

**ROSABEL FALCÓN MÁRQUEZ**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA  
ENTEROTOXINA CITOTÓXICA DE  
*Aeromonas hydrophila*.**

**Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas, para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas, na Área de  
Microbiologia.**

**CAMPINAS, SP  
1998**

**M348c**

**36437/BC**

**ROSABEL FALCÓN MÁRQUEZ**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DA  
ENTEROTOXINA CITOTÓXICA DE  
*Aeromonas hydrophila.***

este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
**Rosabel Falcon Marquez**  
e aprovada pela Comissão Julgadora.  
**08/12/1998**

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas, para a obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Biológicas, na Área de  
Microbiologia.

**Orientadores: Prof. Dr. Tomomasa Yano  
Profa. Dra. Marlene Braide Serafim**

**CAMPINAS, SP  
1998**

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TCMBO BC/	36437
PROC.	229199
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/02/99
N.º CPD	

CM-00120567-4

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

**C348c** Márquez, Rosabel Falcón  
Caracterização biológica da enterotoxina citotóxica de  
*Aeromonas hydrophila*/Rosabel Falcón Márquez. -- Campinas,  
SP:[s.n.], 1998.  
95f.:ilus.

Orientador: Tomomasa Yano  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.  
Instituto de Biologia.

1. Purificação. 2. Caracterização. 3. Bacteria. I. Yano, Tomomasa.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Mestrado,  
em sessão pública realizada em 18 de Dezembro de 1998, considerou a  
candidata: \_\_\_\_\_.

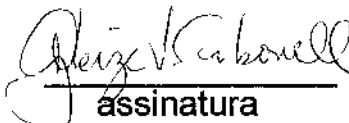
1º) **TITULAR:** Prof. Dr. Tomomasa Yano

  
\_\_\_\_\_  
assinatura

2º) **TITULAR:** Profa. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura

  
\_\_\_\_\_  
assinatura

3º) **TITULAR:** Dra. Gleize Villela Carbonell

  
\_\_\_\_\_  
assinatura

4º) **SUPLENTE:** Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

\_\_\_\_\_  
assinatura

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Antígenos Bacterianos do Dpto de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas com o auxílio financeiro da Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

*A meus queridos pais, pelos  
grandes exemplos de amor,  
perseverança e conquista.*

# Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela orientação, apoio e estímulo durante todo este tempo.

Aos meus familiares e amigos, pelo companherismo, incentivo e carinho mostrados em todo momento.

A todos os colegas do laboratório pela força, agradável convivência e troca de experiências que marcaram e enriqueceram minha estadia nestes dois anos e meio.

À Prof. Dra. Maria Sílvia Gatti, pelo apoio, disponibilidade e valiosos ensinamentos.

À Prof. Dra. Maria Arita, pelas sugestões, carinho, e pela disponibilidade para a participação como membro de todas as Bancas Examinadoras deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Pestana de Castro, pela sua colaboração, correções e participação como membro da Banca Examinadora do Exame Geral de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Hernandes e colegas do laboratório de Biologia Celular, pelo apoio, sugestões e colaboração neste trabalho.

À Profa. Dra. Leonilda pela atenção e auxílio nas pesquisas de caráter imunológico.

Aos Profs. Drs. do Depto de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP que de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho.

Às bibliotecárias do IB/UNICAMP, pela atenção e auxílio.

À todas as secretárias da UNICAMP, principalmente às do Depto. de Microbiologia e Imunologia, pela disponibilidade e compreensão.

À Fundação Tropical "André Tosello", pela doação das amostras que fizeram possível a elaboração deste trabalho.

Aos colegas do Dpto. de Microbiologia do Instituto "Pedro Kouri", especialmente à Gilda Toraño e Tamara Pimentel pelo apoio e dedicação.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelos subsídios financeiros aplicados nesta pesquisa.



# ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	02
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Amostras Bacterianas.....	18
3.2 Padronização das condições de cultivo da Ent-ctx.....	18
3.2.1 Variações nas condições de cultivo.....	18
3.3 Produção da enterotoxina citotóxica.....	19
3.4 Metodologia para a purificação.....	20
3.4.1 Precipitação com sulfato de amônio.....	20
3.4.2 Técnicas cromatográficas.....	20
3.4.3 Determinação da concentração protéica.....	22
3.4.4 Análise eletroforética.....	22
3.4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida convencional (PAGE)	22
3.4.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	23
3.4.4.3 Coloração dos géis de poliacrilamida.....	23
3.5 Caracterização biológica.....	24
3.5.1 Ensaio para a detacção da atividade citotóxica.....	24
3.5.1.1 Preparação das culturas celulares.....	24
3.5.1.2 Teste de citotoxicidade.....	25
3.5.2 Determinação da CD <sub>50</sub> .....	26

3.5.3 Cinética da citotoxicidade.....	26
3.5.4 Estudo das alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx em células Vero.....	27
3.5.5 Termo-estabilidade da Ent-ctx.....	28
3.5.6 Teste de atividade enterotóxica.....	28
3.5.6.1 Alça ligada de intestino de coelho.....	28
3.5.7 Teste de atividade hemolítica.....	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1 Produção e purificação da Ent-ctx.....	31
4.1.1 Padronização da produção da Ent-ctx.....	31
4.1.2 Processo de purificação.....	33
4.1.2.1 Precipitação com sulfato de amônio.....	33
4.1.2.2 Processos cromatográficos.....	34
4.1.3 PAGE e SDS-PAGE.....	40
4.2 Caracterização biológica.....	43
4.2.1 Citotoxicidade em cultura de células.....	43
4.2.2 CD <sub>50</sub> da Ent-ctx.....	44
4.2.3 Tempo de citotoxicidade.....	45
4.2.4 Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx.....	45
4.2.5 Efeito da temperatura na estabilidade da Ent-ctx.....	52
4.2.6 Atividade enterotóxica da Ent-ctx.....	55
4.2.6.1 Teste de alça ligada de intestino de coelho.....	55
4.2.7 Atividade hemolítica.....	57

5 DISCUSSÃO.....	58
6 CONCLUSÕES.....	69
7 BIBLIOGRAFIA.....	71

## Resumo

*Aeromonas hydrophila* vem se tornando um dos mais freqüentes agentes de infecções gastrointestinais. A enterotoxina citotóxica por ela sintetizada é considerada como um de seus principais fatores de virulência.

No presente estudo, diferentes procedimentos foram empregados visando purificar e caracterizar biologicamente a enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*. A toxina protéica foi precipitada com sulfato de amônio e submetida a processos cromatográficos usando colunas de interações hidrofóbicas (Phenyl Sepharose CL-4B), troca iônica (Q Sepharose Fast Flow e Mono Q) e de exclusão molecular (Superdex 200) no sistema HPLC. O teste de alça ligada de intestino de coelho mostrou a enteropatogenicidade da Ent-ctx. Sua análise em PAGE e SDS-PAGE evidenciou uma banda protéica de peso molecular estimado de 68.000 Da. Ensaio biológicos em diferentes linhagens celulares mostraram uma cinética rápida (2 horas) na indução de efeito citopático. A Ent-ctx induziu alterações morfológicas, tais como vacuolização citoplasmática e condensação cromatínica em células Vero. Alguns dos aspectos morfológicos observados sugerem a indução à apoptose.

## *1. Introdução*

As gastroenterites e septicemias causadas por bactérias, principalmente nos países em desenvolvimento, consistem em um dos maiores problemas em saúde, por serem geralmente agudas e pela mortalidade decorrente, especialmente em crianças e em animais (Sears & Kaper, 1996).

Estudos epidemiológicos demonstraram que a maioria das doenças entéricas bacterianas é causada principalmente por *Escherichia coli* diarrreogênicas, *Vibrio cholerae*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.* e outros (Black, 1990).

*Aeromonas spp.* têm sido classificadas como patógenos emergentes pela sua capacidade de provocar transtornos gastrointestinais (Altwegg & Geiss, 1989; Gracey *et al.*, 1982; Krovacek *et al.*, 1998), constituindo-se em um dos cinco mais freqüentes agentes de infecções intestinais em humanos (WHO, 1989).

Devido sua capacidade de adaptação as *Aeromonas* são amplamente distribuídas na natureza, podendo atuar como patógenos oportunistas principalmente em hospedeiros imunologicamente debilitados (Boulanger *et al.*, 1977; Carrello *et al.*, 1988).

Alguns estudos demonstraram que as infecções humanas por espécies de *Aeromonas* variam amplamente, podendo causar, além de gastroenterite, outras infecções do tipo invasivas como bacteremia, peritonite, meningite e mionecrose (Cahill, 1990; Hill *et al.*, 1954; Janda *et al.*, 1988; Schiavano *et al.*, 1998; Vadivelu *et al.*, 1995). Também tem sido demonstrado que a espécie

*Aeromonas hydrophila* constitui um dos mais comuns agentes associados com as infecções gastrointestinais, podendo ser adquiridas em ambientes hospitalares, contato com água ou ingestão de alimentos contaminados (Kirov *et al.*, 1993; Merino *et al.*, 1995).

Vários marcadores de virulência em amostras de *Aeromonas spp.* têm sido descritos para explicar a patogênese das infecções intestinais, entre eles: exotoxinas, endotoxina (LPS), "S-layer", fimbrias, e adesinas (Cahill, 1990; Majeed & Macrae, 1994; Sears & Kaper, 1996). Por outro lado pouco se sabe acerca dos mecanismos pelos quais esta bactéria é enteropatôgena (Black, 1990; Houston *et al.*, 1991; Pitanrangsi *et al.*, 1982).

Dentre os possíveis fatores de virulência produzidos por *Aeromonas spp.* a enterotoxina citotóxica (Ent-ctx) vem se caracterizando como o mais importante fator de virulência associado a doenças gastrointestinais (Burke *et al.*, 1987; Ferguson *et al.*, 1997), sendo que a maioria dos estudos de caracterização vem sendo feitos em amostras de *Aeromonas hydrophila*.

Devido à importância da enterotoxina citotóxica como um possível indicador da patogenicidade de *Aeromonas spp.* (Levine *et al.*, 1983), e tendo em vista que os resultados dos estudos de sua caracterização biológica têm se mostrado conflitantes, torna-se importante novos estudos que possam definir o seu papel em enteropatias.

## *2. Revisão Bibliográfica*



O isolamento de um bacilo gram-negativo do meio aquático denominado *Bacillus punctatus* por Zimmermann (1890), parece ser o primeiro relato do gênero bacteriano que poderia ser hoje classificado como *Aeromonas spp.*

Em 1936, Kluyver & van Niel propuseram a denominação de *Aeromonas* ao gênero que englobava bactérias isoladas do meio ambiente, geralmente aquático, as quais eram estreitamente relacionadas aos bacilos entéricos móveis por flagelo polar.

O gênero *Aeromonas* encontra-se classificado na família **Vibrionaceae**, juntamente com os gêneros *Vibrio*, *Plesiomonas* e *Photobacterium*. Engloba quatro espécies, subdivididas em dois grupos, tomando-se por base suas diferenças fenotípicas e de patogenicidade. O primeiro agrupando a espécie imóvel e psicrófila *Aeromonas salmonicida* e o segundo englobando as espécies móveis e psicrotrófilas, constituído por *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria* e *Aeromonas caviae*, (Ljungh *et al.*, 1977).

Popoff (1976) descreveu os membros deste gênero como bacilos gram-negativos, não esporulados, medindo de 0,3 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 1,0 a 3,5  $\mu\text{m}$  de comprimento. Encontram-se isolados, aos pares, ou em cadeias curtas e quando móveis, e exibem um único flagelo polar. A temperatura ótima de crescimento está ao redor de 22 a 28<sup>o</sup>C. Possuem metabolismo anaeróbio facultativo, utilizando a glicose e outros carboidratos com produção de ácido, ou ácido e gás. Reduzem o nitrato, produzem catalase e oxidase e mostram-se

resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4 diamino-6,7 diisopropilpteridina). Têm a capacidade de fermentar glicose, frutose, maltose, e trealose, o que não ocorre com adonitol, dulcitol, inositol, sorbose e xilose.

Recentemente, seis novas espécies são reconhecidas como integrantes do gênero com base em características bioquímicas e na relação de seqüência de nucleotídeos: *A. media*, *A. eucrenophila*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei*, e *A. trota*, isoladas de diferentes materiais clínicos, tais como secreção de ferimentos, abscessos e fezes diarreicas (Agger *et al.*, 1985; Janda & Duffey, 1988).

Em 1986, Colwell *et al.*, propuseram a reclassificação do gênero em outra família, denominada **Aeromonadaceae**, baseados em estudos de genética molecular e, embora tal proposição ainda não conste da última edição do Manual Bergey (1994), alguns trabalhos fazem menção à nova família (Austin *et al.*, 1996; Xin-J *et al.*, 1998).

O principal habitat das *Aeromonas* são ambientes aquáticos, representados por águas correntes e estagnadas, tanto doce quanto salgada, dejetos e alimentos, podendo infectar animais que habitam esses ambientes. Burke *et al.*, (1987) demonstraram a ocorrência de *Aeromonas hydrophila* em água tratada para o consumo doméstico, mesmo depois da cloração. Entretanto, outros estudos têm verificado uma ampla distribuição desta espécie nos mais diversos ambientes aquáticos, sob uma variedade de condições de

salinidade, temperatura e pH, o que vem sugerindo ser *Aeromonas hydrophila* um ótimo indicador de poluição da água (Seidler *et al.*, 1980).

Recentemente muitos trabalhos têm mostrado que a incidência de *Aeromonas hydrophila* em alimentos é elevada (Freitas *et al.*, 1993; Palumbo *et al.*, 1989). As amostras de *Aeromonas* que são psicrófilas, podem produzir enterotoxinas e hemolisinas inclusive na temperatura de refrigeração sugerindo que a ingestão de toxinas preformadas em alimentos poderia provocar doenças gastrointestinais (Hardy *et al.*, 1986; Majeed *et al.*, 1989).

As infecções humanas por *Aeromonas spp.* variam em um grande espectro, desde infecções localizadas a infecções sistêmicas (Black, 1990), sendo que, eventualmente, o homem pode se infectar com essas bactérias por meio do contato direto através dos ferimentos ou, indiretamente, pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados (Krovacek *et al.*, 1992a; Krovacek *et al.*, 1992b; Pedroso *et al.*, 1997). Apesar de *Aeromonas hydrophila* ser a espécie freqüentemente associada a infecções humanas, é importante destacar que as demais espécies do gênero também já foram isoladas de alimentos e água contaminada (Daily *et al.*, 1981; Krovacek *et al.*, 1991). Recentemente uma pesquisa alertou para o risco de contaminação de ferimentos por *Aeromonas hydrophila* uma vez que as mesmas vêm sendo isoladas de amostras de água para o consumo doméstico, rios, estuários, e principalmente águas de recreação como lagos e piscinas e água marinha (Haburchak, 1996).

O primeiro relato na literatura demonstrando o significado clínico de *Aeromonas* em infecção humana foi de Hill *et al.*, (1954), com o isolamento do agente e reprodução do quadro clínico e infeccioso em coelhos. Outros estudos (Figura *et al.*, 1986; Ljungh & Wadstron, 1985) verificaram que a maioria das amostras nas infecções por *Aeromonas* distribuía-se no trato gastrointestinal e que os principais sintomas encontrados eram diarreia (George *et al.*, 1986), gastroenterite (Altwegg & Geiss, 1989; Burke *et al.*, 1983; Janda *et al.*, 1983), diarreia semelhante a da cólera "cholera-like" (Champsaur *et al.*, 1982), infecção de ferimentos (Hanson *et al.*, 1977; Joseph *et al.*, 1991), gangrena gasosa (Quinot *et al.*, 1982; Heckerling *et al.*, 1983) e septicemia (Picard *et al.*, 1984), sendo que para pacientes imunodeprimidos estas doenças podem ser fatais (Picard *et al.*, 1984; Khalifa, 1989).

Segundo von Graevenitz (1985) as infecções humanas por *Aeromonas spp.* podem ser classificadas em quatro categorias: infecções cutâneas e subcutâneas; septicemias; infecções sistêmicas e infecções gastrointestinais.

As infecções cutâneas e subcutâneas têm sido relacionadas com exposição traumática desses tecidos à água, tais como acidentes de trabalho em barcos, pescaria, mergulho ou mesmo durante a prática de natação ou recreação em águas (Cahill; 1990; Freitas *et al.*, 1993; Gracey *et al.*, 1982).

Alguns estudos mostraram associação de *Aeromonas spp.* a quadros de bacteremia e septicemia em indivíduos imunodeprimidos e outras doenças

debilitantes, tais como: leucemias, neutropenias, tumores, síndrome da imunodeficiência adquirida (Freid, 1987; Janda *et al.*, 1983; Janda & Brenden, 1987) à idade avançada e infecções pelo gênero em outros sítios do organismo, geralmente intestinal (Burke *et al.*, 1987; Schiavano *et al.*, 1998).

No início dos anos 60, a *Aeromonas spp.* foi pela primeira vez implicada como agente de gastroenterite humana, durante um surto de diarreia no berçário de um hospital da cidade de Bogotá, Colômbia (Martínez-Silva *et al.*, 1961).

Numerosos estudos sobre incidência, aspectos clínicos e fatores de virulência das espécies psicrófilas de *Aeromonas spp.* têm sido publicados, procurando associá-las à enteropatogenicidade e os possíveis mecanismos pelos quais provoca doenças em homens e animais (Caselitz, 1966; Cumberbatch *et al.*, 1979; Janda & Brenden, 1987; Khalifa, 1989; Ferguson *et al.*, 1997).

Estudos epidemiológicos sobre a incidência de *Aeromonas spp.* em gastroenterites têm sido realizados em vários países, principalmente na Austrália, Europa e E.U.A. (Black, 1990; Houston *et al.*, 1991; Kuijper *et al.*, 1989; Janda & Brenden, 1987; Pitarangsi *et al.*, 1982).

Na América do Sul, incluindo-se o Brasil são poucos os estudos realizados sobre o papel desempenhado por amostras de *Aeromonas* como patógenos entéricos. Entretanto as pesquisas realizadas por Khalifa, (1989) e

Pereira (1992) demonstraram a presença de amostras pertencentes ao gênero *Aeromonas spp.* em fezes de indivíduos e crianças com diarreias. Paralelamente, Neves & Nunes, (1994) isolaram mais de 200 amostras de *Aeromonas spp.*, a partir de diferentes materiais tais como água doce, água salgada, queijos, leite e urina. Recentemente, um estudo realizado em Araraquara, (SP) revelou a presença de amostras de *Aeromonas spp.* e *Vibrio cholerae* a partir de diversas fontes analisadas, sendo que as amostras de *Aeromonas* apresentavam resistência múltipla as drogas (Falcão *et al.*, 1998).

