

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CLAUDIO ROBERTO NOBREGA AMORIM

ESTUDO DA BIOLOGIA DA FÍMBRIA F42 PRODUZIDA  
POR *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Claudio Roberto Nobrega Amorim*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

TESE APRESENTADA AO INSTITUTO DE  
BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
DOUTOR EM BIOLOGIA FUNCIONAL E  
MOLECULAR, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM  
BIOQUÍMICA.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Tomomasa Yano  
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Sumiko  
Arita Matsuura

CAMPINAS  
2002

NIDADE 30  
 CHAMADA T/UNICAMP  
Am68e  
 EX \_\_\_\_\_  
 OMBO BCI 50864  
 ROC 16.837/02  
 : \_\_\_\_\_  
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 12/10/91  
 Nº CPD \_\_\_\_\_

CMO0173050-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

BIB ID 256990

**Amorim, Claudio Roberto  
Nobrega**

Am68e

Estudo da biologia da fímbria F42 produzida por  
*Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) / Claudio Roberto  
Nobrega Amorim. -- Campinas : [s.n.], 2002.

Orientadores: Tomomasa Yano, Maria Sumiko Arita  
Matsuura.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Colibacilose. 3. Suíno. 4. Diarréia.  
5. Proteínas de bactérias. I. Yano, Tomomasa.  
II. Matsuura, Maria Sumiko Arita. III. Universidade Estadual  
de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

**DATA DA DEFESA 12/04/2002**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Tomomasa Yano (orientador)**



---

**Profa. Dra. Nilce Corrêa Meirelles**

---

**Prof. Dr. Lewis Joel Greene**




---

**Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé**



---

**Profa. Dra. Gleize Villela Carbonel**

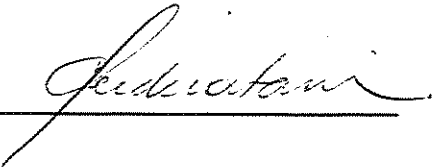


---

**Prof. Dr. Domingos da Silva Leite**

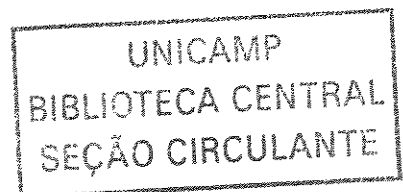
---

**Dra. Cleide Ferreira Catani**



---

200213496



Ao meu querido filho  
Guilherme,  
A maior alegria  
da minha vida

**NÃO SE PREOCUPE,  
NO FINAL,  
TUDO DÁ CERTO**

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela orientação, conselhos, apoio, incentivo, colaboração, por me agüentar durante todo este tempo e, principalmente pela grande amizade.

A Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Sumiko Arita Matsuura, pela orientação, apoio, incentivo e conselhos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lewis Joel Greene, do Centro Interdisciplinar de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela orientação, apoio, incentivo, pelo fornecimento de toda estrutura para o seqüenciamento de aminoácidos e por participar na banca examinadora..

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pelos ensinamentos, por toda a ajuda no dia-a-dia e por participar na banca examinadora..

Ao Prof. Dr Gleize Vilela Carbonell, pelos ensinamentos, incentivo, apoio, colaboração, por toda a ajuda no dia-a-dia e, principalmente, pela grande amizade pela participação na banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé, pelo apoio, colaboração, incentivo e por participar na banca examinadora.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Nilce Corrêa Meirelles, pelo apoio, colaboração e por participar na banca examinadora.

A Dra. Cleide Ferreira Catani, pelo apoio, amizade, colaboração, incentivo e por participar na banca examinadora.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Maria Sílvia Viccari Gatti, pelos ensinamentos, incentivo, apoio, colaboração e, principalmente, pela grande amizade.

À Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lucila Costallat Ricci, pelo apoio, colaboração e por permitir o uso da estrutura da pós-graduação da Microbiologia sempre que necessário.

À Dra. Helen Julie Laure, pela orientação, pela grande ajuda no sequenciamento da proteína e análise dos resultados e, principalmente, pela grande amizade durante todos esses anos.

Ao Dr. José César Rosa, do Centro Interdisciplinar de Química de Proteínas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pelo grande auxílio no seqüenciamento de proteínas.

Aos Professores do Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica, por toda a ajuda intelectual e material.

Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência, disponibilidade de equipamentos e auxílio na resolução de problemas.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, pela disposição e ajuda.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela disposição e ajuda.

Às Secretárias do Departamento de Bioquímica, Andréia e Marina, por toda ajuda na parte burocrática e pelo espírito prestativo sempre presente.

Às Secretárias do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Lúcia e Lurdes, por toda ajuda na parte burocrática e pelo espírito prestativo sempre presente.

Aos alunos do Curso de pós-graduação do Departamento de Bioquímica, pela convivência e amizade.

Aos alunos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência e amizade.

Ao Carlos, Stella e Alessandra, pelo apoio, amizade e toda ajuda no dia-a-dia do laboratório.

À Heloisa, pela grande amizade, apoio, ajuda e por sempre estar ao meu lado durante todos esses anos.

À Patrícia, Silvia, Ana Claudia, Rosabel, Márcia Tomy, Márcia Regina, Rose, Juan, Georgio, Alex, Mario Paulo, (Carol)<sup>2</sup>, pela amizade e ajuda no laboratório.

Ao Luciano e Marques, pela amizade e acolhida hospitaleira sempre que necessário.

Ao pessoal da O7 pela hospedagem e amizade.

Aos demais da turma 90 que, se eu não parar de agradecer, eu não termino a tese.

Aos meus irmãos, familiares e amigos, que estiveram sempre junto comigo, me apoiando.

À minha mãe, que continua sendo o meu maior exemplo na vida.

**À Andréia, que com seu amor, compreensão, carinho e amizade mudou completamente a minha vida nos últimos anos.**

À FAPESP pelo apoio financeiro.



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. OBJETIVOS</b>	10
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1. Amostra Bacteriana Padrão	11
3.2. Meios de cultura	11
3.3. Purificação do antígeno F42	11
3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	12
3.4.1. Gel SDS gradiente 8-25% e Transferência para membrana de PVDF	13
3.4.2. Blot	15
3.5. Imunodifusão Radial Dupla	15
3.6. Extração de DNA plasmidiano	16
3.7. Reação de polimerase em cadeia (PCR)	17
3.8. Redução e carboximetilação da proteína	19
3.9. Determinação da composição de aminoácidos da proteína e dos peptídeos	19
3.10. Digestão com brometo de cianogênio	20
3.10.1. Separação e Purificação dos Peptídeos	20
3.11. Digestão enzimática com Tripsina	21
3.11.1. Digestão com Tripsina em solução	21
3.11.1.1. Separação dos fragmentos obtidos	21
3.11.2. Digestão enzimática in situ (SDS-PAGE)	21
3.11.2.1. Extração do Gel	22
3.11.2.2. Separação dos fragmentos obtidos	22
3.11.2.3. RP-HPLC capilar em coluna C <sub>18</sub> acoplado a um microblotter	22
3.11.3. Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC)	24
3.12. Digestão com Endoproteinase Asp-N	24
3.13. Sequenciamento automático de proteína/peptídeo	25
3.14. Sequenciamento da porção Carboxi-terminal com carboxipeptidase Y	26

<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Purificação do F42	27
4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida	27
4.3. Imunodifusão Radial Dupla	27
4.4. Extração de DNA plasmidiano	31
4.5. Reação de polimerase em cadeia (PCR)	31
4.6. Determinação da composição de aminoácidos da proteína	32
4.7. Isolamento e purificação dos peptídeos após a digestão com CNBr	32
4.8. Digestão enzimática com Tripsina	32
4.9. Digestão com Endoproteinase Asp-N	39
4.10. Determinação da composição de aminoácidos dos peptídeos	39
4.11. Sequenciamento automático da proteína/peptídeos	39
4.12. Sequenciamento da porção Carboxi-terminal com carboxipeptidase Y	58
<b>5. DISCUSSÃO</b>	59
<b>6. CONCLUSÕES</b>	70
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b>	71

