *in vitro* correlates with the appearance of the hemolytic uremic syndrome. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 59(3), p. 235-242. 2007.

PATON, J. C e PATON, A. W. Pathogenesis and Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 11(3), p. 450-479. 1998.

PATON, A. W., MORONA, R., PATON, J. C. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. **Nat. Med.** v. 6(3), p. 265-270. 2000.

PATON, J. C. et al. Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 69, p. 1389-1393, 2001.

PETERSON, R. E. et al. Efficacy of Dose Regimen and Observation of Herd Immunity from a Vaccine against *Escherichia coli* O157:H7 for Feedlot Cattle. **J. Food Prot.** v. 70 (11), p. 2561–2567, 2007

PETRUZZIELO-PELEGRINI, T. N. e MARSDEN, P. A. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome: advances in pathogenesis and therapeutics. **Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.** v 21 (4), p. 433-440, 2012.

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

ROBINSON, C. M. et al. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. **PNAS.** v. 20, p. 9667-9672. 2006.

ROJAS, R. L. G. et al, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains expressing a nontoxic Shiga-Like toxin 2 derivative induce partial protective immunity to the toxin expressed by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 17(4), p. 529-536, 2010.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* using Calcium Chloride. In:-----**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. v.1, p. 1.116

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Expression of Cloned Genes in *E. coli* Using the Bacteriophage T7 Promoter. In:-----**Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. v.3, p. 15.20

SAUTER, K. A. D. et al. Mouse model of hemolytic-uremic syndrome caused by endotoxin-free shiga toxin 2 (Stx2) and protection from lethal outcome by anti-Stx2 antibody. v. 76 (10), p. 4469-4478, 2008.

SCOTLAND, S. M., SMITH, H. R., ROWE B. Two distinct toxins active on vero cells from *Escherichia coli* O157. **Lancet**, v. 8460, p. 885-886, 1985.

SHEORAN, A. S. et al. Stx2-Specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing Stx2 variants. **Infect. Immun.** v. 71 (6) p. 3125-3130. 2003.

SHEORAN, A. S. et al. Human antibody against Shiga Toxin 2 administered to piglets after the onset of diarrhea due to *Escherichia coli* O157:H7 prevents fatal systemic complications. **Infect. Immun.** v.73 (8), p. 4607- 4613, 2005.

SIMON, M. et al. Shiga toxin 1 elicits diverse biologic response in mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 54, p. 1117-1127, 1998.

SINCLAIR, J. F. e O'BRIEN, A.D. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. **J. Biol. Chem.** v. 279(32), p. 33751-33758, 2004.

SMITH H. R. e SCOTLAND, S. M. Vero cytotoxin-producing strains of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.** v.. 26, p. 77-85, 1988.

SMITH, M. J. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against shiga toxin types 1 and 2. **Vaccine.** v. 24, p. 4122-4129, 2006.

SMITH, D. R. et al. A Two-Dose Regimen of a Vaccine Against Type III Secreted Proteins Reduced *Escherichia coli* O157:H7 Colonization of the Terminal Rectum in Beef Cattle in Commercial Feedlots. **Foodborne Pathog. Dis.** v. 6(2),p. 155-161, 2009.

STROCKBINE, et al. Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 135-140, 1986

SU, G. F. et al. Construction of stable LamB-Shiga toxin B subunit Hybrids: Analysis of expression in *Salmonella typhimurium aroA* strain and stimulation of B subunit-specific mucosal and serum antibody responses. **Infect. Immun.**, v. 60, p. 3345-3359, 1992.

TARR, P.I., GORDON, C.A., CHANDLER, W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **Lancet.** v. 365, p. 1073-1086. 2005.

TESH, V. L. et al. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. **Infect. Immun.**, v. 61, p. 3392-3402, 1993.

TIMM, C. D. et al. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Lett Appl Microbiol.** v. 44(4), p. 419-425. 2007.

TSUJI, T. et al., A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against shiga toxin types 1 and 2. **Vaccine**. v. 26, p. 2092-2099, 2008a.

TSUJI, T. et al. Protection of mice from Shiga toxin-2 toxicemia by mucosal vaccine of Shiga toxin 2B-His with *Escherichia coli* enterotoxin. **Vaccine**. v. 26, p. 469-476, 2008b.

TZIPORI S. et al. Antibody therapy in the management of Shiga toxin induced hemolytic uremic syndrome. **Clin. Microbiol. Rev.** v.17 (4), p. 926-941, 2004.

VAN DE KAR, N. C. et al. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: Implications for the pathogenesis of the Hemolytic Uremic Syndrome. **Blood**, v. 80, p. 2755-2764, 1992.

VAN DE KAR, N. C. et al. Tumor Necrosis Factor α induces endothelial galactosyl transferase activity and verocytotoxin receptors. Role of specific Tumor Necrosis Factor receptors and Protein Kinase C. **Blood**, v. 85, p. 734-743, 1995.

VAN DONKERSGOED, J et al. *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. **Can Vet J.** v. 46, p. 724–728, 2005.

WALDOKOWSKI, E. A. et al. Acute renal tubular necrosis and death of mice orally infected with *Escherichia coli* strain that produce Shiga-like toxin type II. **Infect. Immun.**, v. 58, p. 3959-3965, 1990.

WEN, S. X. et al. Genetics toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. **Vaccine**. v. 24(8), p. 1142-1148, 2006.

WU, T. et al. Live attenuated *Shigella dysenteriae* type 1 vaccine strains overexpressing shiga toxin B subunit. **Infect. Immun.**,v.79(12), p. 4912-4922, 2011. _

www.cdc.gov.

ZHU, C. et al. Protection against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection by transcutaneous immunization with Shiga toxin B subunit. **Clin. Vaccine Immunol.**, v. 15. p. 359-366, 2008.

ZUMBRUN, S. D. et al. Human Intestinal Tissue and Cultured Colonic Cells Contain Globotriaosylceramide Synthase mRNA and the Alternate Shiga Toxin Receptor Globotetraosylceramide. **Infect. Immun.**,v. 78, p. 4488–4499. 2010.