Apesar das diferenças de incidência deste gênero nas diversas áreas geográficas, os vários levantamentos epidemiológicos indicaram a *Aeromonas hydrophila* como a espécie mais frequentemente isolada (Figura *et al.*, 1986; Khurama & Kumar, 1997; Ljungh, 1987). Ademais esta espécie tem sido associada à diarreia que acometem os indivíduos que se deslocam a regiões subdesenvolvidas, "diarreia de viajantes", causando dores abdominais e diarreia com duração inferior a sete dias (Black, 1990).

Vários marcadores de virulência têm sido descritos procurando explicar a patogênese das infecções intestinais. Dentro das substâncias que podem desenvolver um importante papel no processo das doenças intestinais, encontram-se as enterotoxinas, hemolisinas, citotoxinas, hemaglutininas, assim como a capacidade da bactéria aderir às células, de expressão de algumas proteínas de superfície e de invasão em células epiteliais (Cahill, 1990; Donta & Haddow, 1978; Lawson *et al.*, 1985).

Dentro desse contexto vários produtos extracelulares foram detectados nos sobrenadantes de cultura de *Aeromonas spp.*, representados, principalmente pelas citotoxinas e enterotoxinas (Levett *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1987; Rose *et al.*, 1989a). Por outro lado, a maioria das amostras isoladas de material clínico revelaram-se hemolíticas, sugerindo serem as hemolisinas um dos importantes fatores de virulência (Ljungh *et al.*, 1981; Stelma *et al.*, 1986; Wretling & Heden, 1973).

*Aeromonas hydrophila* produz dois tipos de hemolisinas: alfa e beta. A alfa-hemolisina é liberada da célula durante a fase estacionária, provocando lise parcial de eritrócitos e a beta-hemolisina liberada no final da fase logarítmica de crescimento possui atividade citotóxica para várias linhagens celulares e provocando hemólise total em ágar sangue (Caselitz, 1966; Ljungh *et al.*, 1981; Wretling *et al.*, 1971).

A  $\beta$ -hemolisina foi purificada e caracterizada como uma proteína termolábil de aproximadamente 49 a 53 kDa, denominada "aerolisina" (Bernheimer & Avigar, 1974). O gene determinante para aerolisina de *Aeromonas hydrophila* foi clonado, mapeado e expresso em *Escherichia coli* K12 por Chakraborty *et al.*, (1986) e Howard & Buckley, (1985).

Uma hemolisina de 50 kDa foi identificada em *Aeromonas hydrophila* que produz um efeito citotóxico em células Vero e induz acúmulo de líquido no intestino de camundongos recém-nascidos e no teste de alça ligada de coelho

(Asao *et al.*, 1986). Embora as hemolisinas purificadas a partir de diferentes isolamentos tenham apresentado diferenças imunológicas e físico-químicas, os resultados indicaram que as atividades citotóxica e enterotóxica podem estar presentes na mesma molécula de proteína (Chakraborty *et al.*, 1987). Entretanto, algumas investigações (Figura *et al.*, 1986) caracterizam a produção de hemolisina sem atividade enterotóxica, vários estudos têm demonstrado que pode existir uma correlação entre hemólise, citotoxicidade e enterotoxicidade nas amostras de *Aeromonas* (Chopra *et al.*, 1986; Cumberbatch *et al.*, 1979; Wadstrom *et al.*, 1976). Recentemente uma elevada produção de hemolisina e citotoxina foi verificada no estudo dos fatores de virulência envolvidos em 18 casos de bacteremia produzida pela *Aeromonas hydrophila* (Vadivelu *et al.*, 1995).

As enterotoxinas do gênero *Aeromonas spp.* têm sido consideradas como importante estímulo de eventos bioquímicos que se associam com os quadros diarreicos agudos. No obstante a natureza controvertida destas enterotoxinas, alguns pesquisadores as classificaram em citotóxicas e citotônicas com base nas alterações morfológicas causadas em culturas celulares. Assim, temos a toxina colérica (CT) e a toxina termolábil de *Escherichia coli* (LT) são exemplos clássicos de enterotoxinas citotônicas, capazes de induzir a formação de esteróides e arredondamentos típicos em células Y-1 (Keuch & Donta, 1975). Com relação, as enterotoxinas produzidas pelos *Clostridium perfringens* e *Shigella dysenteriae* são citotóxicas em células HeLa causando a morte celular.



A enterotoxina citotóxica é considerada o fator de virulência mais importante associado aos quadros de diarreia provocados por *Aeromonas spp.* e parece ser produzida com maior frequência pelas amostras de *A. hydrophila* e *A. sobria* comparada a *A. caviae* (Burke *et al.*, 1987). Uma enterotoxina citotóxica presente na maioria das amostras de origem clínica e do meio ambiente foi caracterizada biológica e molecularmente, determinando-se a sua sequência de aminoácidos (Buckley *et al.*, 1981; Howard & Buckley, 1987).

Amostras de *Aeromonas spp.* produziram uma enterotoxina de aproximadamente 63.000 Da, diferente sorologicamente da toxina colérica (CT), que causava acúmulo de fluidos em alça ligada de coelhos e camundongos, com capacidade de causar hemólise frente a tipos de hemácias, apresentando efeito citotóxico em cultura de células (Potomski *et al.*, 1987a).

A purificação e caracterização química e imunológica de uma enterotoxina de 52 kDa isolada de *Aeromonas hydrophila* foi descrita apresentando atividades citotóxica e enterotóxica, e também similaridade imunológica com a toxina colérica (Rose *et al.*, 1989a).

Estudos recentes, descreveram a purificação e caracterização biológica de uma enterotoxina citolítica (Act) de 52 kDa, isolada de fezes de humanos com diarreia, cujo agente causal foi classificado bioquimicamente como *Aeromonas hydrophila* (Ferguson *et al.*, 1995; Ferguson *et al.*, 1997). Além de atividades citotóxica, enterotóxica e hemolítica, os autores também

demonstraram que a enterotoxina Act estava intimamente relacionada sorologicamente com a toxina colérica e apresentava certa semelhança com a aerolisina descrita por Howard *et al.* (1985).

Na última década diversos estudos tem sido realizados para elucidar o mecanismo de ação da enterotoxina citotóxica. Assim, uma exoproteína secretada sob forma inativa (68 kDa), é ativada pela clivagem proteolítica de seu precursor (52 kDa). A proteína de 52 kDa liga-se à membrana celular da célula alvo com subsequente agregação e formação de poros (Chakraborty *et al.*, 1986; Ferguson *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1989b).

Além de hemolisina e citotoxina, as enterotoxinas citotônicas têm sido objeto de vários estudos, desde que Sayal *et al.*, (1975) demonstraram que cultivos de *Aeromonas hydrophila* causavam acúmulo de fluido intestinal em alça ligada de coelho, o que foi confirmado por Ljungh *et al.* (1976).

Uma enterotoxina termolábil produzida pelas amostras de *A. hydrophila*, capaz de provocar alterações morfológicas em células de tumor de adrenal de camundongos (linhagem Y-1) e relacionada antigenicamente com a enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* foi descrita por Dobrescu (1978).

Outra enterotoxina termolábil produzida pela *Aeromonas spp.*, com peso molecular de 15.000 daltons, é capaz de causar acúmulo de fluido em alça ligada de coelho, ratos e camundongos, mas não em camundongos recém-

nascidos. Esta enterotoxina tem efeito citotônico em células Y-1, levando ao acúmulo de AMPcíclico intracelular, e não mostra relação sorológica com a CT, sendo também não hemolítica (Ljungh *et al.* 1982).

Chopra & Houston (1989) descreveram uma enterotoxina de *Aeromonas*, diferente daquela descrita por Ljungh *et al.* (1982), sendo esta positiva em camundongos recém-nascidos. Estes pesquisadores também demonstraram a não homologia entre esta enterotoxina citotônica e a LT ou ST de *E. coli*.

Por outro lado, uma enterotoxina foi caracterizada como uma proteína com peso molecular ao redor de 27.000 Da, capaz de causar acúmulo de fluidos em alça ligada de rato e em testes de camundongos recém-nascidos. Esta enterotoxina de *Aeromonas spp.* apresentava similaridade antigênica com a toxina de *Vibrio cholerae*, uma vez que o seu efeito citotônico é neutralizado por antissoro anti-CT específico (James *et al.*, 1982). Estes pesquisadores também demonstraram que a enterotoxina causa efeito citotônico em células Y-1, assemelhando-se em muitos aspectos à toxina colérica (CT) produzida pelo *Vibrio cholerae*.

A clonagem do gene determinante para a enterotoxina de *Aeromonas hydrophila* em *Escherichia coli*, demonstrando a produção da toxina sem atividades citotóxica ou hemolítica nos testes de alça ligada de coelho e em camundongos recém-nascidos, indicativo de que *Aeromonas hydrophila* pode apresentar diferentes loci gênicos para a síntese de enterotoxina, hemolisina e

citotoxina (Chakraborty *et al.*, 1984).

Considerando-se os dados referidos anteriormente e os escassos estudos existentes na América Latina, notadamente no Brasil, levou-nos a avaliar o papel das espécies de *Aeromonas* e de seus marcadores de virulência, principalmente a enterotoxina citotóxica na patogênese das infecções intestinais humanas. Desta forma o presente trabalho teve como objetivos:

1. Determinar as condições ótimas para a produção da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*;
2. Estabelecer e padronizar uma estratégia para a purificação da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* e,
3. Estudar os efeitos da atividade biológica produzida pela enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*.

### *3. Material e Métodos*

### 3.1 Amostras bacterianas.

Uma amostra padrão de *Aeromonas hydrophila* (AH191) enterotoxigênica e hemolítica (Hly<sup>+</sup>), gentilmente cedida pela Fundação Tropical "André Tosello", Campinas, SP, foi utilizada para o presente estudo. Outras amostras padrão utilizadas foram *Escherichia coli* enteroxigênica 40T (LT 1<sup>+</sup>), *Escherichia coli* verotoxigênica 8B (VTy<sup>+</sup>) e *Aeromonas hydrophila*, AH69, não produtora de enterotoxina (Serafim *et al.*, 1994).

Todas as amostras bacterianas foram mantidas em tubos com meio Ágar Nutriente a temperatura ambiente e em meio caldo Nutriente contendo 20% glicerol a -70°C.

### 3.2 Padronização das condições de cultivo da Ent-Ctx de *Aeromonas hydrophila*.

#### 3.2.1 Variações nas condições de cultivo.

Para verificar as condições de cultivo mais favoráveis e estabelecer os parâmetros para a produção da enterotoxina citotóxica foram realizados os testes com relação a:

- a) **Meios de cultura:** A amostra padrão AH191 foi cultivada em meio Caldo Tripticase de Soja, (TSB, DIFCO) suplementado com 0,6% de extrato de levedo (EY, DIFCO), segundo Neves & Nunes (1994) e meio

Casamino Acido, suplementado com 0,6% de extrato de levedo e 0,6% de NaCl (Rose *et al.*, 1989a).

b) **Variações de pH do meio:** O meio de cultura foi ajustado a diferentes valores de pH (6,5; 7,5; 8,5 e 9,5), com 0,1 N de NaOH ou HCl.

c) **Variações de temperatura:** A cultura foi submetida a diferentes temperaturas, a saber 20°C, 30°C, e 37°C.

Para a definição da maior produção de Ent-ctx diluições seriadas (razão 2) dos sobrenadantes das diferentes culturas foram testados para a atividade citotóxica em células Vero, por visualização do efeito citopático típico.

### **3.3 Produção da enterotoxina citotóxica.**

Para a produção da Ent-ctx foram preparados pré-cultivos da amostra AH191 em tubos de 10 ml de meio TSB-EY (previamente definido como ótimo para a maior produção de Ent-ctx). Após 6 horas esta cultura foi inoculada em uma concentração de  $2,7 \times 10^9$  bactérias/ml (escala 8 de Mac Farland) em seis Erlenmeyers de 1 litro com 300 ml de meio TSB-EY. As culturas foram incubadas durante a noite, com agitação de 150 rpm (Gosling *et al.*, 1993). Em seguida, a cultura bacteriana foi centrifugada a  $10.400 \times g$  durante 20 minutos a 4°C, separando o sobrenadante e conservando a -70°C.

### **3.4 Metodologia para a purificação da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

#### **3.4.1 Precipitação com Sulfato de Amônio (SA)**

O sobrenadante de cultura obtido como descrito anteriormente, foi ajustado para pH 6,0 e submetido a precipitação com diferentes porcentagens: 40, 60, 70, e 80% de saturação de sulfato de amônio (Merck), sob agitação constante a 4<sup>o</sup> C. Após precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10.400 x g durante 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 30 ml de tampão Tris- HCL 0,01M pH 7,6 e dialisado contra o mesmo tampão com 1M de sulfato de amônio durante 24 horas.

#### **3.4.2 Processos cromatográficos.**

A primeira cromatografia realizada no processo de purificação foi a de interações hidrofóbicas, utilizando-se coluna de Phenyl Sepharose CL-4B (Pharmacia). O empacotamento e ativação foram realizados segundo as recomendações do fabricante. Foram aplicados 10 ml do material precipitado previamente dialisado contra tampão Tris-HCl 0,01 M pH 7,6 com 1M de sulfato de amônio, equilibrada com o mesmo tampão e eluída com um gradiente linear inverso de sulfato de amônio de 1-0M. O fluxo usado durante as corridas cromatográficas foi de 2,5 ml/min. As frações cromatografadas foram monitoradas a 280 nm em espectrofotômetro (LKB Uvicord SII, Pharmacia).



As frações cromatográficas com atividade citotóxica, testadas em células Vero, foram concentradas em Amicon PM 10 (10 kDa) e, em seguida, submetidas a coluna de troca aniônica Q Sepharose fast flow (40x 15 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,6 e eluída com um gradiente não linear de 0,15 a 0,35M de NaCl no mesmo tampão sendo usado um fluxo de 5ml/min. As frações cromatografadas foram monitoradas a 280 nm em espectrofotômetro (LKB Uvicord SII, Pharmacia). O material eluído que apresentava atividade citotóxica foi dialisado contra tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,6 e concentrado por centrifugação a vácuo, "Speed Vac" (IS 110, Savant). Em seguida, este material (100µl) foi aplicado no sistema de cromatografia líquida de alta resolução HPLC (Shimadzu) utilizando a coluna Superdex 200 HR (Pharmacia) com dimensões de 10 x 30 cm. Para a eluição foi utilizado um fluxo de 0,3 ml/min. As frações foram eluídas utilizando tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,6 com 0,15M de NaCl.

A fração com atividade citotóxica testada em células Vero foi concentrada e dialisada contra tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,6 e aplicada em coluna Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) no sistema HPLC. Foi aplicado um gradiente linear de 0 a 0,5M de NaCl utilizando um fluxo, de 0,5 ml/min.

O processo foi repetido em série e os picos cromatográficos obtidos foram concentrados em "Speed-Vac" antes de testar a atividade biológica de cada fração.

### **3.4.3 Determinação da concentração protéica.**

A concentração de proteínas durante todo o processo de purificação foi determinada segundo a metodologia descrita por Bradford, 1976, utilizando o kit de reagentes da BIO-RAD, contendo a solução Bradford concentrada e a proteína BSA (1,35 mg/ml) para a realização da curva padrão, cuja faixa de sensibilidade encontra-se entre 0,2 e 0,9 mg/ml. Foram adicionados a 100  $\mu$ l das amostras, 5 ml do reagente de cor concentrado (Azul de Coomassie, 25% de metanol e 50% de ácido fosfórico) diluído 1:4. Depois de agitados vigorosamente e incubados por 5 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro (DU 65 Spectrophotometer, Beckman) no comprimento de onda de 595 nm.

### **3.4.4 Análise eletroforética.**

#### **3.4.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida convencional (PAGE).**

A eletroforese em gel de poliacrilamida convencional (PAGE) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1970), com gel de 1,5 mm ao 7,5%. As amostras (25 $\mu$ l) e o padrão de alto peso molecular (5  $\mu$ l) (Pharmacia) foram preparados misturando-os com 5  $\mu$ l do tampão amostra (Tris-HCl 0,03M pH 6,8, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,05%). As corridas electroforéticas foram desenvolvidas utilizando uma amperagem constante de 15 mA/gel.

#### **3.4.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE).**

O SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) foi realizado usando géis com espessura de 1,5 mm e gel de separação de 12% (Laemmli,1970). As amostras e os marcadores de alto e baixo peso molecular (Pharmacia) foram misturados volume/volume com o tampão de amostra (Tris-HCl 0,125M pH 6,8 SDS 4%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,025%). Para garantir as condições não redutoras foi usado o mesmo tampão sem  $\beta$ -mercaptoetanol. Em ambos os casos as amostras foram aquecidas a 100<sup>o</sup>C por 5 minutos.

A eletroforese foi realizada utilizando-se amperagem constante de 15 mA/gel.

#### **3.4.4.3 Coloração dos géis de poliacrilamida.**

Os géis foram fixados e corados pela prata, seguindo-se a metodologia descrita por Blum *et al.* (1987). Primeiramente o gel foi imerso em solução fixadora (etanol 50%, ácido acético glacial 12%) por no mínimo 60 minutos e, posteriormente, lavado em etanol 50% por três vezes em intervalos de 20 minutos. A seguir o gel foi imerso numa solução de pré-tratamento ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,02%) durante 1 minuto e lavado três vezes com água bidestilada. A impregnação com prata foi realizada usando uma solução de  $\text{AgNO}_3$  0,2%-formaldeído 0,075% por 20 minutos, sendo posteriormente lavado

por tres vezes com água bidestilada e revelado com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6%,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,4% e de formaldeído 0,05%. A revelação foi interrompida usando uma solução de etanol 50%-ácido acético glacial 12%. Em todos os passos foi utilizada uma agitação moderada. O gel foi conservado em solução de ácido acético 5% até a secagem do mesmo.