## ABREVIATURAS

ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAgEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ST	Enterotoxina termo-estável
LT	Enterotoxina termo-lábil
KDa	Kilodaltons
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PBS	Tampão Salina Fosfatada
BSA	Soro Albumina Bovina
MM	Meio Mínimo Essencial de Davis
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
TRIS	Trietil amino metano
PEG	Poliétileno Glicol
IgG	Imunoglobulina G
PTH	Feniltiohidantoína
PTHAA	Feniltiohidantoína-aminoácido
PCA	Ácido Piroglutâmico
HPLC	High Performance Liquid Column
RP-HPLC	Reverse Phase High Performance Liquid Column
RPM	Rotações por Minuto
HCl	Ácido Clorídrico
NaCl	Cloreto de Sódio
DOC	Desoxicolato de Sódio
V	Volts
PVDF	Polivinil
IEF	Isoeletrofocalização
DTT	Ditiotreitol

M	Molar
A	Ampere
W	Watts
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
NaOH	Hidróxido de Sódio
RNA	Ácido Ribonucléico
PCR	Polimerase Chain Reaction
LB	Meio de Luria-Bertani
dNTP	Desoxinucleotídeos tri-fosfato
q.s.p.	quantidade suficiente para
UV	Ultra-Violeta
IAA	Ácido Iodoacético
PTC	Feniltiocarbamato
TEA	Trietilamina
PITC	Fenilisotiocarbamato
CNBr	Brometo de cianogênio
TFA	Ácido trifluoroacético
AcN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
DMPTU	Dimetilfeniltio-uréia
DPTU	Difeniltio-uréia
DPU	Difeniluréia
ATZAA	Aminoacilanilino-tiazolinona
CpY	Carboxipeptidase Y
TPCK	N-Tosil-L-Fenilalanina Clorometil Cetona

## RESUMO

Colibacilose enterotoxigênica ocorre em leitões recém-nascidos e porcos no pós-desmame. Um dos fatores de virulência de *E. coli* é a presença de antígenos de aderência, muitas vezes estruturas do tipo fimbria, que permite a ligação da bactéria às células do hospedeiro. Em 1986, Yano *et al.* descreveram uma nova adesina, chamada de F42. Este trabalho tem por objetivo a caracterização bioquímica desta fimbria a nível molecular e comparar sua estrutura primária com a da fimbria F41, a fim de diferenciá-las.

Assim, a fimbria F42 foi extraída e purificada através de cromatografia em coluna de gel filtração Sepharose CL 4B, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025M com NaCl 0,15M, pH 7,4; apresentando massa molecular aparente de 16 kDa. Foi feita a análise da composição de aminoácidos da proteína, demonstrando a presença de aproximadamente 145 resíduos em uma única cadeia e mostrando diferenças com a fimbria F41. Fez-se, também, sua redução e carboximetilação, digestão com brometo de cianogênio, separação dos peptídeos através de cromatografia em coluna de fase reversa C<sub>8</sub> e obtenção de peptídeos menores com a fimbria submetida à ação de tripsina tratada com N-tosil-L-fenilalanilclorometil cetona (TPCK). Os peptídeos resultantes da digestão foram separados através de cromatografia em coluna de fase reversa C<sub>18</sub>. Foi feita nova digestão com CNBr e os peptídeos separados e purificados em coluna Superdex Peptide e foi feita a análise da composição de aminoácidos dos peptídeos. Foi feita a extração do DNA plasmidiano e PCR da amostra padrão. Foram feitas, também, digestões com Tripsina e Endoproteinase Asp-N, separação em cromatografia de fase reversa, análise da composição de aminoácidos de alguns peptídeos e sequenciamento de aminoácidos destes peptídeos e da porção N-terminal até o 32º resíduo, com o seguinte resultado: *aswtegqpgdiiiggeitspsvkwlwktgegl*. Tentou-se, ainda, o sequenciamento da porção C-terminal com carboxipeptidase Y.

## SUMMARY

Enterotoxigenic colibacillosis occurs in newborn piglets and weaned pigs. One of the factors of virulence of *E. coli* is the presence of antigens of adherence, often fimbria type structure, that allow the connection of the bacteria to the cells of the host. In 1986, Yano et al. described a new adessin, denominated of F42. This work aims the biochemical characterization of this fimbria at molecular level and to compare their primary structure to the fimbria F41, in order to distinguish them.

Thus, the fimbria F42 was extracted and purified through chromatography of gel filtration in Sepharose CL 4B equilibrated with lid Tris-HCl 0,025M with NaCl 0,15M, pH 7,4, presented a molecular mass apparent of 16kDa. It was performed the analysis of the amino acids composition of the protein, and was demonstrated the presence of 145 residues e showing differences with F41 fimbria. It was made their reduction, carboximetilation, cyanogen bromide digestion, separation of the peptides through of reverse phase chromatography C<sub>8</sub> and obtaining of smaller peptides with the fimbria subject to the action of tripsin treated with N-tosil-L-phenylalanilclorometil ketone (TPCK). The resulting peptides of the digestion were separate through reverse phase chromatography C<sub>18</sub>. It was undergone digestion with CNBr and the separate peptides and purified in Superdex Peptide column and it was made the analysis of the composition of amino acids of the peptides. They were made the extraction of the plasmidial DNA and PCR of the sample standard. They were done, also, digestions with Tripsin and Endoproteinase Asp-N, separation in reverse phase chromatography, analysis of the composition of amino acids of some peptides and sequencing of amino acids of these peptides and of the portion N-terminal to the 32nd residue, presenting these results: *aswtegqpgdiüggeitspsvkwlwktgeg*. The sequencing of the portion C-terminal was tried with carboxipeptidase Y.

## 1. INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é uma bactéria gram negativa, anaeróbia facultativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, tribo *Escherichia*, de ocorrência freqüente na microbiota intestinal humana e de animais, colonizando o hospedeiro desde suas primeiras horas de vida na qualidade de comensal (Edwards & Ewing, 1972; Nataro & Kaper, 1998).

Mesmo integrando a microbiota intestinal humana e de animais homeotérmicos, algumas linhagens podem apresentar-se patogênicas devido à capacidade que possuem de colonizar, invadir e/ou destruir tecidos, produzir toxinas ou de captar produtos essenciais do hospedeiro, causando infecções extraintestinais (sepsis, meningite, infecções do trato urinário, peritonites etc.) ou infecções intestinais (diarréia, disenteria, colite hemorrágica, síndrome hemolítica urêmica etc.) (Levine, 1987; Robins-Browne, 1987; Blanco *et al.*, 1992; Nataro & Kaper, 1998).

Como agentes de infecções intestinais e, de acordo com Nataro & Kaper (1998), são admitidos atualmente pelo menos seis diferentes categorias de *E. coli*, definidas de acordo com o conjunto de genes de virulência que albergam e os sinais e sintomas que evocam. Essas categorias compreendem: a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a *E. coli* enteropatogênica (EPEC), a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), a *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e a *E. coli* enteroinvasora (EIEC).

Estas categorias de *E. coli*, além de causarem patologias em humanos, podem acometer animais de interesse econômico como suínos, bovinos e ovinos, aumentando assim o índice de mortalidade dos animais jovens (Corrêa & Correia, 1992; Nataro & Kaper, 1998).

Dentre estas seis categorias de *E. coli* relacionadas com enteropatogenia, as *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) têm grande importância pois podem causar enfermidades infecciosas ou infecto-contagiosas agudas ou sub agudas de apresentação clínica polimorfa, afetando principalmente bovinos e suínos jovens. Além disso, as ETEC também podem acometer crianças, geralmente com até cinco anos de idade, causando diarreia, além de serem responsáveis pela diarreia dos viajantes (Gonzalez & Blanco, 1987; Nataro & Levine, 1994; Nataro & Kaper, 1998).

O antígeno somático (O), que diferencia cepas virulentas de inócuas é um antígeno lipopolissacarídico, complexo, estável a 100°C ou a 120°C, dividido em dois grupos, baseado em sua mobilidade em campo elétrico, onde o primeiro grupo é imóvel e usualmente está associado a doenças extraintestinais (ausência de compostos ácidos no lipopolissacarídeo (LPS) que compõe a parede celular da bactéria) e o segundo grupo que apresenta mobilidade para a porção catiônica na eletroforese, usualmente associa-se a doenças entéricas (presença de compostos ácidos no LPS). O gene para o antígeno “O” pode sofrer mutações, apresentando variações suaves O<sup>+</sup> e O<sup>-</sup>, onde normalmente O<sup>-</sup> são ditas colônias rugosas (perderam a especificidade antigênica), pois auto-aglutinam em salina e por isso não podem ser sorotipadas nos procedimentos usuais de laboratório (Lior, 1994).

Nas ETEC, alguns sorogrupos têm sido descritos como associados a fatores de colonização, como por exemplo: O6, O8, O9, O20, O25, O45, O63, O64, O78, O101, O115, O128c, O138, O141, O147, O148, O149 e O157 (Gonzalez & Blanco, 1987; Alexander, 1994; Campos & Trabulsi, 1999).

A patogenicidade das ETEC se dá pela combinação de dois fatores de virulência: a expressão de fatores de colonização específicos, os quais



permitem à bactéria colonizar o epitélio intestinal, e a habilidade de sintetizar enterotoxinas (Gyles, 1986; Holland, 1990).

Até hoje, vários estudos envolvendo fatores de colonização e a produção de enterotoxinas, como as enterotoxinas termoestáveis ST-I e ST-II, e enterotoxinas termo-lábeis LT-I e LT-II, têm buscado explicar o papel da *E. coli* como integrante da microbiota intestinal, como indicadora de poluição no ambiente e alimentos, como modelo de pesquisa microbiológica que envolve Bioquímica e Genética Molecular, e como um patógeno em várias espécies animais, inclusive o homem (Levine, 1987). A habilidade de sintetizar toxinas também caracteriza a ETEC na infecção diarréica de suínos jovens.

As enterotoxinas sintetizadas por ETEC dividem-se em 2 grupos, o grupo das enterotoxinas termoestáveis do tipo I (ST-I ou ST-a), e tipo II (ST-II ou ST-b) e o grupo das enterotoxinas termolábeis do tipo I (LT-I) e II (LT-II) (Campos & Trabulsi, 1999).

O grupo constituído pelas enterotoxinas termoestáveis do tipo I (ST-I ou ST-a) e tipo II (ST-II ou ST-b) são proteínas estáveis a 100°C por 30 minutos, de baixo peso molecular, pouco imunogênicas e codificadas por gene localizado em plasmídio. A enterotoxina ST-I é uma exotoxina, solúvel em metanol, contendo seis resíduos de cisteína que permitem estabelecer pontes de dissulfeto que conferem a esta toxina resistência à temperatura e à hidrólise enzimática (Blanco *et al.*, 1993). A sua ação em estimular a guanilato-ciclase presente nas células, eleva os níveis de Guanosina Monofosfato cíclico (GMPc) no jejuno e íleo, resultando em secreção de líquido para luz intestinal (diarréia). A enterotoxina ST-I possui duas variantes genéticas, a STp (suínos) e a STh (humanos), constituídas por 18 e 19 resíduos de aminoácidos respectivamente, que exibem grande homologia entre si e podem ser sobrepostos a partir da região carboxi-terminal, o que revela, além da presença

de um resíduo de aminoácido a mais em STh, diferença em quatro outros resíduos. Estas diferenças concentram-se na região amino-terminal (três resíduos) e apenas uma na região carboxi-terminal. A porção carboxi-terminal mais conservada, está implicada na atividade biológica dessas enterotoxinas.

Para se detectar a presença de enterotoxina ST nas amostras de ETEC, o ensaio clássico é a prova do camundongo recém-nascido, onde basicamente se avalia o acúmulo de líquido no intestino de camundongo após a administração de sobrenadante de cultura livre de bactérias (Dean *et al.*, 1972). Ensaio “*in vitro*”, utilizando células eucarióticas (González & Blanco, 1987), assim como técnicas moleculares como hibridização e reação de polimerase em cadeia (González & Blanco, 1987), têm sido desenvolvidos para detecção de enterotoxina termoestável.

A enterotoxina ST-II que é codificada por gene plasmidial, induz danos histológicos no epitélio intestinal, ocasionando perda celular das vilosidades e atrofia parcial nos vilos e alterando o equilíbrio hidrossalino da mucosa do intestino delgado. Algumas amostras de ETEC de origem suína sintetizam a ST-II, e estas raramente são sintetizadas por amostras de origem humana (Echeverria *et al.*, 1984).

Os ensaios para a detecção desta enterotoxina são: a prova da alça ligada em rato (Whipp, 1990) e em porco de 5 a 7 semanas (Gyles, 1979).

O grupo das enterotoxinas termolábeis do tipo I (LT-I) e II (LT-II), são constituídos por proteínas inativadas a 60°C por 15 minutos, codificadas por genes plasmidiais, imunogênicas, com alto peso molecular, com estruturas compostas por subunidades A e B, sendo a subunidade B formadora de um pentâmero que se liga aos receptores gangliosídeos presentes na membrana dos enterócitos, monoasilgangliosídeo I (GM<sub>1</sub>) para LT-I; e diaosilgangliosídeo 1b (GD<sub>1b</sub>) e diaosilgangliosídeo 1a (GD<sub>1a</sub>) para LT-II;

enquanto a subunidade A é responsável pelas alterações intracelulares no hospedeiro (estimulação da adenil-ciclase através de sua atividade enzimática ADP-ribosilante). Nesta classe, encontram-se as LTh (humano) e as LTp (suíno) que diferem em apenas um resíduo de aminoácido (DyKes *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1987).

As enterotoxinas termolábeis do tipo I (LT-I) têm uma relação físico-química, biológica e estrutural com a toxina colérica (CT), apresentando cerca de 80% de homologia nas seqüências de aminoácidos das subunidades A e B, resultando numa infecção mais branda e mais curta do que a causada pelo *Vibrio cholerae*, tendo identidade sorológica e neutralização pelo anti-soro antitoxina colérica.

As enterotoxinas termolábeis do tipo II (LT-II) são semelhantes às LT-I. São compostas também por duas subunidades A e B, sendo que a A apresenta cerca de 55% de homologia com LT-I e ativa adenil-ciclase. A subunidade B não apresenta homologia com a mesma subunidade da LT-I e CT, não sendo neutralizada pelo anti-soro anti-LT ou anti-CT (Holmes *et al.*, 1986).

Holmes *et al.* (1986) purificaram a LT-II estabelecendo sua origem protéica de peso molecular 87 KDa, sendo a subunidade A com peso molecular de 28 KDa e a subunidade B com 11,8 KDa. A LT-II pode provocar a morte em camundongos quando injetada intra peritonalmente (Holmes *et al.*, 1986).