### **3.5 Caracterização biológica da toxina.**

#### **3.5.1 Ensaio para a detecção da atividade citotóxica.**

##### **3.5.1.1 Preparação das culturas celulares.**

Células Vero (células de rim de macaco verde africano) foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para uma garrafa contendo MEM (meio mínimo essencial de Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de solução de antibióticos (penicilina 1.000 U/ml-estreptomicina 250ug/ml) e mantidas em estufa a 37°C até a confluência da monocamada. Após esse período foi descartado o meio de cultura das garrafas. A monocamada foi lavada com solução de Hank's e desfeita com a adição de ATV (associação tripsina-Versene). As células foram ressuspensas em MEM acrescido de 10% de SFB e 1% de antibióticos, para uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/ml e transferidas para placas de 96 orifícios, adicionando 0,1 ml da suspensão celular/orifício. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas.

### 3.5.1.2 Teste de citotoxicidade.

A atividade citotóxica da Ent-ctx foi avaliada em células Vero, comparativamente às linhagens celulares CHO (células de ovário de hamster) e 3T3 (fibroblasto de camundongos) segundo a metodologia descrita por O'Brien *et al.* (1987). Após a formação da monocamada celular o meio de cultura das placas foi dispensado. Duplicatas das amostras obtidas durante o processo de purificação, em diluições seriadas (razão 2) em 0,1 ml de meio MEM contendo 1% de solução de gentamicina (10 mg/ml), foram adicionadas aos orifícios das placas contendo a monocamada celular. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram realizadas leituras diárias em microscópio invertido (Axiosvert-Zeiss) por 72 horas. Foi considerada como positivo a recíproca da maior diluição de cada amostra que provocava 50% de citotoxicidade. Foram utilizados como controles positivos as amostras de *E. coli* enterotoxigênica 40T e *E. coli* verotoxigênica 8B e como controles negativos a amostra de *A. hydrophila* AH69 e, o meio TSB-EY para monitorar o experimento.

### 3.5.2 Determinação da CD<sub>50</sub>.

A CD<sub>50</sub> foi testada em placas de 96 orifícios em monocamadas de células Vero (definida como a linhagem celular de maior sensibilidade), segundo Borenfreund & Puemer (1984). O título da citotoxina foi expresso como a

recíproca da maior diluição da citotoxina que causou 50% de citotoxicidade/morte ( $CD_{50}$ ) da monocamada de células após 72 horas. Cada experimento foi realizado em quadruplicata e observado diariamente ao microscópio invertido (Zeiss/Axioskop), por 72 horas.

### **3.5.3 Cinética da citotoxicidade da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

Para determinar o tempo mínimo necessário para a citotoxina induzir alterações morfológicas em células Vero, foram feitas observações em microscópio invertido em intervalos de 1 hora até observar 100% da morte celular.

### **3.5.4 Estudo das alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* em células Vero.**

Foram preparadas diluições em série utilizando em meio MEM com 1% de uma solução de gentamicina (10 mg/ml) do material obtido nas diferentes etapas do processo de purificação. As células Vero e CHO, depois de tripsinizadas foram ressuspensas em MEM-SFB para uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/ml e transferidas para placas de 24 orifícios estéreis, com 1 ml de suspensão celular/orifício, sendo colocados em cada orifício lamínulas de vidro. Após a visualização do efeito citopático as lamínulas foram primeiramente lavadas com solução de PBS e posteriormente tratadas por 1 hora com solução de formaldeído 10 % em PBS. As lamínulas foram fixadas e

depois lavadas com água destilada suficiente para retirar o excesso de solução fixadora. Para a coloração usou-se o método descrito por Mello & Vidal, (1980) para glicosaminoglicanos ácidos com Azul de Toluidina 0,025% (AT) em tampão Mc Ilivane pH 4,0. As lamínulas foram coradas pelo AT por 15 minutos, lavadas com três banhos de água destilada e postos a secar ao ar. Por último, foram montadas em lâminas usando o Bálsamo de Canada. O material foi observado em microscópio Axioskop, (Zeiss).

### **3.5.5 Termo-estabilidade da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

Foram mantidas amostras do sobrenadante nas temperaturas de -70, 4, 56, 65, e 100<sup>o</sup> C que posteriormente foram testadas quanto à atividades citotóxicas em células Vero como descrito no item 3.5.1.2.

### **3.5.6 Teste de atividade enterotóxica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

#### **3.5.6.1 Alça ligada de intestino de coelho.**

Foram utilizados coelhos albinos da raça New Zeland, pesando de 1,5 a 2,0 kg e mantidos em jejum por 24 horas. Para a cirurgia, os animais foram anestesiados com Rompum (5 mg/kg) e Ketolar (40mg/kg). Após tricotomia da parede abdominal, o intestino delgado foi exposto e mantido úmido com PBS. Foram feitas alças ligadas de aproximadamente 5 cm cada uma e para isto o

intestino delgado foi amarrado com linha cirúrgica a aproximadamente 10 cm do estômago, no sentido próximo-distal. Em seguida, cada alça foi inoculada com 1 ml da amostra a ser examinada. Após a inoculação, os intestinos foram recolocados na cavidade abdominal, procedendo-se à sutura do peritônio, camada muscular e pele. Os animais foram mantidos por 18 horas e posteriormente sacrificados por deslocamento cervical. O intestino delgado foi retirado e foram feitas as medições do volume de líquido acumulado em cada alça e o comprimento da mesma. O coeficiente RIL (volume do conteúdo da alça/comprimento da alça em cm) foi considerado positivo com valores superiores a 1 ml/cm (Blanco *et al.*, 1993). Para o experimento foram usadas as amostras de *A. hydrophila* AH 191 (sobrenadante de cultura e amostra semipurificada) e, como controles negativos a amostra de *A. hydrophila* AH69 e, o meio TSB-EY para monitorar o experimento.

### **3.5.7 Teste de atividade hemolítica.**

A atividade hemolítica das amostras provenientes de cada etapa do processo de purificação foi testada frente a hemácias de carneiro ressuspensas a 1% em PBS 0,05M pH 7,4 (Bhakdi *et al.*, 1986). Diluições seriadas com 100 µl das amostras em estudo foram feitas em placa de microtítulo mantida em banho de gelo, sendo em seguida acrescentado um mesmo volume da suspensão de hemácias. As placas foram incubadas a 37°C, durante uma hora



e, logo após, foi observada a lise celular. Foi considerada positiva a recíproca da maior diluição de cada amostra que provocava 50% de lise celular (leitura visual).

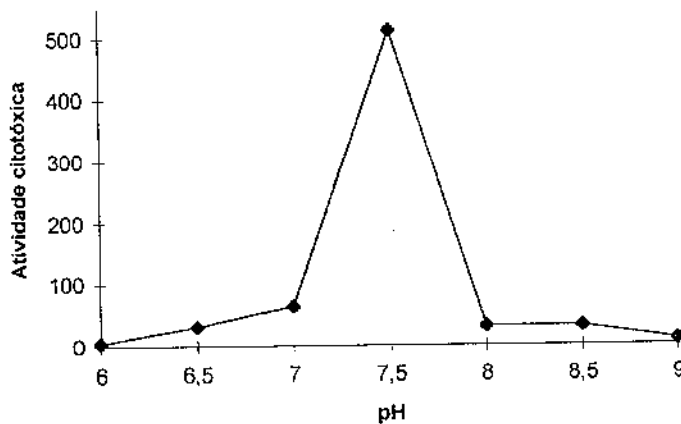
## *4. Resultados*

#### 4.1 Produção e purificação da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.

##### 4.1.1 Padronização da produção da Ent-ctx.

Em nossos estudos a amostra padrão de *Aeromonas hydrophila* AH191 foi cultivada em meio TSB, suplementado com 0,6% de extrato de levedo (EY) recomendado para a produção da enterotoxina citotóxica, que proporcionou um maior título (1:256) de atividade citotóxica em células Vero comparado com o uso do meio Casamino-Ácidos suplementado com 0,6% de extrato de levedo e 0,6% de NaCl (1:64).

Ao testar os diferentes valores de pH do meio de cultura, a atividade citotóxica (1: 512) em células Vero, mostrou-se máxima no pH 7.5 (Figura 1).



**FIGURA 1:** Efeito dos diferentes valores de pH na produção da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*.

A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou o efeito citotóxico nas células Vero (24 horas).

A atividade citotóxica foi determinada em células Vero segundo Keuch *et al.*;1975.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na produção da Ent -ctx a partir das culturas da amostra AH191 sob diferentes temperaturas, submetidas a 18 horas de incubação.

**TABELA 1:** Efeito das diferentes temperaturas na produção da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* (18 horas de cultivo).

Temperaturas	Título de atividade citotóxica <sup>1</sup>
20 °C	64
30 °C	128
37 °C	512

<sup>1</sup>O título da atividade citotóxica expresso é a recíproca da maior diluição que provocou efeito citotóxico em células Vero.

A atividade citotóxica foi determinada em células Vero segundo Keuch *et al.*;1975.<sup>2</sup>

Nos experimentos realizados em diferentes temperaturas foram também testadas as atividades enterotóxica e hemolíticas (dados não mostrados). As leituras foram realizadas cada 2 horas, obtendo-se os melhores resultados na faixa de 18 a 20 horas de cultivo.

Os resultados demonstraram que houve um aumento significativo no título de citotoxicidade quando o cultivo foi realizado a 37 °C de temperatura.

#### 4.1.2 Processos de purificação.

##### 4.1.2.1 Precipitação com sulfato de amônio.

Na Tabela 2 são mostrados os valores da atividade citotóxica obtidas na experiência a 60, 70 e 80 % de saturação de sulfato de amônio.

**TABELA 2:** Resultados da atividade citotóxica da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* em células Vero, obtidos após a precipitação do sobrenadante de cultura em diferentes porcentagens de sulfato de amônio.

Porcentagem de Sulfato de Amônio	Atividade Citotóxica <sup>1</sup>
Toxina Bruta	512
40 %	ND
60 %	8192
70 %	1024
80 %	128

<sup>1</sup>O título da atividade citotóxica expresso é a recíproca da maior diluição que provocou efeito citotóxico em células Vero.

<sup>2</sup>ND Não determinada

Com 40 % de SA o precipitado obtido foi desprezível e a atividade citotóxica não foi determinada. A precipitação com 60% de sulfato de amônio mostrou conter a maior atividade citotóxica (1:8192), comparado com as outras

porcentagens ensaiadas.

#### 4.1.2.2 Cromatografias.

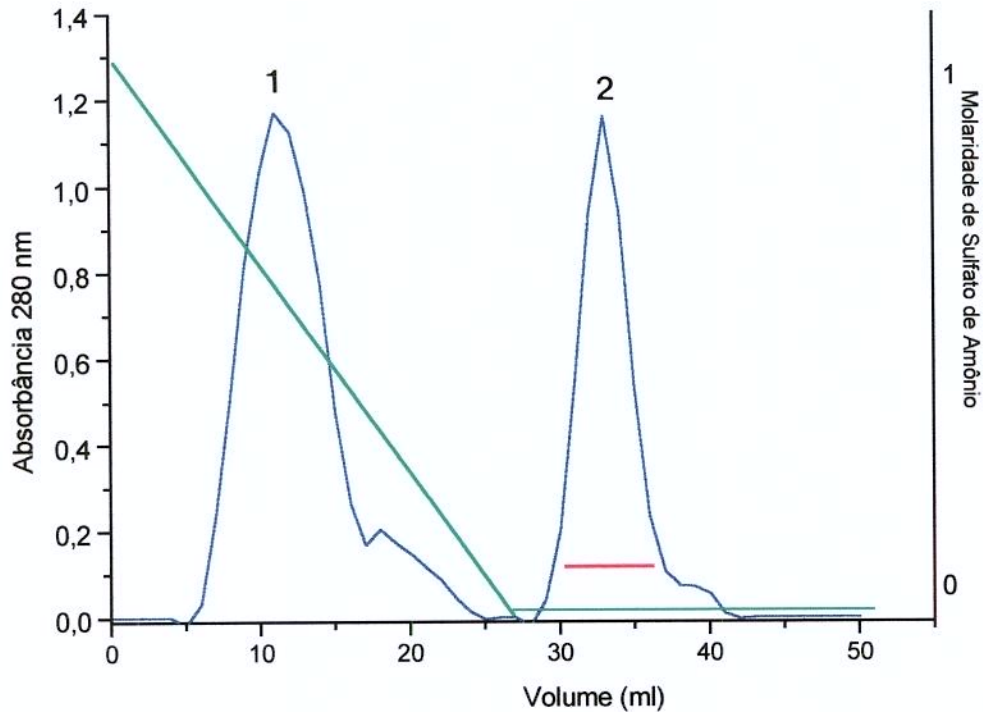
O precipitado a 60% de saturação com sulfato de amônio foi aplicado em cromatografia de interações hidrofóbicas (Phenyl-Sepharose CL-4B), usando-se um gradiente linear inverso de 1 a 0M de sulfato de amônio (Figura 2). O pico 2, eluído com tampão 0,01M Tris HCl pH 7,6 mostrou a maior atividade citotóxica (1:4096) em células Vero.

As frações citotóxicas concentradas por ultrafiltração em AMICON PM-10, foram cromatografadas em coluna de troca aniônica Q Sepharose Fast Flow (Pharmacia). A atividade citotóxica (1:4096) foi eluída com gradiente de 0,35M de NaCl (Figura 3).

As frações foram concentradas no "Speed-Vac", dialisadas, e aplicadas em cromatografia de exclusão molecular Superdex 200 no sistema HPLC (Figura 4).

O pico cromatográfico com a maior atividade citotóxica (1:1024) foi concentrado e cromatografado em coluna de troca iônica (Mono Q) no sistema HPLC sendo eluído em gradiente linear de 0 a 0,5M de NaCl (Figura 5). A maior atividade citotóxica (1:64) foi observada no pico eluído com 0,26M de sal.

Na Tabela 3 são mostrados os resultados obtidos durante o processo de purificação. Os diferentes parâmetros foram calculados para avaliar a eficiência dos processos de purificação.



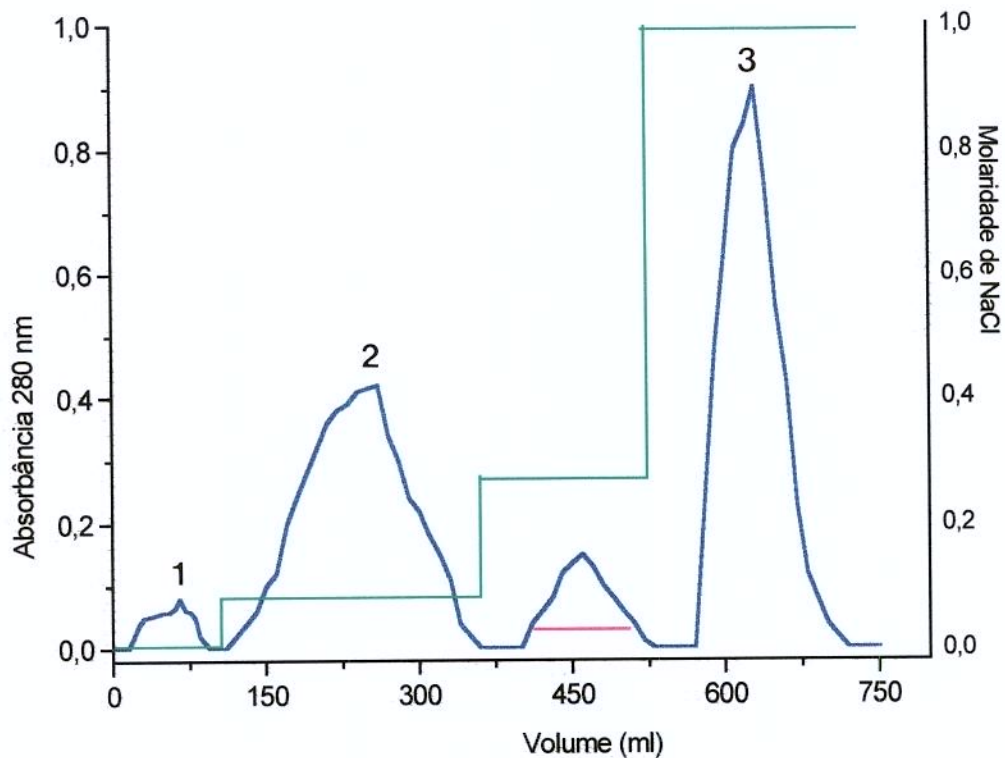
**FIGURA 2:** Perfil de eluição obtido com a cromatografia de interações hidrofóbicas Phenyl Sepharose CL-4B, usando um gradiente linear inverso de 1-0 M de sulfato de amônio.

1-Pico eluído com tampão Tris-HCl 0,01 M; pH 7,6 com sulfato de amônio 1 M

2-Pico eluído com tampão Tris-HCl 0,01 M; pH 7,6 .

— Pico com maior atividade citotóxica (1:4096)

A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou o efeito citotóxico em células Vero (24 horas).



**FIGURA 3:** Perfil de eluição obtido com a cromatografia de Troca Aniônica em Q Sepharose Fast Flow, usando um gradiente não linear de 0-1 M de NaCl.

1-Pico eluído com tampão Tris-HCl 0,01 M; pH 7,6 com 0,15M de NaCl

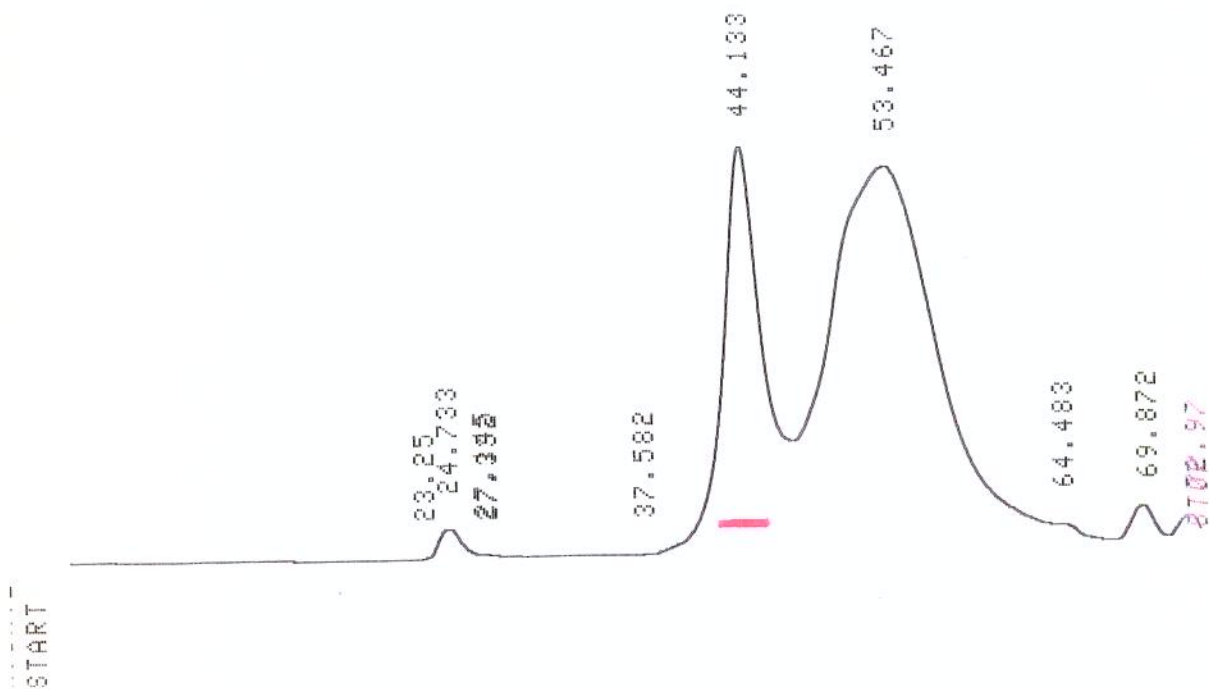
2-Pico eluído com tampão Tris-HCl 0,01 M; pH 7,6 com 0,35M de NaCl.

3-Pico eluído com tampão Tris-HCl 0,01 M; pH 7,6 com 1M de NaCl.

— Pico que mostrou a maior atividade citotóxica (1:4096).

A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou o efeito citotóxico em células Vero (24 horas).

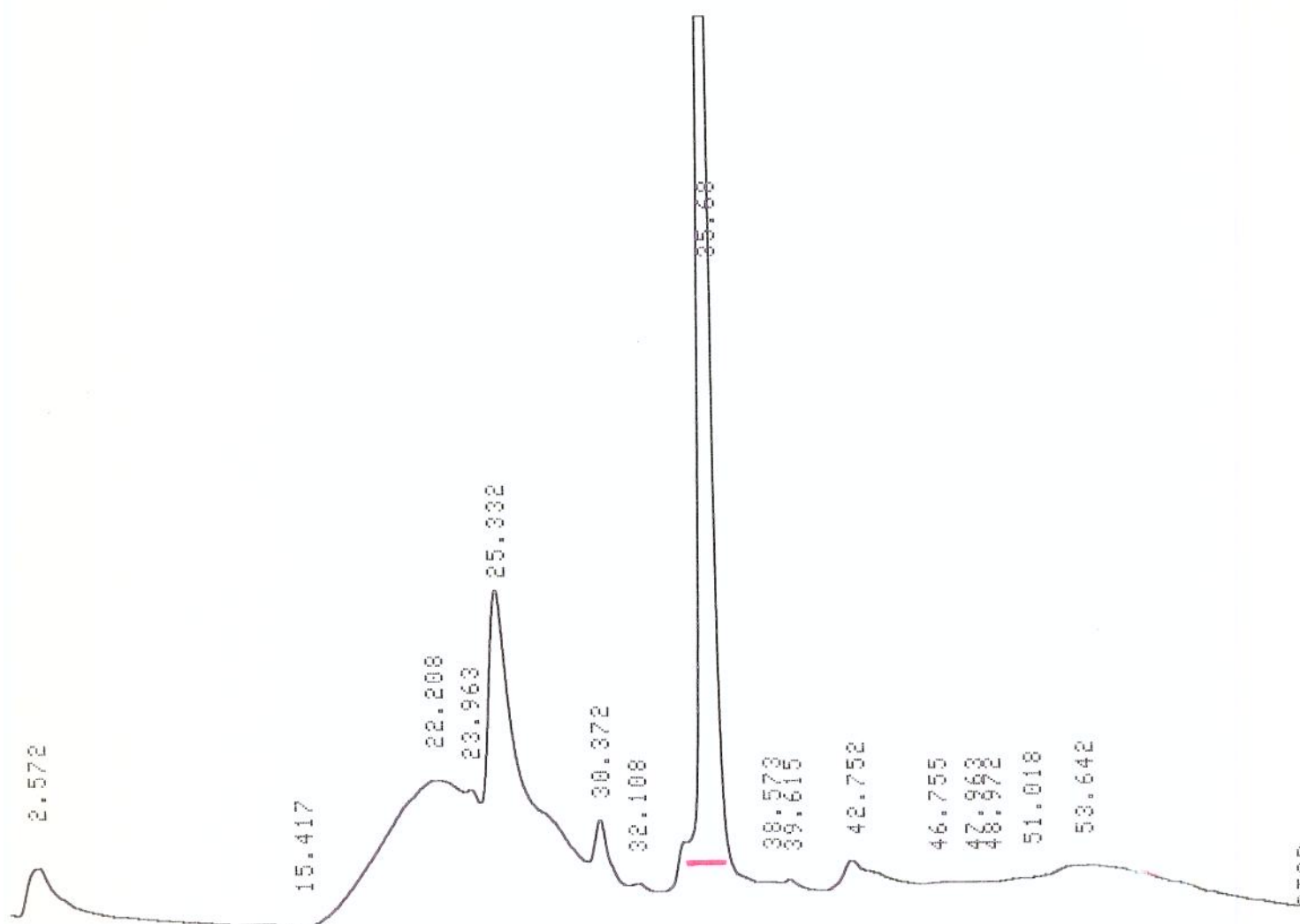




**FIGURA 4:** Perfil de eluição obtido com a cromatografia de exclusão molecular Superdex 200 HR no sistema HPLC, usando tampão Tris-HCl 0,01 M; pH 7,6 com 0,15 M de NaCl.

— Pico com maior atividade citotóxica (1:1024)

A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou o efeito citotóxico em células Vero.



**FIGURA 5:** Perfil de eluição obtido com a cromatografia de troca aniônica Mono Q HR 5/5 no sistema HPLC, usando um gradiente linear de 0 a 0,5M de NaCl, em tampão Tris-HCl 0,01 M; pH 7,6.

— Pico com maior atividade citotóxica (1:64)

A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou o efeito citotóxico em células Vero.

TABELA 3: Resumo do processo de purificação da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*.

Passos da Purificação	Vol. (ml)	Conc. Proteínas Total (mg)	Conc. Proteínas (mg/ml)	Atividade Citotóxica ( $CD_{50}/ml$ ) <sup>2</sup>	Atividade Específica ( $CD_{50}/mg$ ) <sup>2</sup>	Purificação
Toxina Bruta	1 000	1 010	1,00	$0,12 \times 10^2$	12,0	1,0
Precipitado 60% S.A*	70	840	12,00	$0,32 \times 10^3$	26,0	2,3
Phenyl Sepharose**	30	131,4	4,38	$0,44 \times 10^3$	100,3	8,4
Q-Sepharose**	10	20,03	2,03	$0,44 \times 10^3$	216,7	18,1
Superdex-200/HPLC	0,6	0,2	0,33	$1,77 \times 10^3$	5 363	446,9
Mono Q/HPLC	0,3	0,0135	0,045	$2,8 \times 10^4$	622 222	5 185,2

$CD_{50}$ -Recíproco da maior diluição que causa 50 % de citotoxicidade/morte da monocamada celular de células Vero.

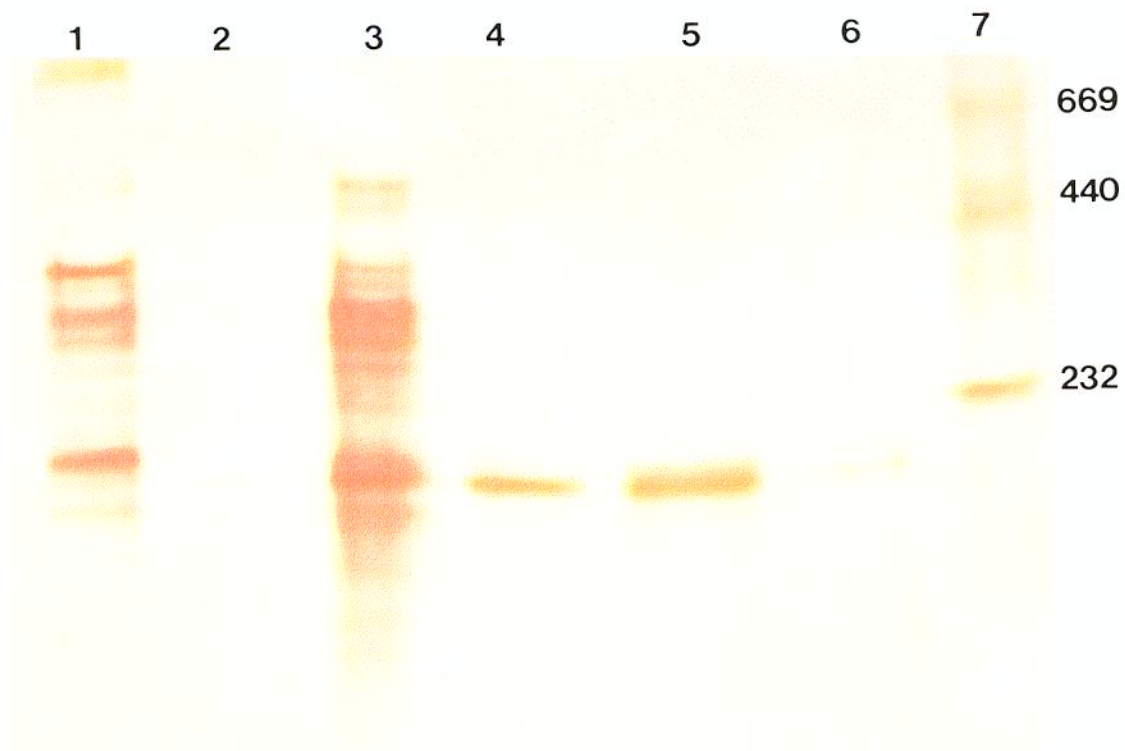
\*\*Amostra concentrada com AMICON (PM10).

A metodologia seleccionada para o processo de purificação da Ent-ctx permitiu um incremento de 622.222 na atividade citotóxica específica expressa em  $CD_{50}/mg$  e um grau de pureza de 5.185. Também observou-se durante o processo, um decréscimo acentuado da concentração protéica chegando até valores menores que 1mg/ml para a Ent-ctx nas últimas etapas da purificação.

#### **4.1.3 Análise eletroforética: PAGE e SDS-PAGE**

Observou-se uma sucessiva diminuição do número de bandas protéicas após cada etapa da purificação, como apresentado nas Figura 6 (PAGE) e na Figura 7 (SDS-PAGE).

A fração protéica eluída da resina de troca aniônica (Mono Q HR 5/5) com atividade citotóxica quando submetida a PAGE (Figura 6, linha 6) mostrou a presença de uma única banda homogênea. No SDS-PAGE sob condições não redutoras (sem  $\beta$ -mercaptoetanol), observamos na linha 6 a presença de uma banda protéica com peso molecular estimado de 68 kDa, correspondente à Ent-ctx proveniente da cromatografia em Mono Q HR 5/5. As linhas 1 e 9 da Fig.7 mostram os padrões de alto e baixo peso molecular, respectivamente.



**FIGURA 6:** Perfil eletroforético em PAGE das amostras obtidas durante o processo de purificação da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*, corado pela prata.

Linha 1: Amostra do sobrenadante de cultura.

Linha 2: Amostra do de Precipitado com 60 % de saturação de Sulfato de Amônio

Linha 3: Amostra da cromatografia de interações hidrofóbicas Phenyl Sepharose CL-4B

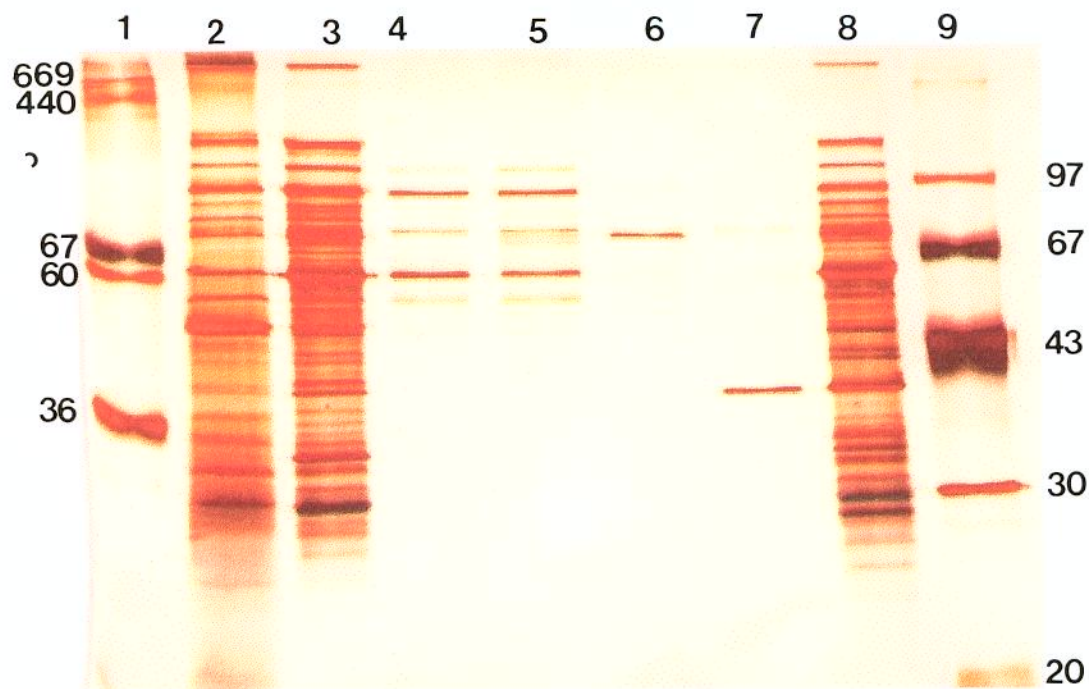
Linha 4: Amostra da cromatografia de Troca Aniônica em Q Sepharose Fast Flow

Linha 5: Amostra da cromatografia de Gel Filtração em Superdex 200/HPLC

Linha 6: Amostra da cromatografia de Troca Aniônica em Mono Q HR 5/5 (HPLC)

Linha 7: Padrão de Alto Peso Molecular (669,000-Tiroglobulina;440,000Ferritina;232,000-Catalase;140,000-Lactate deshidrogenase; 67,000 BSA)





**FIGURA 7:** Perfil eletroforético em SDS-PAGE das amostras obtidas durante o processo de purificação da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*, corado pela prata.

Linha 1: Padrão de Alto Peso Molecular (669.000-Tiroglobulina; 440.000 Ferritina; 67.000 BSA; 60.000-Catalase; 36.000-Lactate deshidrogenase; 18.500-Ferritina)

Linha 2: Amostra do de Precipitado com 60 % de saturação de Sulfato de Amônio

Linha 3: Amostra da cromatografia de interações hidrofobicas Phenyl Sepharose CL-4B

Linha 4: Amostra da cromatografia de Troca Aniônica em Q Sepharose Fast Flow

Linha 5: Amostra da cromatografia de Gel Filtração em Superdex 200/HPLC

Linha 6: Amostra da cromatografia de Troca Aniônica em Mono Q HR 5/5 (HPLC) Pico 2  $\alpha$  atividade citotóxica.

Linha 7: Amostra da cromatografia de Troca Aniônica em Mono Q HR 5/5 (HPLC) Pico 3.

Linha 8: Amostra do sobrenadante de cultura.

Linha 9: Padrão de Baixo Peso Molecular (94.000-Fosfolirase b; 67.000- Albumina; 43.000-Ovoalbumina; 30.000 Anidrase Carbonica; 20.100- Tripsina; 14.400-  $\alpha$  albumina)

## **4.2 Caracterização biológica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

### **4.2.1 Citotoxicidade em cultura de células.**

A citotoxicidade da Ent-ctx foi examinada frente as células Vero, CHO e 3T3. Os resultados mostraram alterações morfológicas características tais como arredondamento celular, condensação nuclear e descolamento do tapete celular nas linhagens celulares Vero e CHO. Nas 3T3 (células de fibroblastos de camundongos) o efeito citopático é diferente, observando-se um alongamento das células e uma intensa picnose depois das primeiras 4 horas. Este mesmo efeito, com menor intensidade foi observado nas linhagens de fibroblastos de embrião de galinha e fibroblastos de pulmão de hamsters (dados não mostrados).

A linhagem celular proveniente do rim de macaco verde africano (Vero) demonstrou uma elevada sensibilidade ao teste de atividade citotóxica (Tabela 4) comparado com as outras linhagens celulares testadas, o que determinou sua seleção como marcador da atividade biológica.

**TABELA 4:** Resultados da atividade citotóxica obtidos ao comparar as diferentes linhagens celulares com as amostras da enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila*.

Linhagens celulares	<u>Atividade citotóxica</u>	
	A	B
Vero	4096	64
CHO	1024	32
3T3	1024	16

<sup>1</sup>A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou efeito citotóxico nas culturas celulares.

A. Amostra de sobrenadante de cultura concentrado.

B. Amostra da Ent-ctx obtida na cromatografia de troca aniônica Mono Q HR 5/5(HPLC)

#### 4.2.2 Determinação da $CD_{50}$ da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.

O título da Ent-ctx purificada foi de 1:89 /0.1ml em  $2 \times 10^5$  cél/ml em 72 horas. A atividade citotóxica específica da Ent-ctx foi de 1,6 ng/ $CD_{50}$ .