O ensaio biológico mais utilizado para detecção das LT é o teste da alça ligada em coelho (De & Chatterjee, 1953). Ensaio em células eucarióticas, ensaios imunológicos, enzimáticos ou de hibridização de DNA ou PCR são técnicas utilizadas para a detecção de LT (Gonzalez & Blanco, 1987)

Guth *et al.* (1986) descreveram dois membros distintos da família LT-II – LT-IIa e LT-IIb, apresentando 71% e 66% de identidade entre as

subunidades A e B respectivamente; onde a LT-IIa liga-se ao gangliosídeo GD1b e LT-IIb liga-se a GD1a (Sears & Kaper, 1996).

Foi demonstrado em amostras de ETEC que infectavam suínos e bovinos que sua capacidade patogênica se dava em função de seu mecanismo enterotóxico e de um segundo fator do tipo adesivo, sem o qual essas amostras não conseguiam desencadear os processos diarréicos (Smith & Gyles, 1970; Smith & Lingood, 1971). Até o momento os fatores de colonização mais importantes descritos para as amostras de ETEC de origem animal são:

F4 (K88) descrito pela primeira vez por Ørskov *et al.* (1961). Este, ocorre em amostras de origem suína, apresenta hemaglutinação resistente ao açúcar D-manose (MR) com eritrócitos de cobaio e de galinha (Gaastra & de Graaf, 1982), pode apresentar variantes antigênicas, sendo sua codificação genética, plasmidial. Em amostras de origem suína a ocorrência do fator F4 pode estar associada com maior frequência à produção de LT que à produção de LT/ST ou ST-I e ST-II isoladamente (Castro *et al.*, 1984).

F6 (987P) (Isaacson *et al.*, 1977) apresenta hemaglutinação sensível ao açúcar D-manose (MS) e é constituído por subunidades de 20 KDa. (Gaastra & de Graaf, 1982). Sua codificação é cromossômica; ocorre geralmente em amostras de *Escherichia coli* de origem suína, encontrado sempre associado à produção de ST (Guineé & Jansen, 1979; Moon *et al.*, 1980).

F5 (K99) foi descrito pela primeira vez como um antígeno K comum por Smith & Linggood (1972). Em 1975, Ørskov *et al.* (1975) descreveram-no em amostras de *Escherichia coli* de fezes diarréicas de suínos, bovinos e ovinos. Apresenta hemaglutinação MR com eritrócitos de cavalo e de carneiro (Gaastra & de Graaf, 1982). É codificado por genes plasmidiais, e encontrado associado à produção de ST-I em amostras de fezes de suínos e bovinos.

F41 (Morris *et al.*, 1978) é encontrado em amostras de *E. coli* de origem bovina e suína, apresentando hemaglutinação MR com eritrócitos humano, de cobaio, de cavalo e de carneiro. Encontra-se associado freqüentemente à produção de F5 e ST-I. Sua codificação genética é cromossômica. (Gaastra & de Graaf, 1982).

F165 (Fairbrother *et al.*, 1986) possui duas variantes para este fator de colonização - F165<sub>1</sub> e F165<sub>2</sub>, sendo encontrados em amostras de *E. coli* isoladas de suínos. Apresentam hemaglutinação MR com eritrócitos de carneiro, de porco e humano com codificação genética cromossômica. Está associado a produção de ST-II (Fairbrother *et al.*, 1986; Fairbrother *et al.*, 1989; Dubreuil & Fairbrother, 1992).

O fator de colonização F42 foi descrito pela primeira vez por Yano *et al.* (1986), tendo sido isolado de amostras de ETEC de suínos com diarreia neonatal, mostrando-se associado à produção da toxina termoestável ST-I. Tais amostras apresentaram hemaglutinação MR frente às hemácias humanas, de galinha, carneiro, cobaio e cavalo; e aderência difusa em células HeLa (célula de adenoma de colo uterino humano) bem como em células epiteliais de intestino de leitão (Yano *et al.*, 1986). Em microscopia eletrônica, observou-se a presença de estruturas do tipo fimbria quando as amostras foram cultivadas a 37°C, mas não quando incubadas a 18°C.

O anti-soro policlonal preparado com o fator de colonização F42 inibiu a hemaglutinação, a aderência difusa em células HeLa e em epitélio intestinal de leitão, mostrando ser este fator de colonização diferente dos até então descritos para ETEC de origem suína.

As condições de crescimento e produção do fator de colonização F42 foram descritas por Leite *et al.* (1988), que demonstraram que a produção do F42 em Meio Mínimo (Davis & Mingioli, 1950) era glicose dependente e, que

a adição de Alanina ou Acetato de Sódio ao meio, reprimia a sua expressão, a qual também foi inibida quando o pH do meio de cultura era inferior a 7,4.

Este fator de colonização (F42) foi purificado por cromatografia em coluna de Sepharose 4B, seu peso molecular estimado em 31 KDa e com ponto isoelétrico em pH 3,2. Na imunoeletroforese, observou-se que não havia reação cruzada entre o anti-soro anti-F42 e os antígenos de aderência hemaglutinantes de origem suína já descritos (Leite *et al.*, 1988).

Silveira *et al.* (1987) relataram que a amostra de *E. coli* 567-7 produtora de F42, apresentou seis plasmídios, entre eles um não conjugativo (21,1 MDa) que codificava o fator de colonização F42 e a toxina ST-I.

Castro *et al.* (1990) demonstraram que amostras de *E. coli* que expressavam o fator de colonização F42 (F42<sup>+</sup>) causavam diarreia em leitões quando inoculadas por via oral. Após 42 horas da inoculação, foi detectado por imunofluorescência direta, que a amostra bacteriana colonizava o intestino delgado destes animais. Mostraram também o re-isolamento da amostra nas fezes diarreicas desses animais e a detecção de ST-I.

Em 1993, Sperandio *et al.* (1993) propuseram a igualdade entre os fatores de colonização F41 e F42, frisando que o F42 possuía a mesma subunidade de peso molecular que F41 (29,294 KDa), apresentava estrutura fibrilar, era reconhecido pelo anti-soro F41 e a sonda molecular do gene F41 reconhecia as amostras de *E. coli* produtoras de F42; e que somente o teste de hemaglutinação MR com eritrócitos de galinha como demonstraram Yano *et al.* (1986) não era conclusivo para diferenciar o fator de colonização F41 do F42.

Em 1997, Leite *et al.* (1997) verificaram que a hemaglutinação causada pelo F42 era sensível ao carboidrato N-acetil-galactosamina. Estes mesmos autores, estudando os possíveis receptores para F42, mostraram, através de

tratamento enzimático, que este é de natureza glicoprotéica, e que nos eritrócitos mais de uma estrutura pode atuar como receptor para este fator de colonização. Verificaram também, através de ensaios antigênicos, que a reação de hemaglutinação para F42 com diferentes eritrócitos era devido à presença de estruturas moleculares semelhantes na membrana dos eritrócitos.

Estudos epidemiológicos realizados por Zerbini (1993) relataram a presença de F42 em 7,4% de amostras de *E. coli* isoladas de suínos durante as primeiras semanas de vida e, por Brito (1997) relataram a presença de F42 em 29% das amostras de *E. coli* isoladas de suínos com bacteriúria. Entretanto estes autores não correlacionaram a presença do F42 com enterotoxinas e antígeno somático.

## **2. OBJETIVOS**

1. Purificação da fimbria F42.
2. Hidrólise seletiva da fimbria purificada.
3. Purificação dos peptídeos.
4. Sequenciamento dos peptídeos.
5. Ordenar os peptídeos a fim de determinar a estrutura primária da fimbria.
6. Comparação da seqüência parcial de aminoácidos da fimbria F42 com a seqüência da fimbria F41.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

**3.1. Amostra Bacteriana Padrão** - Amostra de *Escherichia coli* 567/7 enterotoxigênica (O8: H<sup>-</sup>, STa<sup>+</sup>F42<sup>+</sup>) de origem suína e caracterizada por Yano *et al.* (1986), foi utilizada como sendo amostra de ETEC padrão para a produção da fimbria F42.

**3.2. Meio de cultura** - A amostra 567/7 foi cultivada em Meio Mínimo (MM), idealizado por Davis & Minglioli (1950), tanto líquido quanto sólido (1,5% de ágar) acrescentando 0,5% de glicose, conforme recomendado por Yano *et al.* (1986).

**3.3. Purificação do antígeno F42** - Para a obtenção do antígeno F42 na forma solúvel, seguimos a metodologia descrita por Leite *et al.* (1988), com algumas modificações. A amostra 567/7 foi cultivada em Meio Mínimo em erlenmeyer de 1000 ml com agitação (150 rpm), a 37°C por 18 horas. A cultura foi então centrifugada a 12000 rpm por 10 minutos (centrífuga Beckman - modelo J2-21) e o sedimento ressuspense em tampão Tris-HCl 0,025M, pH 7,4 contendo 1M de cloreto de sódio. A extração do antígeno foi realizada por incubação a 60°C em banho-maria por 30 minutos com agitação ocasional, como recomendado por Stirm *et al.* (1967). Após esse tratamento, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C, sendo o sedimento dispensado. O sobrenadante obtido, foi precipitado inicialmente com sulfato de amônio em concentração de 20% de saturação, sendo a mistura centrifugada 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o precipitado descartado. Ao sobrenadante, nova quantidade de sulfato de amônio foi adicionada, até atingir

a saturação de 45%. Após total dissolução, a mistura foi centrifugada 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o precipitado resultante ressuspensão em tampão Tris-HCl 0,025 M e dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão. O material foi aplicado em coluna de cromatografia Sepharose CL 4B (Pharmacia) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025M contendo 0,15 M de NaCl, pH 7,4. O material foi eluído com o mesmo tampão, sendo coletadas amostras de 3 ml/tubo em um aparelho ÄKTA Purifier (Pharmacia), num fluxo de 0,5 ml por minuto. A absorbância dessas amostras foi medida num comprimento de onda de 280 nm em espectrofotômetro Beckman - modelo DU 640. As frações correspondentes ao antígeno F42 foram reunidas, concentradas com à vácuo em um concentrador SpeedVac ISS 110 (Savant) e novamente dialisadas contra tampão Tris-HCl 0,025M. Quando necessário, o material foi recromatografado nas mesmas condições.

Após isto, o material foi dialisado por 72 horas a 4°C contra Desoxicolato de sódio (DOC) a 0,5% para remoção de lipídeos. Em seguida, o material foi centrifugado a 12000 rpm por 30 minutos e o sobrenadante coletado e dialisado exaustivamente contra tampão Tris-HCl 0,025M.

**3.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)** - A pureza da fimbria F42 foi confirmada através de PAGE com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), em um sistema Hoefer SE 600 Series - EPS 600 Pharmacia (fonte de energia), seguindo o método descrito por Fairbanks *et al.* (1971) utilizando minigéis de poliacrilamida a 10%. A montagem dos géis e condições de corrida seguiram a metodologia descrita no “Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises” (1991).

As amostras protéicas foram tratadas com tampão de amostra 2 vezes concentrado (0,125M de Tris-HCl, Sigma, pH 6,8; 4% de SDS Sigma; 20% de

glicerol, Reagen; 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol, Sigma e 0,5% de Azul de bromofenol, Merck), aquecidas em banho-maria fervente por 5 minutos e aplicadas nas canaletas do gel. A corrida eletroforética consistiu na aplicação de uma corrente inicial de 50 Volts, até a penetração do material no *running gel*, e depois aumentada para 100 V por aproximadamente 3 horas, ou até que o indicador (azul de bromofenol) atingisse o final do gel de separação. Como marcadores de massa molecular, foram utilizados: Fosfolipase B (94.000), Albumina (67.000), Ovalbumina (43.000), Anidrase Carbônica (30.000), Inibidor de Tripsina (20.100) e Lactoalbumina (14.400) (Pharmacia).

Os géis foram corados com Coomassie Blue (Fairbanks *et al.*, 1971) e/ou nitrato de prata. Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida-SDS foi transferido para um recipiente contendo solução corante/fixador (0,125% de Coomasie Blue R-250, Sigma; 50% de metanol, Merck e 10% de ácido acético, Merck) por 1 hora sob agitação ocasional. Após este período, o gel foi imerso na solução de descoloração I (50% de metanol e 10% de ácido acético), mantido sob agitação constante por 1 hora. A seguir, a solução I foi substituída pela solução de descoloração II (ácido acético a 7% e metanol a 5%) sob agitação ocasional por 2 horas. O procedimento foi repetido com a solução II até a completa remoção da cor de fundo existente no gel.

**3.4.1 Gel SDS gradiente 8-25% e Transferência para membrana de PVDF** - A eletroforese foi realizada em aparelho Phast System, da Pharmacia-LKB, e desenvolvida segundo as instruções do fabricante (Pharmacia-LKB, 1990).

Os géis são pré-fabricados e compostos de solução acetato de sódio 0,112M e Tris-HCl 0,112M com pH 6,4 e, fitas tamponantes (“buffer strips”)

compostas de tricina 0,2M, Tris 0,2M, SDS, 0,55% em pH 8,1- estas fitas são feitas em 3% de agarose IEF.

O gel de gradiente 8-25%, que separa proteínas de peso molecular entre 6 kDa. e 300 kDa. foi escolhido, sendo composto de: 13 mm de região de empilhamento (4,5%T , 3%C), e 32 mm de região de separação, onde apresenta um gradiente linear contínuo de 8 a 25% com 2% de “crosslinking”. O gel apresenta espessura de aproximadamente 0,45 mm.

A amostra seca foi diluída em tampão Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0 contendo 2,5% de SDS (m/v), 1% de DTT (ditiotretol) (m/v) e 0,01% de azul de bromofenol (m/v). A amostra foi incubada por cinco minutos a 100°C e então aplicada no gel, com os aplicadores apropriados. A quantidade de amostra aplicada no gel pode variar de 250 a 1000 ng por microlitro, e o gel foi corado com Coomassie Blue R. As condições elétricas e outras especificações para a corrida foram as recomendadas pelo fabricante. Foram aplicados neste gel 250 ng do padrão de baixo peso molecular (Low Molecular Weight electrophoresis calibration kit, lot. 3020446011, Pharmacia-LKB), que incluem as proteínas: Fosforilase-b (94000 Da), BSA (67000 Da), Ovalbumina (43000 Da), Anidrase Carbônica (30000 Da), Inibidor de Tripsina de Soja (20100 Da) e Lactoalbumina (14400 Da).

As soluções utilizadas para corar o gel também seguiram as especificações do fabricante, a saber:

- 1) Corante: solução aquosa de 0,1% de Coomassie Blue R em 30% de metanol e 10% de ácido acético;
- 2) Descorante: solução aquosa de 30% de metanol e 10% de ácido acético;
- 3) Preservante: solução aquosa de 13% de glicerol e 10% de ácido acético.

A coloração e descoloração foram realizadas à 50°C. O tempo de coloração foi de 8 minutos, o descoloramento foi realizado em três etapas de 5, 8 e 10 minutos, e 5 minutos para a solução preservante.

**3.4.2. Blot** - A proteína foi transferida para membrana de PVDF por 40 minutos, a uma diferença de potencial de 20V, corrente de 25mA e potência de 1W, à 15°C. O tampão de transferência foi composto por: 25mM Tris, 192mM Glicina, pH 8,3, e 20% metanol.