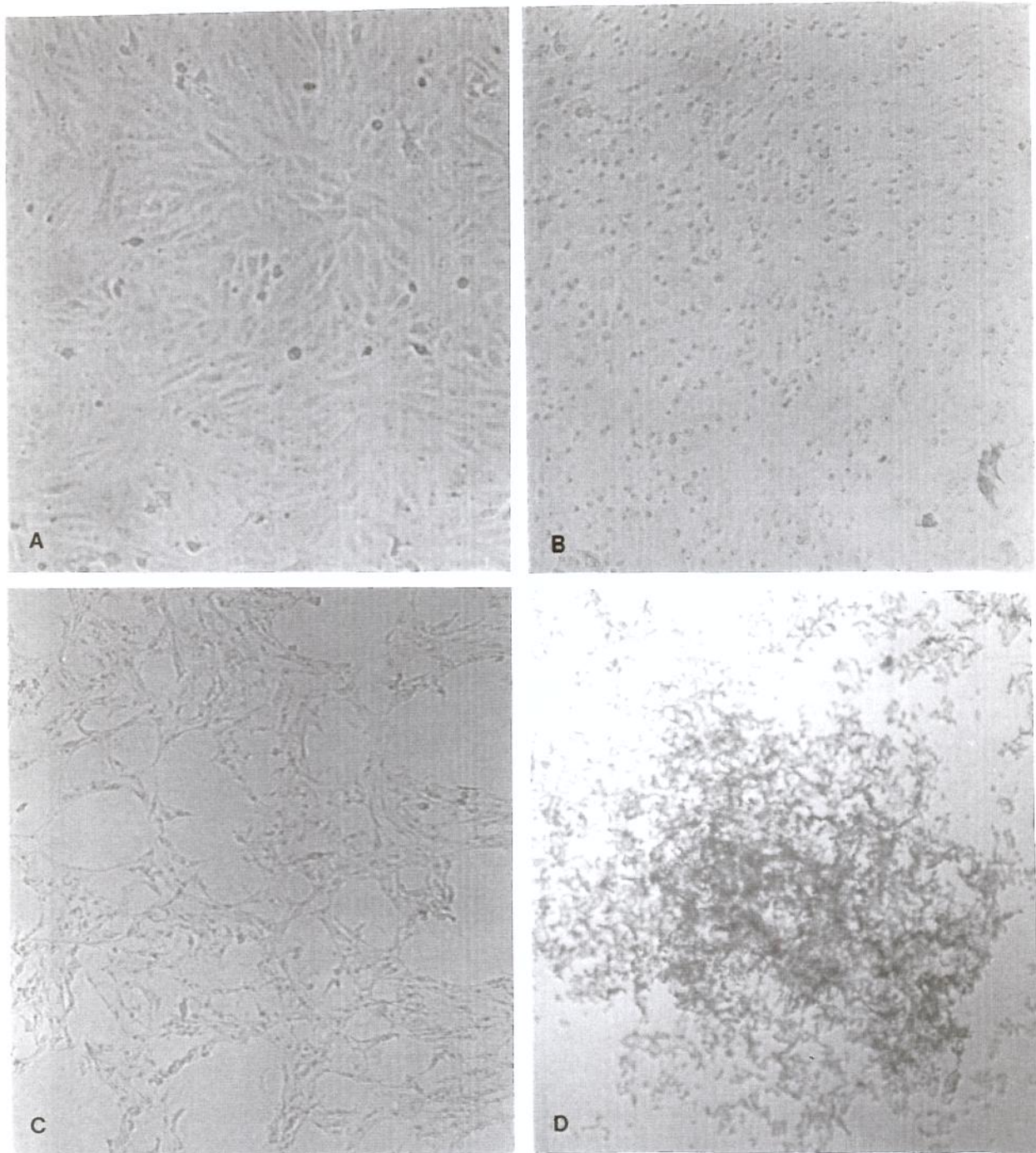


#### **4.2.3 Cinética de aparição do efeito citopático da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

A Ent-ctx causou alterações morfológicas em células Vero após os primeiros 30 minutos de leitura (Figura 8B). Observou-se que mais de 75% das células estavam arredondadas, algumas delas já picnóticas. Depois de 1 hora (Figura 8C) foi observada vacuolização citoplasmática e extrema condensação nuclear. No término do teste, após 2 horas, foi observada 100% de morte celular (Figura 8D).

#### **4.2.4 Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

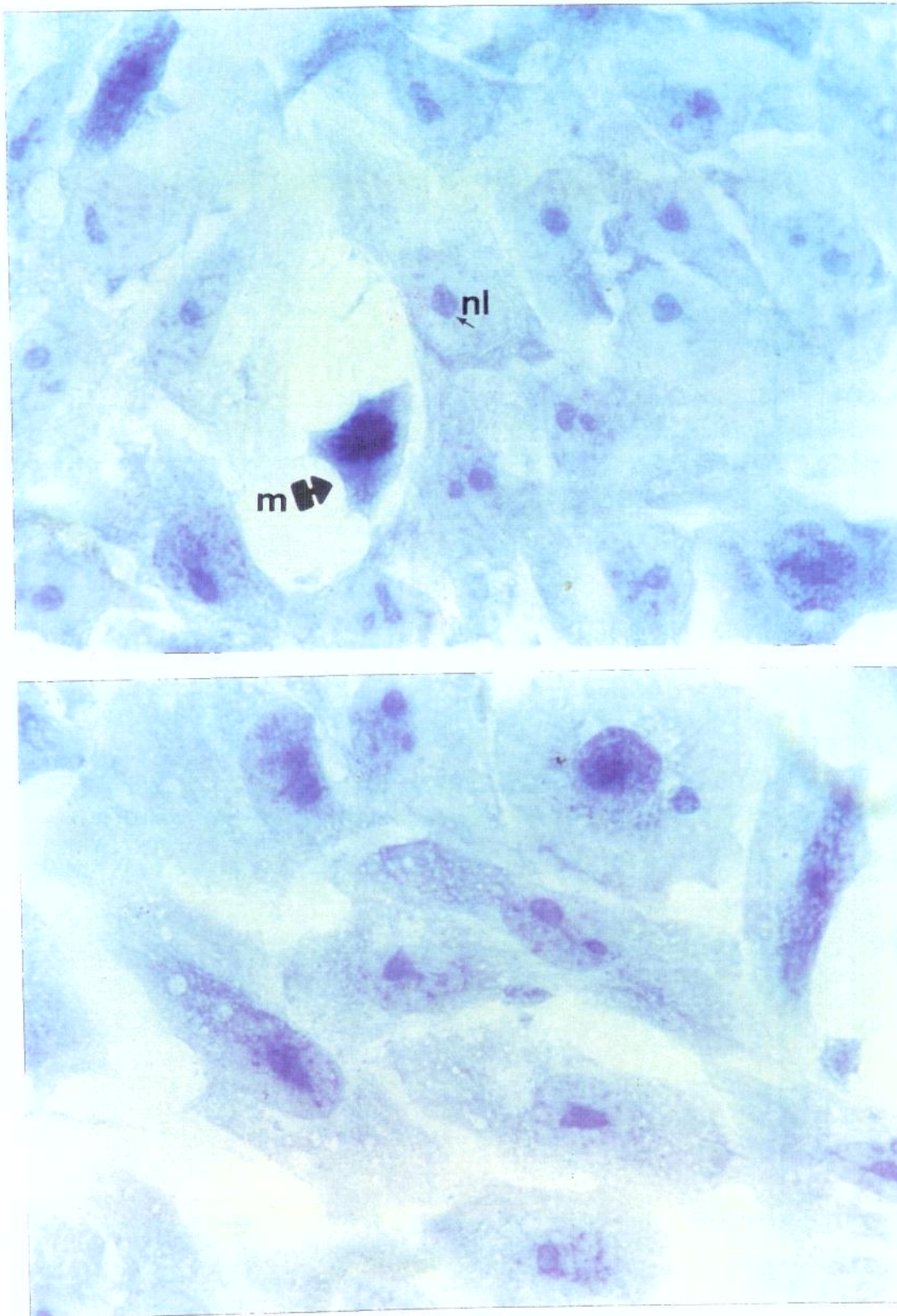
A Figura 10 mostra as fotomicrografias obtidas com as diferentes diluições do sobrenadante de cultura ou “toxina bruta” em células Vero. Em geral, as células apresentaram vacuolização e observou-se a eliminação de fragmentos citoplasmáticos semelhantes a corpos apoptóticos (seta). Concentrações crescentes (Fig. 10A e 10B) levaram a progressiva condensação cromatínica, passando por um estágio com inúmeros grumos até uma situação de extrema condensação, aparentemente picnótica (p).



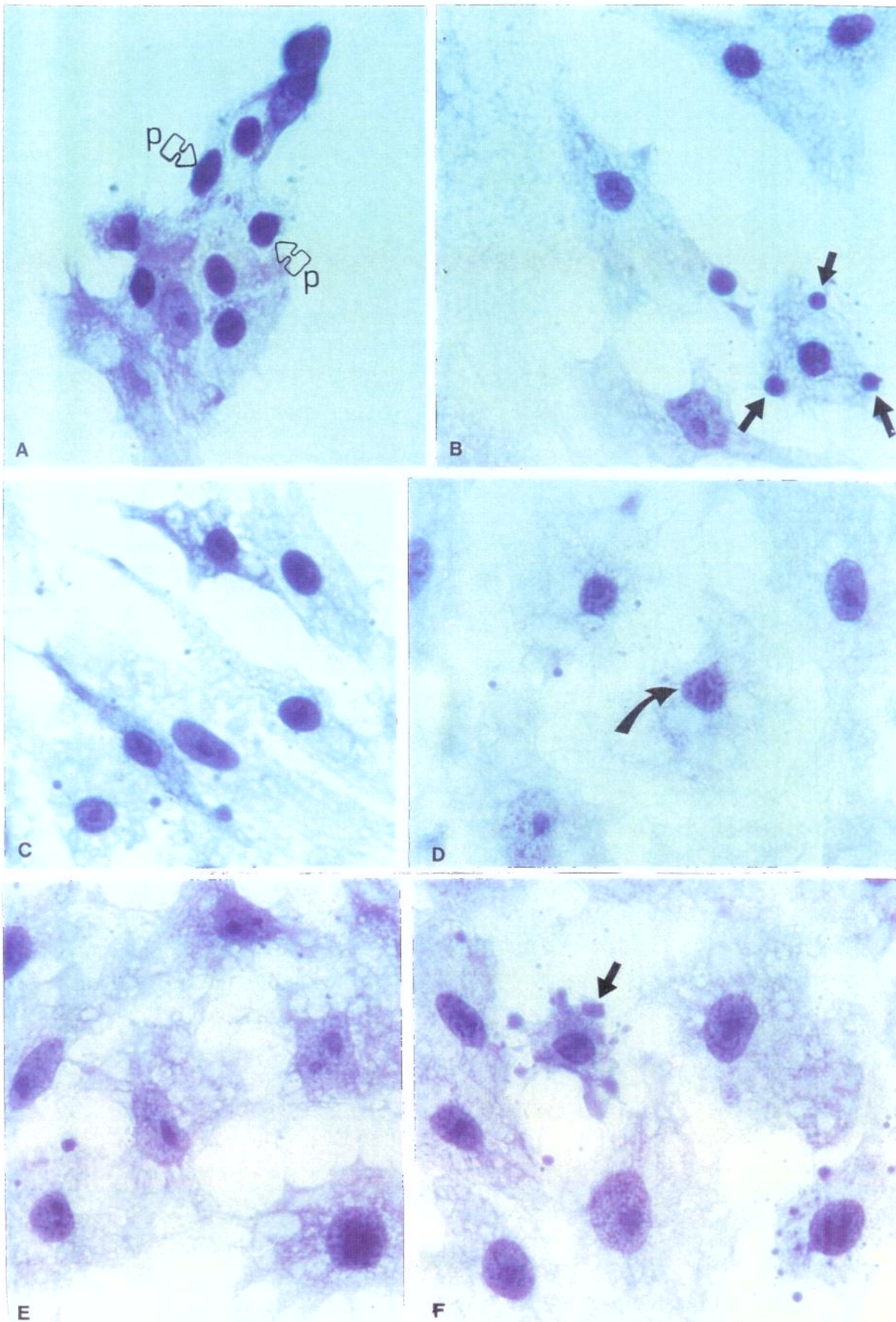
**FIGURA 8:** Fotomicrografia do efeito biológico produzido pela enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* no tempo. Diluição 1/800. Aumento 40x.

- A. Controle Celular (células Vero).
- B. 30 minutos após o efeito citotóxico da Ent-ctx de *A. hydrophila*.
- C. 60 minutos após o efeito citotóxico da Ent-ctx de *A. hydrophila*.
- D. 120 minutos após o efeito citotóxico da Ent-ctx de *A. hydrophila*.





**FIGURA 9:** Fotomicrografia do controle celular das células Vero. Coloração com Azul de toluidina. Aumento 1250x. (m)-mitose (nl)- nucleolo.



**FIGURA 10:** Fotomicrografia do efeito biológico produzido pela toxina bruta de *Aeromonas hydrophila*. Coloração com Azul de toluidina. Aumento 1250x.

(A e B)-diluição 1/100 (C e D)-diluição 1/200 (E e F)-diluição 1/400 (p)-picnose (seta curva) extrema condensação nuclear (seta simples) restos citoplasmáticos semelhantes a "corpos apoptóticos".

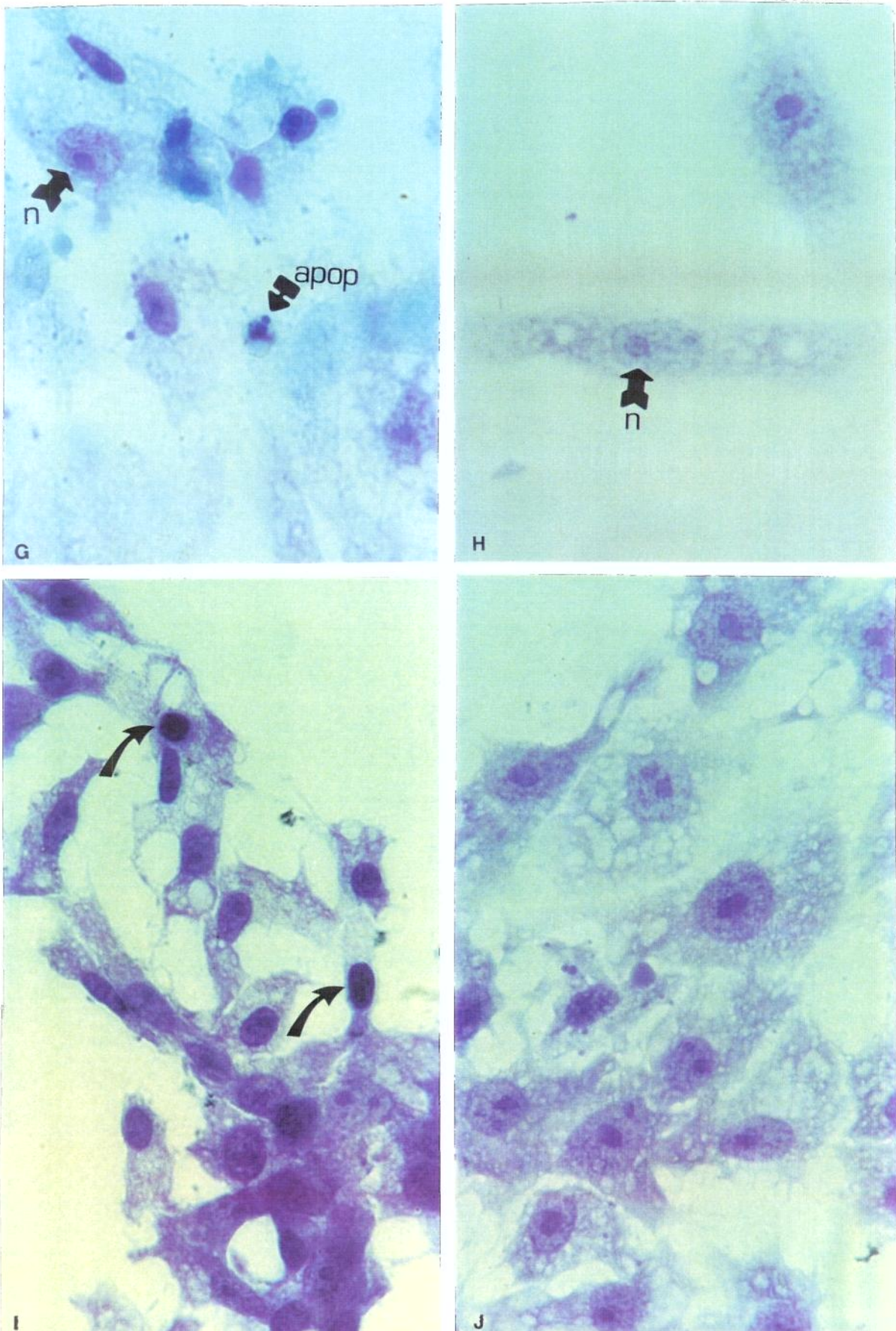


No caso da amostra de sobrenadante de cultura precipitado com 60 % de saturação de sulfato de amônio (Figura 11) observou-se que as amostras que apresentam concentrações protéicas mas altas, diluição 1/100 (Fig. 11G e 11H) são extremamente eficazes em descolar as células das lamínulas. Algumas células remanescentes apresentam aspectos de condensação e fragmentação nuclear. Outras estão aparentemente normais (n), após curto período (30 min) de exposição.

Nas amostras do precipitado testadas com menores concentrações protéicas (Fig. 11I e 11J), são observadas vacuolização citoplasmática e extrema condensação nuclear (setas curvas).

O estudo do efeito da amostra eluída da cromatografia de troca aniônica em Q Sepharose Fast Flow sobre as células Vero (Figura 12) demonstrou que na diluição 1:50 (Fig. 12P e 12Q), predomina o inchamento do núcleo, enquanto a coloração verde obtida após a coloração com Azul de Toluidina revela o bloqueio dos grupos fosfatos. O citoplasma mantém-se semelhante as células controle (Figura 9).