**3.5. Imunodifusão Radial Dupla** - A imunodifusão radial dupla foi feita segundo o método descrito por Ouchterlony (1958). Lâminas de microscopia foram recobertas com ágar 0,1% em água e deixadas para secar na estufa. Após a secagem, foi depositada sobre estas lâminas ágar 1% em NaCl 0,85%, contendo 0,001% de azida sódica, até obter uma camada de aproximadamente 3 mm de espessura. Após solidificação, foram feitos orifícios circulares, com a ajuda de um molde, um na região central e seis em torno do orifício central, de modo que a distância entre os orifícios da circunferência e o orifício central fossem aproximadamente equidistantes. O soro policlonal anti-F42, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, do Laboratório de Antígenos Bacterianos da UNICAMP, foi colocado no orifício central e os antígenos obtidos pela cromatografia da fimbria F42, em diferentes diluições, na razão 2, nos orifícios periféricos. As lâminas foram conservadas em câmara úmida, à temperatura constante de 37° C, até a observação de linha de precipitação.

**3.6. Extração de DNA plasmidiano** – Foram extraídos os DNAs plasmidiano de amostras produtoras de F42 através de lise alcalina, segundo métodos modificados de Birnboim & Doly (1979) e Horowicz & Burke (1981), adaptados de Sambrook *et al.* (1989). As amostras foram cultivadas em 2 ml de meio de cultura LB e incubadas a 37°C “overnight”. A cultura foi transferida para um tubo Eppendorf e centrifugada a 12000 rpm por 30 segundos e descartado o sobrenadante.

O precipitado foi ressuspenso em 100 µl da Solução I gelada com o auxílio de uma micropipeta.

**Solução I**

Glicose 50mM

Tris-HCl (pH 8,0)

EDTA 10mM (pH 8,0)

Após isto, foram adicionados 200 µl da Solução II, preparada imediatamente antes do uso.

**Solução II**

NaOH 0,2N

SDS 1%

O tubo foi fechado e o conteúdo misturado com movimentos de inversão suaves, tomando-se cuidado para que toda a superfície do tubo entrasse em contato com a solução II. O tubo foi mantido em gelo por 4 minutos. Em seguida, foram adicionados 150 µl da Solução III.

**Solução III**

Acetato de potássio 5M                      60,0 ml

Ácido acético glacial                      11,5 ml

Água    28,5 ml

A solução resultante é 3M com relação ao potássio e 5M com relação ao acetato. O tubo foi fechado e o conteúdo misturado com movimentos de inversão suaves (7 a 10 inversões). O tubo foi mantido em gelo por 15 minutos e centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 400 µl do sobrenadante para um tubo limpo e adicionado igual volume de fenol:clorofórmio (1:1), misturado com vórtex, centrifugado a 12000 rpm por 2 minutos a 4°C e transferido o sobrenadante para outro tubo limpo. Foram adicionados, então, 2 volumes de etanol 100% (-20°C) por 30 minutos. Centrifugou-se a 12000 rpm por 5 minutos, removeu-se o sobrenadante, e o excesso foi seco em SpeedVac ISS (Savant). O sedimento resultante foi lavado com 1 ml de etanol 70% (-20°C) e o sobrenadante foi novamente removido e o excesso seco. O sedimento foi redissolvido em tampão TE (pH 8,0) contendo RNase e estocado a -20°C.

**T.E. 1x (pH 8,0)**

Tris-HCl 10mM (pH 8,0)

EDTA 1mM (pH 8,0)

**3.7. Reação de polimerase em cadeia (PCR)** - As reações foram realizadas de acordo com a técnica descrita Ojeniyi *et al.* (1994), usando-se "primers" específicos para F41 e K88.

As amostras foram cultivadas em meio de LB a 37°C por 18 horas. Foi retirado 1 ml do cultivo e este foi centrifugado a 10.000 rpm por 3 minutos; o sobrenadante foi descartado e o "pellet" ressuspenso em 200 µl de tampão TE. Esta solução foi fervida por 10 minutos para extração parcial do DNA e centrifugada a 10.000 rpm por 3 minutos. Retirou-se 5 µl do sobrenadante para a realização do PCR.

Para a reação, foram utilizados: 2 µl de dNTPs contendo 20mM de cada um; 1 µl de *Taq* polimerase (1U/µl); 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 5µM; 5 µl de tampão 10X para PCR; 5 µl de amostra; 1,1 µl do primer 1 (50pmol); 1 µl de "primer" 2 (50pmol); e água ultrafiltrada (Milli Q - Millipore) q.s.p. para 50 µl. As soluções foram pré-aquecidas sem a enzima *Taq* a 94°C por 10 minutos e, posteriormente, submetidas a 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; após os quais foram submetidos a 72°C por 7 minutos, para o "primer" F41. Para o "primer" K88, foi utilizado o mesmo ciclo, exceto no segundo passo, onde ao invés de 50°C, foi utilizada temperatura de 53°C.

Para as reações de PCR foram utilizados os seguintes pares de "primers" já descritos em literatura, conforme mostra a Tabela abaixo:

<b>Gene</b>	<b>Seqüência 5'→3'</b>	<b>Tamanho esperado do produto amplificado em pares de base (pb)</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>F41</i></b>	GAGGGACTTTCATCTTTAG AGTCCATTCCATTATAGGC	431	Ojeniyi <i>et al.</i> (1994)
<b><i>K88</i></b>	ATCGGTGGTAGTACTGC AACCTGCGACGTCAACAAGA	601	Ojeniyi <i>et al.</i> (1994)

Para a leitura do resultado, foram misturados 5 µl de tampão de amostra e 10 µl da amostra. Adicionou-se 10 µl da mistura a um gel de agarose a 2% em TE. A identificação da banda foi feita mediante incubação em solução de brometo de etídio e visualização em trans-iluminador UV.



**3.8. Redução e carboximetilação da proteína** - A proteína foi dissolvida em 2 ml de tampão Tris-HCl 1M pH 8,2 contendo EDTA 2mM. Para dissolução total da proteína, foram adicionados 6M de guanidina-HCl (GnHCl, BRL). A proteína foi reduzida com 5 µl de solução recém preparada de ditioneitol (100 mg/ml em H<sub>2</sub>O; DTT, Merck) e deixada em repouso à temperatura ambiente por 4 horas. O oxigênio molecular foi retirado, antes e após a adição do DTT, por borbulhamento de nitrogênio gasoso. A esta solução foram adicionados 10 µl de ácido iodoacético (100 mg/ml em tampão Tris-HCl pH 8,2; IAA, Sigma) e deixada por 15 minutos a temperatura ambiente ao abrigo da luz, após borbulhamento de nitrogênio gasoso. Após processada a reação de carboximetilação, foram adicionados, novamente, 10 µl da solução de DTT, para bloquear IAA livres. A mistura foi dialisada, exaustivamente, contra H<sub>2</sub>O ultrafiltrada (MilliQ-plus, Millipore) e duas vezes contra solução de ácido acético 10% e depois concentrada em concentrador SpeedVac (Fushitani *et al.*, 1988).

**3.9. Determinação da composição de aminoácidos da proteína e dos peptídeos** – A proteína e os peptídeos purificados (descrição adiante) foram hidrolizados com vapor de HCl 6N contendo fenol à 0,5% (v/v) à 110°C por 22 horas. Os aminoácidos liberados foram convertidos em feniltiocarbamato (PTC-aminoácidos). Cada tubo de amostra foi alcalinizado com 20 µl de uma mistura metanol:água:triethylamina (TEA) na proporção 2:2:1 (v:v:v) (Metanol, EM, grau cromatográfico; TEA, Pierce, grau seqüencial), agitado e seco por 15 minutos à 50°C, em SpeedVac. Em seguida, adicionou-se à cada tubo de amostra, 20 µl do reagente de derivação: metanol:água:TEA:PITC na proporção de 7:1:1:1 (v:v:v:v) (PITC, Pierce), agitou-se e deixou-se reagir por

20 minutos à temperatura ambiente. Após este período, o excesso de reagente foi removido em SpeedVac, por, no mínimo, uma hora, à temperatura ambiente (esta etapa é crítica, pois elimina o material que absorve UV, o qual poderá interferir na detecção do PITC-AA). Este procedimento de derivação foi realizado também com a mistura de aminoácidos padrões da Pierce. As análises foram realizadas em HPLC com uma coluna Picotag usando gradiente entre solvente A (acetato de sódio 0,1M pH 5,7) e solvente B (60% de acetonitrila e 40% de H<sub>2</sub>O) (Bidlingmeyer *et al.*, 1984; Henrikson & Meredith, 1984).