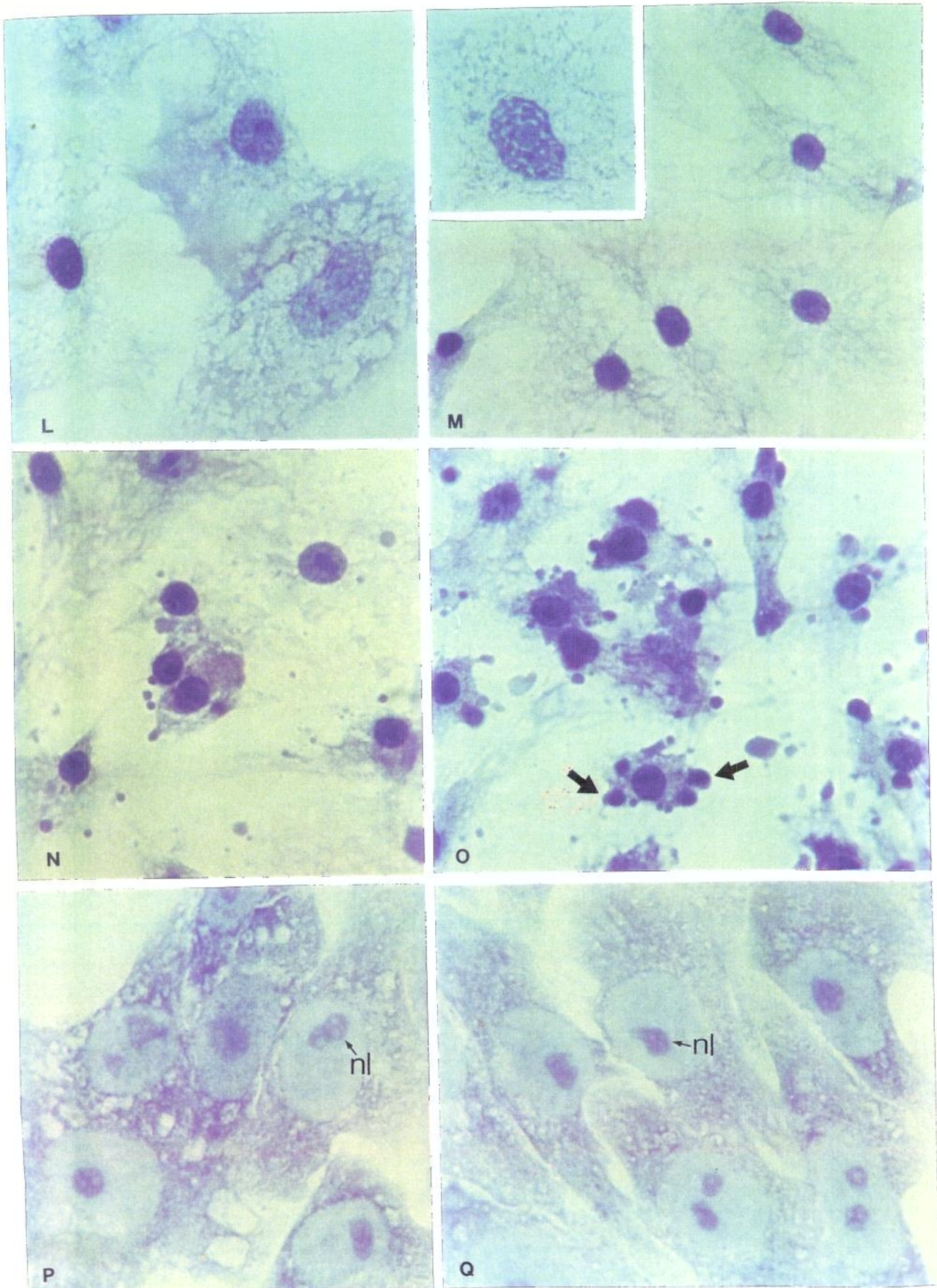
Na diluição 1:18 (Fig. 12N e 12O), a compactação nuclear é crescente. Ressalta-se a intensa eliminação de fragmentos citoplasmáticos na forma de “bolhas”, semelhantes a corpos apoptóticos. A amostra mais concentrada (1:6)



**FIGURA 11:** Fotomicrografia do efeito biológico produzido pela Ent-cx de *Aeromonas hydrophila* precipitada a 60% de saturação com sulfato de amônio. Coloração com Azul de toluidina. Aumento 1250x.

(G)-diluição 1/100 (H)-diluição 1/200 (I)-diluição 1/400 (J)-diluição 1/800 (seta curva) extrema condensação nuclear (n) células normais (apop) apoptose.





**FIGURA 12:** Fotomicrografia do efeito biológico produzido pela Ent-ctx da *A. hydrophila* proveniente da cromatografia de troca aniônica Q Sepharose Fast Flow. Coloração com Azul de toluidina. Aumento 1250x.

(L e M)-diluição 1/6 (N e O)-diluição 1/18 (P e Q)-diluição 1/50 (nl)-nucleolo (seta simples) restos citoplasmáticos semelhantes a "corpos apoptóticos".

(Fig. 12L e 12M), revela um efeito de picnose nuclear intensa, associada a um efeito de rarefação no citoplasma.

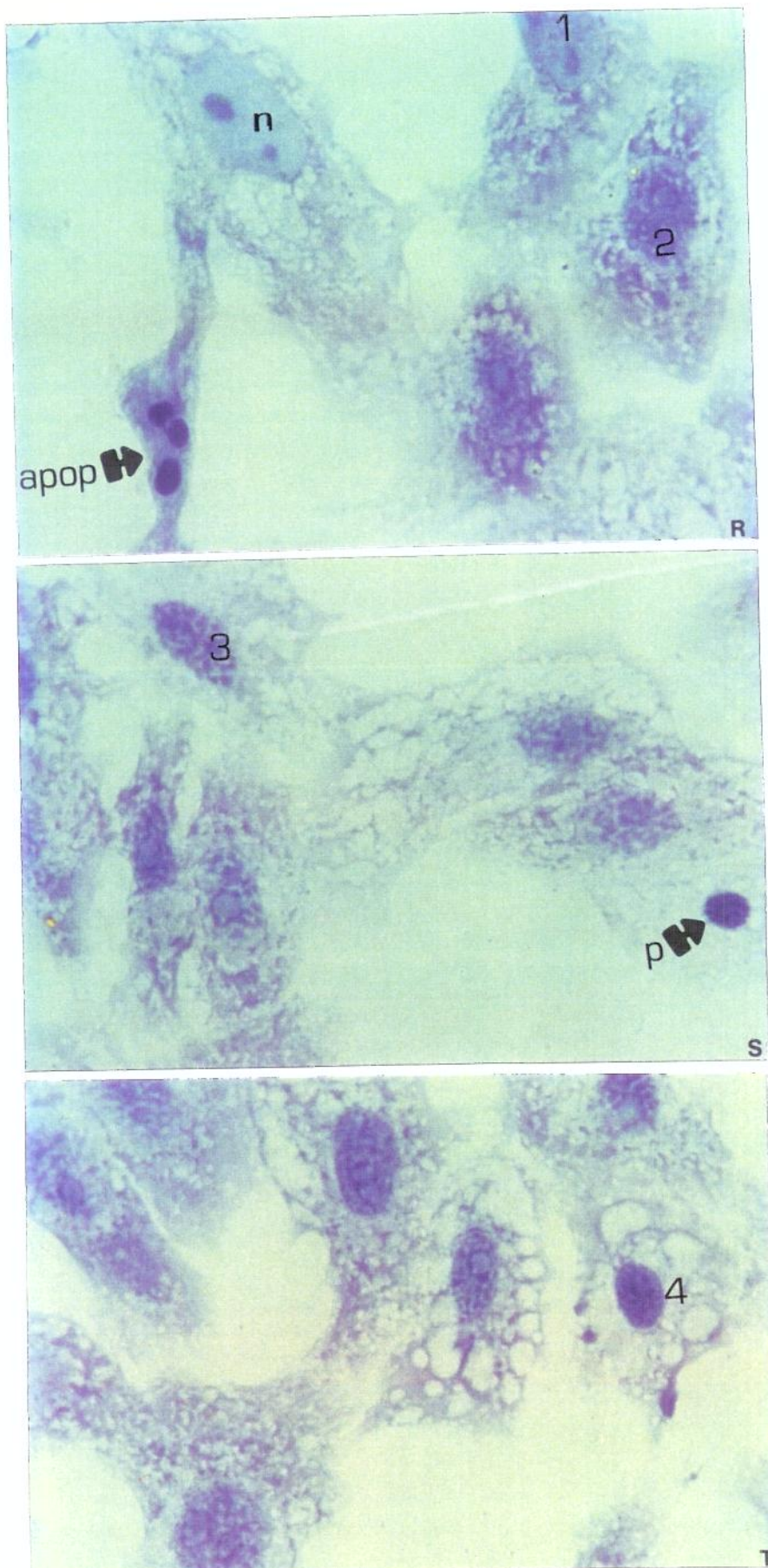
A Figura 13 (R, S e T), mostra diferentes estágios de condensação nuclear (1-4) até chegar ao estado de intensa picnose (p) obtidos pelo tratamento das células com a amostra proveniente da Superdex 200/HPLC. Assim, ficam evidentes a fragmentação nuclear semelhante à apoptose (apop), bem como os efeitos de rarefação e vacuolização provocados sobre o citoplasma celular.

#### **4.2.5 Efeito da temperatura na estabilidade da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.**

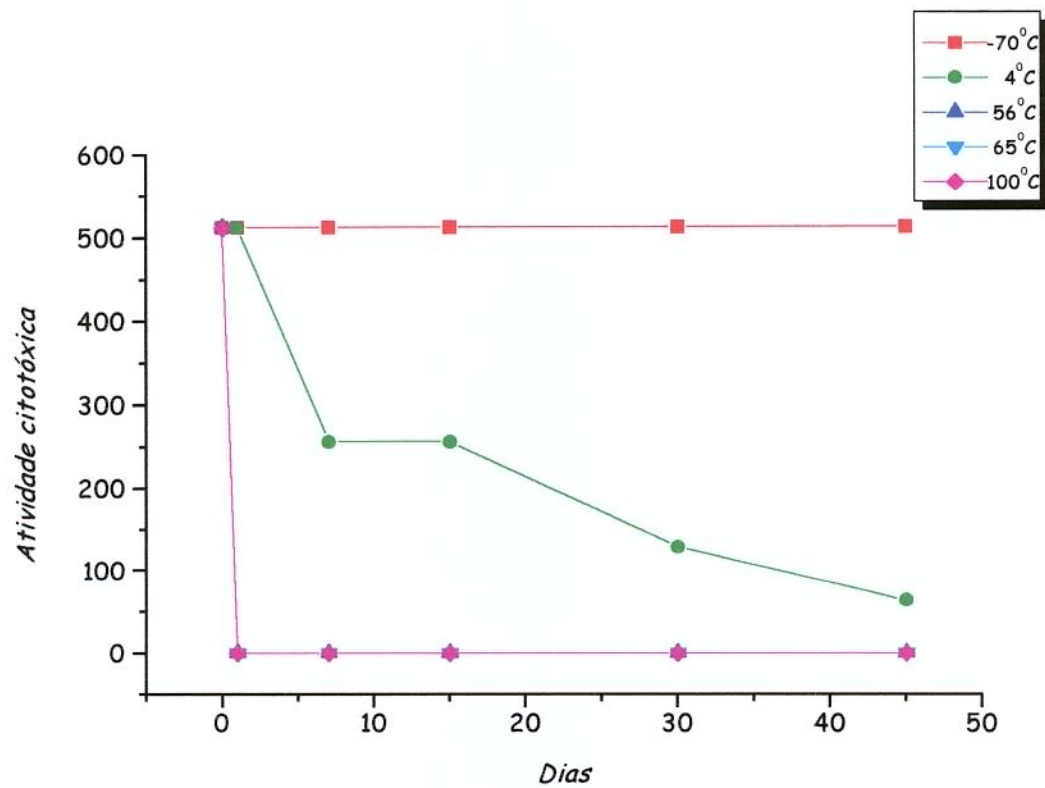
A Figura 14 mostra os resultados obtidos nos testes de estabilidade realizados com amostras de sobrenadante de cultura mantidas a -70, 4, 56, 65 e 100°C.

De maneira geral o efeito citotóxico diminui gradativamente, quando testadas as amostras de Ent-ctx são testadas a 4°C. Não houve perda da atividade citotóxica quando a amostra foi conservada a -70°C durante o tempo do ensaio.





**FIGURA 13:** Fotomicrografia do efeito biológico produzido pela Ent-ctx da *A. hydrophila* proveniente da cromatografia de exclusão molecular Superdex 200/HPLC. Coloração com Azul de toluidina. Aumento 1250x. (R, S e T)-diluição 1/40 (p)-picnose (apop) apoptose (1-4) Estágios de condensação nuclear.



**FIGURA 14:** Estudo de estabilidade da atividade citotóxica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* em amostras mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $56^{\circ}\text{C}$ ,  $65^{\circ}\text{C}$  e  $100^{\circ}\text{C}$ .

A atividade citotóxica é expressa como a recíproca da maior diluição que provocou o efeito citotóxico em células Vero.

#### 4.2.6 Atividade enterotóxica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.

A Figura 15 mostra o resultado obtido em alça ligada de intestino de coelho ao testar amostras do sobrenadante de cultura e da toxina semipurificada de *A. hydrophila*

Os coeficientes RIL obtidos para cada amostra testada são mostrados na Tabela 5, assim como a descrição da aparência macroscópica observada no experimento.

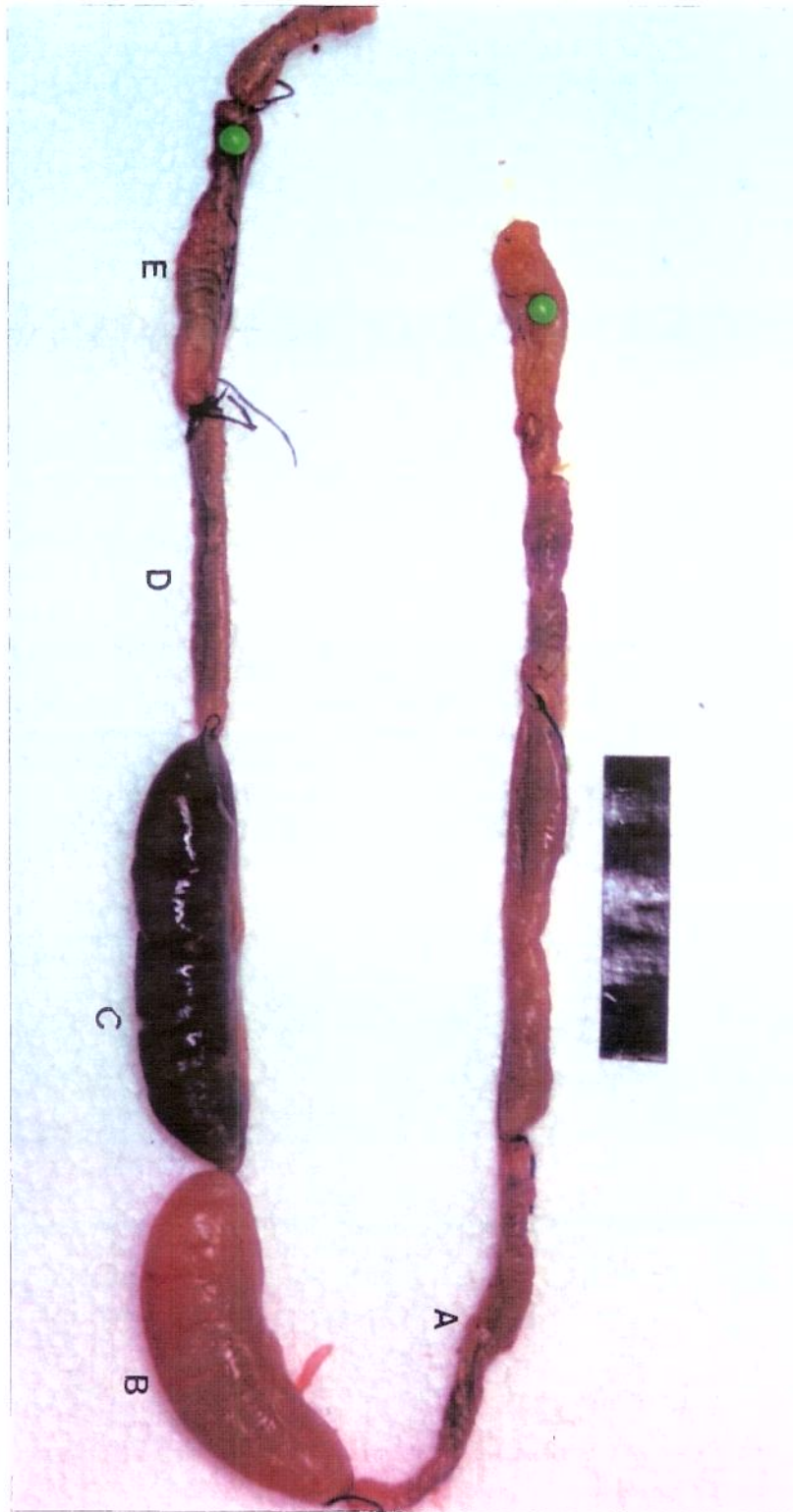
**TABELA 5:** Resultados dos coeficientes RIL obtidos no teste de alça ligada de coelho para a Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.

Amostras	RIL*	Aspecto macroscópico
Meio de Cultura TSB-EY	-	Normal
Sobrenadante de cultura Amostra de <i>A. hydrophila</i> AH191	0,98	Hemorrágica (menos intensa)
Amostra semipurificada** (Cromatografia Int. Hidrofobicas Phenyl Sepharose CL-4B)	1,13 <sup>a</sup>	Hemorrágica (intensa)
Sobrenadante de cultura Amostra de <i>A. hydrophila</i> AH191 aquecido a 56 <sup>o</sup> C	0,1	Normal
Sobrenadante de cultura Amostra de <i>A. hydrophila</i> AH69	0,12	Normal

\*Coeficiente RIL (volume do conteúdo da alça/comprimento da alça em cm).

\*\*Amostra concentrada em AMICON PM 10 (10 kDa) e dialisada vs tampão Tris-HCl 0,01M pH 7,6.





**FIGURA 15:** Fotomicrografia do efeito biológico produzido pela Ent-citx de *A. hydrophila* no teste de alça ligada de intestino de coelho.

- A. Meio de cultura TSB-EY.
- B. Sobrenadante de cultura de *A. hydrophila* AH191.
- C. Amostra semipurificada de *A. hydrophila* AH191 (proveniente da cromatografia de interações hidrofóbicas Phenyl Sepharose CL-4B).
- D. Sobrenadante de cultura de *A. hydrophila* AH191 aquecido a 56 °C durante 10 minutos.
- E. Sobrenadante de cultura de *A. hydrophila* AH69.

#### 4.2.7 Atividade hemolítica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.

Na Tabela 6 mostram-se os resultados da atividade hemolítica obtidas durante o processo de purificação.