**3.10. Digestão com brometo de cianogênio** – Uma quantidade de proteína carboximetilada (~ 1230 µg) foi incubada com 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA - Merck) 70% ou 1 ml de ácido fórmico (Merck) 70%, e brometo de cianogênio (CNBr, Sigma) na razão de 1/70. A mistura de reação foi deixada à temperatura ambiente por 24 horas ao abrigo da luz. Após isto, foi diluída dez vezes com H<sub>2</sub>O ultrafiltrada e concentrada em concentrador SpeedVac (Klemm, 1981).

**3.10.1. Separação e Purificação dos Peptídeos** – O material resultante da digestão com CNBr, foi separado e purificado em uma coluna de gel filtração Superdex Peptide H/R (Pharmacia) eluída com tampão fosfato 0,05M + uréia 2M em um fluxo de 0,3 ml/minuto. Os picos resultantes foram recromatografados na mesma coluna eluída com bicarbonato de amônio 0,1M em um fluxo de 0,6 ml/minuto. Os peptídeos foram isolados, também, por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC Shimadzu - modelo 10A). Os peptídeos carboximetilados e reduzidos foram aplicados em coluna de fase reversa C<sub>8</sub> (ultrasphere octyl - 4.6mm X 250mm) da Beckman. A

cromatografia foi desenvolvida utilizando um gradiente escalonado entre a solução A [H<sub>2</sub>O + 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA, Pierce)] e a solução B [acetonitrila (Sigma-Aldrich) + TFA 0,1%], em um fluxo de 1 ml por minuto. O eluente foi monitorado a 220 nm e 280 nm (Fushitani *et al.*, 1988; Matsuura *et al.*, 1990).

### ***3.11. Digestão enzimática com Tripsina***

***3.11.1. Digestão com Tripsina em solução*** - Adicionou-se a enzima Tripsina-TPCK (N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) (Trypsin, modified sequencing grade; from bovine pancreas; Boehringer Mannheim; lote 84053721) na proporção de 1/5 (p/p), à 37° por 24 horas. A adição foi realizada em duas vezes iguais, sendo que a segunda adição foi 2 horas após o início da reação. Para 112 µg de F42 (3,5nmoles) foram realizadas duas adições de 10 µg de Tripsina. A reação foi interrompida com 20 µl de TFA 4% (ou o suficiente para acidificar a solução).

***3.11.1.1. Separação dos fragmentos obtidos*** - Após a reação ser interrompida a amostra foi seca em concentrador rotatório SpeedVac, diluída com 30 µl de Acetonitrila (AcN) 5%/TFA 0,1% para ser aplicada em RP-HPLC narrow bore.

***3.11.2. Digestão enzimática in situ (SDS-PAGE)*** – 6 µl da amostra (6,6 µg) foi aplicado em um gel pré-fabricado com gradiente de 8-25% do sistema Phast System da Pharmacia (como descrito acima) e corado com Coomassie Blue.

As bandas do gel foram cortadas (aproximadamente 2x5 mm, sendo dependente da banda corada) e lavadas por 3 vezes com 250 µl de 200mM de bicarbonato de amônio contendo 50% de acetonitrila (ou até que não tenha mais SDS), agitadas bem e desprezado o sobrenadante. Secou-se muito bem a banda do gel contendo a proteína em concentrador rotatório SpeedVac.

Adicionou-se às bandas do gel, já secas, 0,5 µg da enzima diluída em tampão 200mM de bicarbonato de amônio (aproximadamente 10 µl), e deixou digerindo por 24 horas à 37°C. Parou-se a reação com 20 µl de TFA 4%.

**3.11.2.1. Extração do Gel** - Os peptídeos foram extraídos do gel (bandas cortadas) utilizando-se 3 solventes:

- 1) 50 µl TFA 0,1%, deixou-se no ultra-som por 30 minutos, e o sobrenadante foi coletado e guardado;
- 2) 50 µl AcN 30%/TFA 0,1%, deixou-se no ultra-som por 30 minutos, e o sobrenadante foi coletado e guardado;
- 3) 50 µl AcN 30%/TFA 0,1%, deixou-se no ultra-som por 30 minutos, e o sobrenadante foi coletado e guardado.

Os 3 sobrenadantes foram agrupados e concentrados até aproximadamente 20 µl em concentrador rotatório SpeedVac.

**3.11.2.2. Separação dos fragmentos obtidos** - Os sobrenadantes concentrados foram diluídos para 30 µl de AcN 5%/TFA 0,1% a fim de serem aplicadas em RP-HPLC capilar acoplado a um blotter.

**3.11.2.3. RP-HPLC capilar em coluna C<sub>18</sub> acoplado a um microblotter**  
- O sistema de cromatografia capilar é composto de: uma bomba ABI 140D Solvent Delivery System, da Perkin Elmer (modelo 140D-01, número de série

100000002J); um detector 785A programmable Absorbance Detector, da Applied Biosystem (modelo 785A/173, número de série 004N7072905); um injetor e forno 112A Oven/ Injector, da applied Biosystem (número de série 112A E97083257) e; um coletor ABI 173 Microblotter, da Perkin Elmer (modelo 173-0 8/97, número de série 100000008J).

A proteína ou peptídeo é submetido a uma cromatografia capilar em uma coluna C<sub>18</sub> (0,5x150 mm) com partículas de 300 Å e 5 microns, fluxo de 5,0 µl/min e gradiente crescente de acetonitrila. Os solventes utilizados são: solvente A – 0,1% TFA aquoso e, solvente B – 0,07% TFA em acetonitrila. O gradiente é o mesmo para todas as cromatografias (exceto quando indicado), de 5 a 45% de solvente B em 140 minutos e mais 40 minutos em 45% de solvente B, e um equilíbrio de 30 minutos é realizado antes de cada corrida. Dois marcadores que absorvem no UV (cLC Dye Mark II, Protein Sequencing Reagent, PE applied Biosystem – A: “Nile Blue Sulfate-TFA”, B: “Gentian Violet-TFA”) são adicionados a cada amostra, quando esta é aplicada em sistema capilar, para permitir o alinhamento do cromatograma com a membrana de PVDF, onde o efluente do sistema contendo a amostra é coletado.

O efluente da coluna capilar é gotejado diretamente sobre uma membrana de PVDF (coletor denominado de “blotter”) previamente mergulhada em metanol (MeOH), e em seguida passada em água, que é colocada em cima de filtros umedecidos em água, eliminando deste modo as etapas de transferência, secagem e ressuspensão do efluente contendo o pico da proteína/peptídeo a ser aplicado no sequenciador.

**3.11.3. Cromatografia líquida de alta resolução em fase reversa (RP-HPLC)** - A amostra F42-tripsina foi submetida a cromatografia em coluna Vydac C<sub>18</sub> narrow bore (2,5x250 mm), com fluxo de 0,2 ml/min e gradiente crescente de acetonitrila, para determinar sua complexidade. Os solventes utilizados foram: solvente A - 0,1%TFA aquoso e; solvente B - 100% Acetonitrila/0,09% TFA aquoso. O gradiente utilizado é linear e varia de 0 a 100% do solvente B em 100 minutos, sendo que ao iniciar cada corrida um equilíbrio de 20 minutos nas condições iniciais é realizado. Após a injeção da amostra, a corrida fica 5 minutos em 0% de B e; após a corrida, a coluna é lavada por 15 minutos a 100% de B. O fluxo é de 0,2 ml/min. A detecção das amostras é feita em comprimentos de onda de 220 e 280nm.