**TABELA 6:** Resultados da atividade hemolítica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* obtida durante o processo de purificação.

Passos da Purificação	Atividade Hemolítica
Toxina Bruta	8
Precipitado 60% S.A*	64
Phenyl Sepharose*	32
Q-Sepharose*	32
Superdex-200/HPLC	ND
Mono Q/HPLC	ND

\* Material concentrado no AMICON com membrana PM 10 (10 kDa).

ND Não determinada.

## *5. Discussão*

Vários estudos têm demonstrado diferentes estratégias para a purificação da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* (Asao *et al.*, 1986; Ljungh *et al.*, 1981; Rose *et al.*, 1989a).

Visando garantir uma maior produção da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* e otimizar as condições de cultivo, usaram-se os meios Caldo Tripticase Soja suplementado com extrato de levedo 0,6% (Neves & Nunes, 1994) e Casamino Ácidos suplementado com 0,6% de extrato de levedo e 0,6% de NaCl (Ferguson *et al.*, 1995; Rose *et al.*, 1989a).

Neste estudo o meio TSB-EY, mostrou ser o mais adequado para a produção de Ent-ctx apresentando o maior título de atividade citotóxica (1:256), corroborando os dados ressaltados por Serafim *et al.* (1994) tendo sido, portanto, o meio escolhido para a realização dos experimentos desenvolvidos em nossa pesquisa, a pesar dos diversos meios de cultura terem sido usados para a produção da Ent-ctx de *A. hydrophila* (Bloch & Montiel, 1989; Krovacek *et al.*, 1991; Ljungh *et al.*, 1981; Potomski *et al.*, 1987).

Diversos estudos têm empregado variações nas condições de cultivo para a produção da Ent-ctx, variando, temperatura, pH do meio, agitação, aeração, entre outros. Em nossa pesquisa diferentes condições de cultivo com variações de valores de pH e temperatura foram testadas e os melhores resultados foram obtidos a 37 °C e pH 7,5. Bloch & Montiel, (1989) e Rose *et al.*, (1989a)

descreveram um aumento significativo na produção da  $\beta$  hemolisina e da enterotoxina citolítica (Act) respectivamente usando as mesmas condições.

Baseados nos resultados obtidos, concluímos que: o tipo de meio, as condições de aeração, a temperatura de incubação, e o pH do meio constituem fatores importantes para a produção das enterotoxinas. Em nossos experimentos, as melhores condições encontradas foram: cultura em meio TSB-EY, pH 7.5, 37°C e agitação a 150 rpm (Fig. 1 e Tab. 1).

Vários estudos realizados por Asao *et al.* (1986); Ferguson *et al.* (1997); e Rose *et al.* (1989a) têm demonstrado diferentes estratégias para a purificação da enterotoxina citotóxica da *Aeromonas hydrophila*. Os métodos sugeridos na tentativa de otimizar a obtenção e purificação da Ent-ctx baseiam-se fundamentalmente na tradicional precipitação com sulfato de amônio e as técnicas cromatográficas (Buckley *et al.*, 1981; Ljungh *et al.*, 1981; Potomski *et al.*, 1987; Rose *et al.*, 1989b).

O melhor resultado em rendimento da Ent-ctx ao ensaiar as diferentes porcentagens de saturação de sulfato de amônio, foi obtido com a precipitação do sobrenadante da cultura a 60% (Tab. 2). Nossos resultados foram similares aos obtidos por Rose *et al.*; 1989a, e Saha *et al.*; 1996; considerando também a precipitação com sulfato de amônio como um passo conveniente dentro do processo de purificação, permitindo uma rápida concentração da Ent-ctx.



Muitos têm sido os métodos cromatográficos descritos para a purificação das enterotoxinas do gênero *Aeromonas spp* (Buckley *et al.*, 1981; Gosling *et al.*, 1993; Stelma *et al.*, 1986; Wretling *et al.*, 1971). Os esquemas de purificação desenvolvidos baseiam-se principalmente no uso de resinas cromatográficas como troca iônica, exclusão molecular e interações hidrofóbicas. Outros autores descreveram o uso da coluna de interações hidrofóbicas na purificação da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* (Fegurson *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1989; Saha *et al.*, 1996). Assim a utilização da coluna Phenyl Sepharose CL-4B no início do processo permitiu dar continuidade ao processo de purificação sem precisar de diálise exaustiva para a eliminação das sais. Para garantir o gradiente linear inverso, onde precisa-se de elevadas concentrações de sais foram testados variantes de molaridade, valores de pH e também os tipos de tampões usados (dados não mostrados). Em nosso caso os melhores resultados foram obtidos quando realizamos um gradiente com sulfato de amônio de 1 a 0M utilizando tampão Tris-HCl 0,01M; pH 7,6 (Fig. 2). A atividade citotóxica (1:4096) foi encontrada no pico cromatográfico eluído com tampão Tris -HCl 0,01M, pH 7,6. É importante salientar que outros processos cromatográficos também foram utilizados a saber: cromatografia convencional de troca aniônica (Q Sepharose Fast Flow) e a utilização do sistema HPLC para as cromatografias de exclusão molecular (Superdex 200) e troca aniônica (Mono Q HR 5/5).

Nas Figs. 2 a 5 são mostrados os perfis de eluição obtidos nas cromatografias ensaiadas, sinalizando os picos cromatográficos que apresentavam a maior atividade citotóxica. As frações cromatográficas de interesse foram concentradas por ultrafiltração (Amicon PM-10) e mantidas a 4 °C, para evitar a perda de atividade citotóxica. A manutenção da baixa temperatura constituiu um fator determinante em nosso processo de purificação.

Buckley *et al.*, (1981) e Potomski *et al.*, (1987a) descreveram outros esquemas de purificação para a Ent-ctx com a utilização de resinas de fase reversa e afinidade, usando anticorpos monoclonais. No entanto, Asao *et al.*, 1986, Ferguson *et al.*, 1997 e Rose *et al.*, 1989a, obtiveram resultados satisfatórios com o uso de metodologias mais simples. O processo de purificação usado em nosso estudo baseou-se na estratégia seguida por estes pesquisadores, com algumas modificações.

Outros ensaios cromatográficos, usando cromatografias convencionais de exclusão molecular (Superdex 200), troca aniônica (DEAE- Sepharose Fast-Flow) e troca catiônica (Mono S HR 5/5) no sistema HPLC, não apresentaram resultados satisfatórios, havendo uma acentuada diminuição da atividade citotóxica nas frações coletadas (dados não apresentados).

Apesar de termos conseguidos incrementar de modo geral a atividade

específica durante o processo de purificação, e mesmo com a utilização de ensaios biológicos sensíveis (teste de atividade citotóxica em cultura de células), as quantidades de Ent-ctx (0,0135 mg) (Tab.3) obtidas até a última etapa de purificação do processo descrito em nosso trabalho são relativamente baixas, constituindo uma das principais dificuldades na sua purificação e caracterização. Resultados similares foram obtidos por Gosling *et al.* (1993) e Rose *et al.* (1989a), sendo o rendimento final do processo de purificação menor que 1%. Estudos recentes têm demonstrado a obtenção de amostras super produtoras a partir do clonagem e expressão em *E.coli* do gene que codifica para a aerolisina e a enterotoxina citolítica (Chakraborty *et al.*, 1986; Ferguson *et al.*, 1997), resultando no incremento do rendimento em 39%.

No processo de purificação, conseguiu-se incrementar o grau de pureza em 5.185 vezes e, a atividade específica da Ent-ctx (622.222), expressa como atividade citotóxica específica determinada em células Vero (Tab. 3). Outros autores descreveram estes mesmos parâmetros baseados nos testes de atividade hemolítica e de reatividade cruzada com a toxina colérica, o que impossibilitou a comparação de nossos resultados com os já relatados (Asao *et al.*, 1986, Bloch & Montiel, 1989; Gosling *et al.*, 1993; Ferguson *et al.*, 1997 e Rose *et al.*, 1989a).

Todas as etapas de purificação da Ent-ctx foram analisadas por eletroforese (PAGE e SDS-PAGE), nos quais observamos uma sucessiva

diminuição do número de bandas protéicas.

A enterotoxina citotóxica, proveniente da última etapa cromatográfica (Mono Q HR 5/5) apresentou uma única banda quando submetida ao PAGE (Figs. 6)., podendo ser considerada eletroforeticamente pura. Entretanto, quando foram ensaiadas as amostras no SDS-PAGE (Fig.7) em condições não redutoras os resultados evidenciaram a presença de mais de uma banda protéica com o predomínio de uma banda de aparentemente 68 kDa.

O peso molecular estimado da família de enterotoxinas citotóxicas de *Aeromonas* encontra-se entre 50-54 kDa. Uma possível explicação poderia ser a existência da Ent-ctx em sua forma de pré-toxina (68 kDa), secretada como uma protoxina inativa (54 kDa) que posteriormente pela ação de proteases que clivam seu peptídeo sinal é convertida a uma forma ativa (52 kDa). Portanto Ferguson *et al.*, 1997 recomendam em seu trabalho o tratamento das amostras com tripsina após cada processo cromatográfico.

A elevada sensibilidade e confiabilidade mostrada pelo teste de atividade citotóxica, desenvolvido com cultura de células Vero, relativo aos testes de atividade enterotóxica e hemolítica, determinou o uso deste marcador durante o processo de purificação.

Os ensaios da atividade citotóxica em células Vero, comparado com as outras linhagens celulares (CHO e 3T3) (Tab. 4), demonstraram uma elevada

resposta ao efeito citotóxico quando testada a Ent-ctx em suas formas “bruta” e semipurificada, o que poderia ser explicado pela afinidade da Ent-ctx com o receptor destas células, permitindo uma ligação toxina-receptor mas eficiente e, portanto um efeito citopático notável no tempo de 30 minutos, precisando no mínimo de pequenas quantidades (1,6 ng) para observar o 50 % do efeito citotóxico produzido pela enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*.

Outros autores também confirmaram que efeito citotóxico produzido pela enterotoxina citotóxica nas culturas celulares torna-se evidente rapidamente (Saha *et al.*,1996; Santos *et al.*,1988). Em nossos estudos, dependendo da concentração da Ent-ctx foi possível detectar o efeito citopático nas primeiras 4 horas, iniciando-se aos 30 minutos e no máximo a leitura deve ser feita às 72 horas (Fig. 8).

As análises dos efeitos da enterotoxina, utilizando amostras das diferentes etapas do processo de purificação em células Vero mostraram detalhes das mudanças em nível nuclear e citoplasmático (Figs. 9 a 13).

A Ent-ctx induz nas culturas celulares uma série de alterações morfológicas que se assemelham as descritas para a família de verotoxinas de *E. coli* (Sears & Kaper, 1996), produzindo inicialmente um arredondamento celular, condensação celular e descolamento do tapete celular em poucas horas dependente da concentração da amostra protéica. Também foi

demonstrado diferentes estágios de condensação intensa do núcleo até chegar a picnose, sugerindo a ocorrência de processos apoptóticos. Embora os aspectos morfológicos assemelhem-se ao processo apoptótico (Clarke, 1990), a definição de que a toxina induz apoptose nestas células depende de testes adicionais como por exemplo a verificação da típica fragmentação do DNA através de testes específicos.

A temperatura constituiu um importante fator durante os ensaios biológicos. Ao testar a estabilidade da Ent-ctx observamos que as baixas temperaturas (-70 e 4°C) permitiram a conservação da atividade citotóxica. No entanto, as temperaturas de 37, 56 e 100°C demonstraram uma perda instantânea da atividade biológica da Ent-ctx. Vários autores descreveram que o tratamento moderado da Ent-ctx a 56°C durante 5 minutos inativavam as atividades citotóxicas e hemolíticas, e não a atividade enterotóxica, podendo ser expressa também a atividade citotônica, sempre que esta estivesse presente nas amostras de *Aeromonas* (Donta, 1974; ;Potmski *et al.*, 1987b). Nossos resultados demonstraram a presença de uma enterotoxina com atividade citotóxica dependente da temperatura, sendo observado também perda da atividade enterotóxica e nenhum sinal de atividade citotônica.

Em geral as enterotoxinas agem no intestino, exibindo um aumento da sua atividade biológica. No caso das enterotoxinas do gênero *Aeromonas* têm-se descrito que estas são biologicamente diferente das enterotoxinas ST e LT

de *E. coli*, agindo fundamentalmente no jejuno e desencadeando uma série de reações bioquímicas que dão lugar as diarreias, no obstante, estejam pouco esclarecidos os mecanismos pelos quais a Ent-ctx produz enteropatogenicidade.

A análise macroscópica da toxicidade testadas com as amostras da toxina semipurificada (amostra concentrada com atividade citotóxica) em alça ligada do intestino de coelho revelou um acúmulo importante de fluido com intensa hemorragia e menos intensa com o sobrenadante de cultura da amostra AH 191 (Tab. 5). Não houve acúmulo de fluido na alça quando foi testado o sobrenadante aquecido a 56<sup>o</sup>C durante 10 minutos. Resultados similares foram obtidos por Ferguson *et al.*, 1995 e Ljungh *et al.*, 1987, sugerindo a termolabilidade da enterotoxina (Fig. 15).

Alguns autores consideram suficiente o teste de camundongos recém-nascidos para detectar enterotoxigenicidade de *Aeromonas spp.* entre eles Burke *et al.*, 1981; Freitas *et al.*, 1993. Deve-se apontar que em nosso trabalho foram obtidos melhores resultados e reproduzibilidade usando o teste com alça ligada de coelho em comparação com os experimentos realizados com camundongos recém-nascidos (dados não mostrados), embora os primeiros sejam mais trabalhosos e onerosos.

Durante o processo de purificação observou-se uma notável diminuição

da atividade hemolítica (Tab. 6). Asao *et al.*, 1986 e Ljungh *et al.*, 1981 descreveram a presença de mais de uma hemolisina no sobrenadante de cultura de *A. hydrophila*, e embora seja o teste menos sensível, a diminuição da atividade hemolítica pode ser devida a perda de outras hemolisinas também presentes no sobrenadante de cultura.

Neste estudo, alguns testes imunológicos, tais como ensaio de linfoproliferação e a capacidade de estímulo da Ent-ctx para a produção de TGF- $\beta$  (dados não apresentados), foram avaliados procurando aprofundar os possíveis mecanismos de ação da enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila*. Os resultados, embora preliminares, servirão de base para futuros estudos nesta área, permitindo um maior conhecimento sob o mecanismo molecular de patogenicidade desta enterotoxina e sua relação com o hospedeiro.



## *6. Conclusões*

1. As melhores condições para a produção da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* (Ent-ctx) foram: cultura em meio TSB-EY, pH 7.5, 37°C de temperatura e agitação a 150 rpm.

2. A maior atividade citotóxica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* ao ensaiar os diferentes porcentagens de sulfato de amônio, foi obtida com a precipitação do sobrenadante da cultura a 60% de saturação.

3. A estratégia de purificação utilizando as cromatografias de interações hidrofóbicas (Phenyl Sepharose CL-4B), troca aniônica (Q Sepharose Fast Flow e Mono Q HR 5/5), e exclusão molecular (Superdex 200 HR), permitiu um incremento de 5.185 vezes no grau de pureza da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila*.

4. A atividade citotóxica específica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* foi de 622.222 CD<sub>50</sub>/mg.

5. A Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* apresentou uma banda protéica predominante, de peso molecular estimado de 68 kDa, após ser submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS.

6. A Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* induziu alterações morfológicas nas culturas celulares Vero, CHO e 3T3, predominando os efeitos de vacuolização citoplasmática e condensação cromatínica.

7. As mudanças morfológicas em células Vero, sugerem que o efeito citopático induzido pela Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* poderia estar associado a possíveis processos apoptóticos.

8. A enteropatogenicidade da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* foi demonstrada com o teste de alça ligada do intestino de coelho.

9. A atividade hemolítica da Ent-ctx de *Aeromonas hydrophila* diminuiu consideravelmente durante o processo cromatográfico, supondo-se a perda de outras hemolisinas presentes no sobrenadante de cultura.

## *7. Bibliografia*

- Agger, W.A.; McCormick, J.D. & Gurwith, M.J. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila* associated diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, **21**: 909-913, 1985.
- Altwegg, M. & Geiss, H.K. *Aeromonas* as human pathogen. **Crit. Rev. Microbiol.**, **16**: 253-286, 1989.
- Asao, T.; Kosaki, S.; Kato, Y.; Otsu K. & Sakakuchi, G. Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. **J. Clin. Microbiol.**, **24**: 228-232, 1986.
- Austin, B.; Altwegg, M.; Gosling, P.J. & Joseph, S. The genus *Aeromonas*. **John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y.** 1996.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins. 9 th. ed. EUA. 1994.
- Bernheimer, A.W. & Avígar, L.S. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, **9**: 1016-1021, 1974.
- Bhakdi, S.; Mackman, N.; Nicaud, J.M. & Holland, I.B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target membranes by generating transmembrane pore. **Infect. Immun.**, **52**: 63-69, 1986.
- Black, R.E. Epidemiology of travelers diarrhea and relative importance of various pathogens. **Rev. Infect. Dis.**, **12**: 73-78, 1990.
- Blanco, J. & Blanco, M. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino, patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. In **Servicio Pub. Diputación Provincial, Lugo. España**, 1993.

- Bloch, S. & Montiel, H. Purification and characterization of *Aeromonas hydrophila* beta-hemolysin. **Toxicon**, **27**: 1279-1287, 1989.
- Blum, H.; Beier, H.; & Gross, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-99, 1987.
- Borenfreund, E. & Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. **J. Tiss. Cult. Meth.**, **9**: 7-9, 1984.
- Boulanger, Y.; Lallier, R. & Cousineau, G. Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. **Can. J. Microbiol.**, **23**: 1161-1164, 1977.
- Bradford, M.M. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, **5**: 248-254, 1976.
- Buckley, J.T.; Halasa, L.N. & MacIntyre, S. Purification and some properties of the hemolytic toxin aerolysin. **Can. J. Biochem.**, **59**: 430-435, 1981.
- Burke, V.; Robinson, J.; Berry, R.J. & Gracey, M. Detection of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* by a suckling-mouse test. **J. Med. Microbiol.**, **14**: 401-408, 1981.
- Burke, V.; Robinson, J.; Beaman, J.; Gracey, M.; Lesmana, M.; Rockhill, R.; Echeverria, P. & Janda, J.M. Correlation of enterotoxicity with biotype in *Aeromonas* spp. **J. Clin. Microbiol.**, **18**: 1196-1200, 1983.
- Burke, V.; Robinson, J. & Gracey, M. Enterotoxins of *Aeromonas* species. **Experimentia**, **43**: 368-369, 1987.
- Cahill, M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species. **J. Appl. Bact.**, **69**: 1-16, 1990.

- Carrello, A.; Silburn, K.A.; Budden, J.R. & Chang, B.J. Adhesion of clinical and environmental *Aeromonas* isolates to Hep-2 cells. **J. Med. Microbiol.**, **26**: 19-27, 1988.
- Caselitz, F.H. *Pseudomonas-Aeromonas* und ihre humanmedizinische bedeutung. **VEB Gustav Fisher Verlag. Jenc.** 1966.
- Chakraborty, T.; Montenegro, M.A.; Sanyal, S.C.; Helmuth, R.; Bulling, E. & Timmis, K.N. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. **Infect. Immun.**, **46**: 435-441, 1984.
- Chakraborty, T.; Hunle, H. & Goebel, W. Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, **167**: 368-374, 1986.
- Chakraborty, T.; Hunle, B.; Hof, H.; Bergbauer, H. & Goebel, W. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. **Curr.Microbiol.**, **14**: 71-77, 1987.
- Champsaur, H.; Andremont, A.; Mathieu, D.; Rottman, E. & Auzepy, P. Cholera-like illness due to *Aeromonas sobria*. **J. Infect. Dis.**, **145**: 248-254, 1982
- Chopra, A.K.; Houston, C.W.; Genaux, C.T.; Dixon, J.D. & Kurosky, A. Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. **J. Clin. Microbiol.**, **24**: 661-664, 1986.
- Chopra, A.K. & Houston, C.W. Purification and partial characterization of cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Can. J. Microbiol.**, **35**: 719-727, 1989.
- Clarke, P.G. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anat. Embryol.**, **181**: 195-213, 1990.

- Colwell, R.R.; MacDonell, M.T. & DeLey, J. Proposal to recognize the family Aeromonadaceae . **Int. J. Syst. Bacteriol.**, **36**: 473-477, 1986.
- Cumberbatch, N.; Gurwith, M.J.; Langston, C.; Sack, R.B. & Brunton, J.L. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. **Infect. Immun.**, **23**: 829-837, 1979.
- Daily, D.P.; Joseph, S.W.; Coolbaugh, J.C.; Walker, R.I.; Merrell, B.R.; Rolling, D.M.; Seidler, R.J.; Colwell, R.R. & Lissner, C.R. Association of *Aeromonas sobria* with human infection. **J. Clin. Microbiol.**, **13**: 769-777, 1981.
- Dobrescu, L. Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* from a cases of piglets diarrhoea. **Vet. Med.**, **25**: 713-718, 1978.
- Donta, S.T. Differentiation between the steroidogenic effects of cholera enterotoxin and adrenocorticotropin through use of a mutant adrenal cell line. **J. Infect. Dis.**, **129**: 728-731, 1974.
- Donta, S.T. & Haddow, A.D. Citotoxic activity of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, **21**: 989-993, 1978.
- Falcão, D.P.; Lustri, W.R.; Bauab, T.M. & Ferguson, M.R. Incidence of non-01 *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. in fresh water in Araraquara, Brazil. **Curr. Microbiol.**, **37**: 28-31, 1998.
- Ferguson, M.R.; Xing-Jing, Xu; Houston, C.W.; Peterson, J.W.; Coppenhaver, D.H. & Chopra, A.K. Hyperproduction, purification, and mechanics of actions of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, **65**: 4299-4308, 1997.
- Figura, N.; Marri, L.; Verdiani, S.; Ceccherini, C. & Barberi, A. Prevalence, species differentiation and toxigenicity of *Aeromonas* strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. **J. Clin. Microbiol.**, **23**: 595-599, 1986.



- Freid, B. Extraintestinal *Aeromonas* and *Plesiomonas* infections of human. **Experimentia**, **43**: 359-360, 1987
- Freitas, A.C.; Milhomem, A.M.; Nuses, M.P. & Ricciardi, I.D. Virulence factors produced by *Aeromonas hydrophila* strains isolated from different sources. **Rev. Microbiol.**, **24**: 168-174, 1993.
- George, W.L.; Jones, M.J. & Nakata, M.M. Phenotypic characteristics of *Aeromonas* species isolated from adult humans. **J. Clin. Microbiol.**, **23**: 1026- 1029, 1986.
- Gosling, P.J.; Turbull, P.C.B.; Lightfoot, N.F.; Pether, J.V.S. & Lewis, R.J. Isolation and purification of *Aeromonas sobria* cytotoxic enterotoxin and beta hemolysin. **J. Med. Microbiol.**, **38**: 227-234, 1993.
- Gracey, M.; Burke, V. & Robinson, J. *Aeromonas* - associated gastroenteritis. **Lancet ii**: 1304-1306, 1982.
- Haburchak, D.R. *Aeromonas hydrophila*: An underappreciated danger to fisherman. **Infect. Med.**, **13**: 893-896, 1996.
- Hanson, P.G.; Standridge, J.; Jarret, F. & Maki, D.G. Freshwater wound infection due to *Aeromonas hydrophila*. **J. Am. Med. Ass.**, **238**: 1053-1054, 1977.
- Hardy, J.C.; Tood, L.S. & Striger, M.F. Toxin production of *Aeromonas hydrophila* in bacteriological media and foods. Second European Workshop on bacterial protein toxins. **Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene. Abteilung I**: 175-176, 1986.
- Heckerling, P.S.; Stine, T.M.; Pottage, J.C.; Levine, S. & Harris, A.A. *Aeromonas hydrophila* myonecrosis and gas gangrene in a nonimmunocompromised host. **Arch. Intern. Med.**, **143**: 2005-2007, 1983.

- Hill, K.R.; Caselitz, F.H. & Moody, L.M. A case of acute metastatic, myositis caused by a new organism of the family Pseudomonadaceae. **West. Indian. Med. J.**, 3: 9-11, 1954.
- Houston, C.W.; Chopra, A.K.; Rose, J.M; & Kurosky A. Review of *Aeromonas* enterotoxins. **Experimentia.**, 47: 424-426, 1991.
- Howard, S.P. & Buckley, J.T. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for the hemolytic toxin aerolysin from *Aeromonas hydrophila*. **Mol. Gen. Genet.**, 204: 289-295, 1985.
- Howard, S.P.; Garland, W.J.; Green, M.J. & Buckley, J.T. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. **J. Bacteriol.**, 169: 2869-2871, 1987.
- James, C., Dibley, M., Burke, V., Robinson, J. and Gracey, M. Immunological cross-reactivity of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* and cholera toxin. **Clin.Exp.Immunol.**, 47: 34-42, 1982.
- Janda, J.M.; Bottone, E.J. & Reitano, M. *Aeromonas* species in clinical microbiology: significance, epidemiology, and speciation. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 1: 221-228, 1983.
- Janda, J.M. & Brenden, R. Importance of *Aeromonas* bacteremia. **J. Infect. Dis.**, 155: 589-591, 1987.
- Janda, J.M. & Duffey, P.S. Mesophilic *Aeromonas* in human disease: current taxonomy, laboratory identification and infections disease spectrum. **Rev. Infect. Dis.**, 10: 980-995, 1988.
- Joseph, S.W.; Carnahan, A.M.; Brayton, P.R.; Fanning, G.R.; Almazan, R.; Drabick, C.; Trudo, E.W.; & Colwell, R.R. *Aeromonas jandei* and *Aeromonas veronii* dual infection of a human wound following aquatic exposure. **J. Clin. Microbiol.**, 29: 565-569, 1991.

- Keuch, G.T. & Donta, S.T. Classification of enterotoxin on the basis of activity in cell culture. **J. Infect. Dis.**, **131**: 58-63, 1975.
- Khalifa, S.G. *Aeromonas* epidemiological aspects and virulence factors. **Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina**, 1989.
- Khurama, R. & Kumar, A. Prevalence of motile aeromonads in foods of animals origin. **J. Food Sci. Techn.**, **34**: 228-229, 1997.
- Kirov, S.M.; Ardestani, E.K. & Hayward L.J. The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. **Int. J. Food Microbiol.**, **20**: 159-168, 1993.
- Kluyver, A.J. & van Niel, C.B. Prospects for natural system of classification of bacteria. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II.** **94**: 369-403, 1936.
- Krovacek, K.; Faris, A. & Masson, I. Growth of and toxin production by *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* at low temperatures. **Int. J. Food. Microbiol.**, **13**: 165-176, 1991.
- Krovacek, K.; Faris, A.; Baloda, S.B.; Peterz, M.; Lindberg, T. & Mansson, I. Prevalence and characterization of *Aeromonas* spp. isolated from foods in Uppsala, Sweden. **Food. Microbiol.**, **9**: 29-36, 1992a.
- Krovacek, K.; Faris, A.; Baloda, S.B.; Peterz, M.; Lindberg, T. & Mansson, I. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp. from different municipal drinking water supplies in Sweden. **Food. Microbiol.**, **9**: 215-222, 1992b.
- Krovacek, K.; Huang, K.; Sternberg, S. & Svenson, S.B. *Aeromonas hydrophila* septicaemia in a grey seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic Sea: a case study. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect., Dis.** **21(1)**: 43-49, 1998.

- Kuijper, E.J.; Steigerwalt, A.G.; Schoenmakers, B.S.C.I.M.; Peeters, M.F.; Zanen, H.C. & Brener, D.J. Phenotypic characterization and DNA relatedness in human fecal isolates of *Aeromonas* spp. **J. Clin. Microbiol.**, **27**: 132-138, 1989.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-685, 1970.
- Lawson, M.A., Burke, V. & Chang, B.J. Invasion of HEp-2 cells by fecal isolates of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, **47**: 680-683, 1985.
- Levett, P.N. & Daniel, R.R. Adhesion of *Vibrios* and *Aeromonads* to isolated rabbit brush borders. **J. Gen. Microbiol.**, **125**: 167-172. 1981.
- Levine, M.M.; Kaper, J.B.; Black, R.E. & Clements, M.L. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiol Rev.**, **47**: 510-550, 1983.
- Ljungh, A.; Wretling, B. & Wadstrom, T. Evidence for enterotoxin and two cytolytic toxins in human isolates of *Aeromonas hydrophila*. In Toxin Animal, Plant and Microbiol., pp 947-960. Rosemberg, P.(ed.) **Proceedings of the International Symposium Held in San José. Pergamon Press. Oxford**, 1976.
- Ljungh, A.; Popoff, A. & Wadstron, T. *Aeromonas hydrophila* in acute diarrhoeal disease: detection of enterotoxin and biotyping of strains **J. Clin. Microbiol.**, **6**: 96-100, 1977.
- Ljungh, A.; Wretling, B.; & Mollky, R. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, **89**: 387-397, 1981.

- Ljungh, A.; Eneroth, P. & Wadstrom, T. Cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. **Toxicon**, **20**: 787-794, 1982.
- Ljungh, A. & Wadstron, T. *Aeromonas* and *Pleiomonas* as possible causes of diarrhoea. **Infection**, **13**: 169-173, 1985.
- Ljungh, A. *Aeromonas* toxin and other virulence factors. **Experimentia**, **43**: 367-368, 1987.
- Majeed, K.N.; Egan, A. & Mac Rae, I.C. Production of exotoxin from aeromonads at refrigeration temperatures. **Aust. Microbiol.**, **10**: 387-389, 1989.
- Majeed, K.N. & Macrae, I.C. Citotoxic and haemagglutinating activities of motile *Aeromonas* species. **J. Med. Microbiol.**, **40**: 187-193, 1994.
- Martinez-Silva, V.R.; Guzmán-Urrego, M. & Caselitz, F.H. Zur frage der bedeutung von *Aeromonas*stammen bei sauglingsenteritis. **Z. Tropenmed. Parasitol.**, **12**: 445-451, 1961.
- Mello, M.L. & Vidal, B. Práticas em Biologia Celular, **Edgard Blucher**, **71**, R.J, 1980.
- Merino, S.; Rubires, X.; Knochel, S. & Tomás, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. **Int. J. Food Microbiol.**, **28**: 157-168, 1995.
- Neves, S.M.; & Nunes, P.M. Conditions for production and detection of *Aeromonas* enterotoxins. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **89**: 209-211, 1994.
- O'Brien, A.D. & Holmes, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, **51**: 206-220, 1987.
- Palumbo, S.A.; Bencivengo, M.M.; DelCorral, F.; Williams, A.C. & Buchanan, R.L. Characterization of *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail

- foods of animal origin. **J. Clin. Microbiol.**, **8**: 195-199, 1989.
- Pedroso, D.M.M.; Iaria, S.T.; Cerqueira, M.L.; Heidtmann, S.; Rall, V.L.M.; Pimenta, F. & Saad, S.M.I. Virulence factors in motile *Aeromonas* spp. isolated from vegetables. **Rev. Microbiol.**, **28**: 49-54, 1997.
- Pereira W. *Aeromonas*- Prevalência, avaliação do fenômeno suicida e dos marcadores de virulência em espécies isoladas de crianças com gastroenterite aguda e controles. **Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina.** 1992
- Picard, B.; Arlet, G. & Goulet, Ph. Septicémies à *Aeromonas hydrophila*. Aspects épidémiologiques. Quinze observations. **Presse Méd.**, **13**: 1203-1205, 1984.
- Pitarangsi, C.; Echeverria, P.; Whitmire, R.; Tirapat, C.; Formal, S.; Dammin, G.L. & Tingtalapong, M. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*: prevalence among individuals with and without diarrhea to Thailand. **Infect.Immun.**, **35**: 666-673, 1982.
- Popoff, M. & Véron, M. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* group. **J. Gen. Microbiol.**, **94**: 11-22, 1976.
- Potomski, J.; Burke, V.; Watson, I. & Gracey, M. Purification of cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas sobria* by use monoclonal antibodies. **J. Med. Microbiol.**, **23**: 171-177, 1987a.
- Potomski, J.; Burke, V.; Robinson, J.; Fumarola, D. & Miragliotta, G. *Aeromonas* cytotoxic enterotoxin cross reactive with cholera toxin. **J. Med. Microbiol.**, **23**: 179-186, 1987b.
- Quinot, J.F.; Delatte, P.; Flye Sainte Marie, F. & Richard, C. Gangrène gazeuse à *Aeromonas hydrophila*. Un piège thérapeutique. **Presse Méd.**, **11**: 2783-2784, 1982.

- Rose, J.M.; Houston, C.W.; & Kurosky, A. Bioactivity and immunological characterization of cholera toxin cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, **57**: 1165-1169, 1989a.
- Rose, J.M.; Houston, C.W.; Coppenhaver, D.H.; Dixon, J.D. & Kurosky, A. Purification and chemical characterization of cholera toxin cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by human isolated of *Aeromonas hydrophila*. **Infect. Immun.**, **57**: 1170-1176, 1989b.
- Saha, P.K.; Koley, H. & Nair, B.G. Purification and characterization of an extracellular secretogenic non-membrane damaging cytotoxin produced by clinical strains of *Vibrio cholerae* non-O1. **Infect. Immun.**, **64**: 3101-3108, 1996.
- Santos, Y.; Toranzo, A.E.; Barja, J.L.; Nieto, T.P. & Villa T.G. Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. **Infect. Immun.**, **5**: 3285-3293, 1988.
- Sato, M.; Arita, M.; Honda, T. & Miwatani, T. Characterization of a pilus produced by *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiol. Lett.**, **59**: 325-330, 1989.
- Sayal, S.C.; Singh, S.J. & Sen, P.C. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. **J. Med. Microbiol.**, **8**: 195-199, 1975.
- Schiavano, G.F.; Bruscolini, F.; Albano, A. & Brandi, G. Virulence factors in *Aeromonas* spp. and their association with gastrointestinal disease. **Microbiol. Pavia.**, **21**: 23-30, 1998.
- Sears, C. & Kaper, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, **60**: 167-215. 1996.

- Seidler, R.J.; Allen, D.A.; Lockman, H.; Colwell, R.R.; Joshep, S.W. & Daily, O.P. Isolation enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in driving operation. **Appl. Envir. Microbiol.**, **39**: 1010-1018, 1980.
- Serafim, M.B.; Piton, M.A.; Colli, I.A.; Pestana de Castro, A.F. Enterotoxin of *Aeromonas sp*: some culture conditions which affect its production. **Rev. Microbiol.**, **25**: 220-224, 1994.
- Stelma, J.G.; Johson, C.H. & Spaulding P. Evidence for direct involvement of beta hemolysin in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. **Curr. Microbiol.**, **14**: 71-77, 1986.
- Vadivelu, J.; Puthucheary, S.D.; Phipps, M. & Chee, Y.W. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. **J. Med. Microbiol.**, **42**: 171-174, 1995.
- von Graevenitz, A. *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In: Lennette, E.H.; Ballows, A.; Haulei, W.J. & Shadony, H.J. (ed). **Manual of Clinical Microbiology**. 4th ed. American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 278-281. 1985.
- Wadstrom, T., Ljungh, A. & Wretling, B. Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *Aeromonas hydrophila* from human infections. **Pathol. Microbiol. Scand.**, **84**: 112-114, 1976.
- World Health Organization-meeting on persistent diarrhoea in children in developing countries. Geneva: 14-17. 1989.
- Wretling, B., Molley, R. & Wadstrom, T. Separation of two haemolysins from *Aeromonas hydrophila* by isoelectric focusing. **Infect. Immun.**, **4**: 503-507, 1971.



- Wretling, B. & Heden, L. Formation of extracellular haemolysin by *Aeromonas hydrophila* in relation to protease and staphylolytic enzyme. **J. Gen. Microbiol.**, **78**: 57-65. 1973.
- Xing-Jing, Xu; Houston, C.W.; Peterson, J.W. & Chopra, A.K. Amino-acid residues involved in biological functions of the cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila*. **Gene**, **156**: 79-83, 1995.
- Xin J.; Ferguson M.R.; Popov V.L.; Houston C.W.; Peterson J.W. & Chopra A.K. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutants. **Infect. Immun.**, **66**: 3501-3509, 1997.
- Zimmermann, O.E.R. Die bakterien unserer trink- und nutzwasser. **Ber Naturwiss. Ges. Chemnitz.**, **11**: 86, 1890.