**3.12. Digestão com Endoproteinase Asp-N** – Uma alíquota de 40 µg de proteína foi aplicada em SDS-PAGE e, após eletroforese, submetida a digestão “in situ” com Endoproteinase-Asp-N, conforme descrito acima para tripsina. A razão enzima/substrato foi de 1/100 (m/m), em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 8,0, por 18 horas a 37°C. A reação foi interrompida adicionando 20 µl de TFA 5%. Os peptídeos foram separados em uma coluna Vydac C<sub>18</sub>, num fluxo de 1 ml por minuto, nas mesmas condições de gradiente descritas acima para narrow bore (Rosa *et al.*, 1999).

**3.13. Sequenciamento automático de proteína/peptídeo** - O sequenciamento de proteína/peptídeo foi realizado em Sequenciador automático 491 Protein Sequencer (Procise); bombas 140C Microgradient System e detector 785A Programmable Absorbance Detector, e software Model 610A, tudo da Applied Biosystems.

O sequenciamento de proteína/peptídeo baseia-se na química de degradação de Edman, cujo fundamento é a remoção de cada aminoácido da região amino-terminal da proteína/peptídeo a cada ciclo completo, com sua detecção através de aminoacilfeniltio-hidantoína (PTHAA) em cromatografia de fase reversa (RP-HPLC).

A proteína/peptídeo é aplicada em suporte de fibra de vidro ou membrana de PVDF e colocada na câmara reacional de vidro, com temperatura controlada, onde ocorre toda a química de Edman. A reação baseia-se na neutralização da amostra com uma base forte (N-metil piperidina) para que o grupamento terminal amínico fique em sua forma de base de Lewis e promova o ataque nucleofílico ao reagente de acoplamento, fenilisotiocianato (PITC). Há formação de subprodutos como, dimetilfeniltio-uréia (DMPTU), difeniltio-uréia (DPTU) e difeniluréia (DPU), da reação do PITC com água, que são removidos do meio reacional através de uma mistura de substâncias orgânicas (acetato de etila e cloreto de butila). O terminal amínico ao ficar marcado, torna a ligação peptídica mais lábil, e um tratamento ácido em meio anidro (TFA) promove a quebra da ligação formando o aminoacilanilinothiazolinona (ATZAA) e a proteína/peptídeo sem o resíduo amínico-terminal. Para a extração do ATZAA do meio reacional, uma adição com solventes com polaridades distintas é efetuado (acetato de etila), sendo que o ATZAA apresenta maior solubilidade em fase orgânica e o peptídeo (já sem o aminoácido N-terminal) na fase aquosa. E a partir deste

ponto um novo ciclo é iniciado com a proteína/peptídeo utilizada no ciclo anterior (Edman, 1950). O ATZAA, é transferido para o frasco conversor aquecido, e sendo bastante instável é convertido no seu derivado aminoacilfeniltio-hidantoína (PTHAA) em meio aquoso, que será identificado e quantificado por RP-HPLC (embora não fazendo parte da química de Edman, também constitui parte do processo e atualmente é realizado através de técnicas cromatográficas em RP-HPLC). O HPLC está padronizado com 10pmoles de PTHAA, e sua eficiência é verificada com o sequenciamento de 10pmoles de lactoalbumina.

**3.14. Sequenciamento da porção Carboxi-terminal com carboxipeptidase Y** – Duas alíquotas de 1nmol da fimbria F42 foram incubadas à 25°C com carboxipeptidase Y (CpY) em acetato de sódio 0,1M, pH 5,6, numa razão molar de 1:70 e 1:700, respectivamente, e foi-se retirando alíquotas nos seguintes intervalos de tempo: 5, 15, 30, 60 e 120 minutos. Cada alíquota teve sua reação parada com TFA 0,1%. O aminoácido liberado é analisado segundo método PTC (Hayashi, 1977; Ambler, 1967a; Ambler, 1967b; Antonini *et al.*, 1961; Kilmatin, 1981).

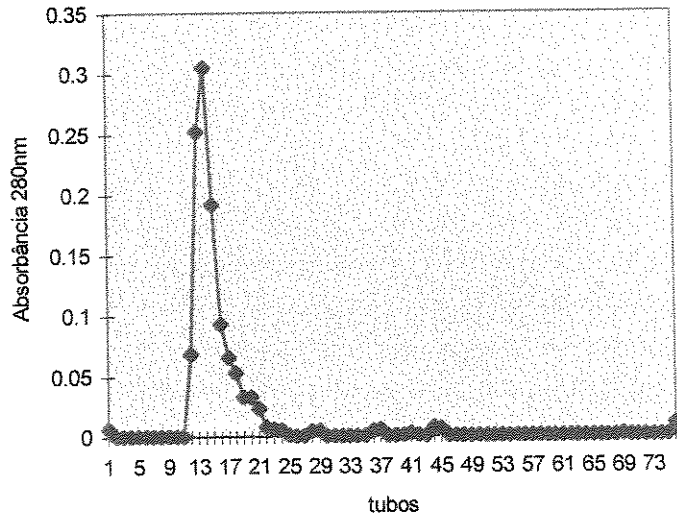


## 4. RESULTADOS

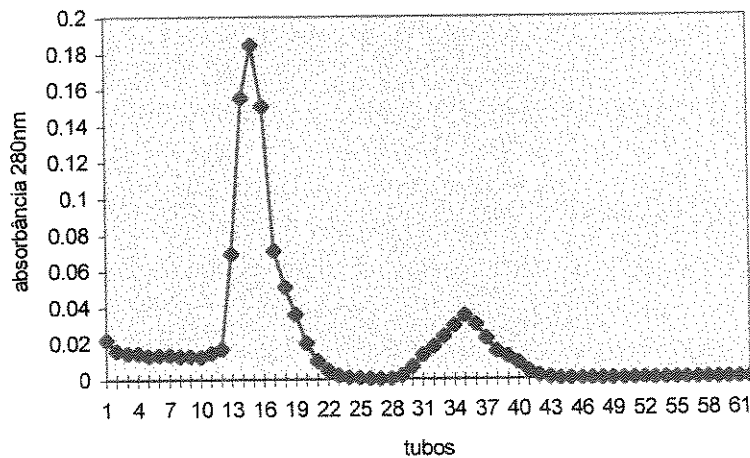
**4.1. Purificação do F42** –O resultado da purificação da fimbria está apresentado nas Figuras 1 e 2. O material eluído no primeiro pico da cromatografia (Figura 1), foi submetido à recromatografia no mesmo sistema cromatográfico. Dois picos emergiram da coluna (Figura 2). Este material foi, então, tratado com tampão fosfato contendo 0,5% de Desoxicolato de sódio (DOC) e a fração DOC solúvel, que continha a fimbria, foi coletada.

**4.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida** - O material eluído no primeiro pico (Figura 1), que continha a fimbria, foi aplicado em um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e verificou-se que o eluato apresentava uma banda no gel, compatível com massa molecular aparente de 62 kDa., uma de 43 kDa, outra de 31 kDa e uma quarta de 16 kDa. (dados não mostrados). Após recromatografia, o material eluído no primeiro pico foi novamente aplicado em SDS-PAGE. O material da fração DOC solúvel foi aplicado em um gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), e verificou-se que o material apresentava uma banda no gel, com uma massa molecular aparente de 16 kDa. (Figura 3).

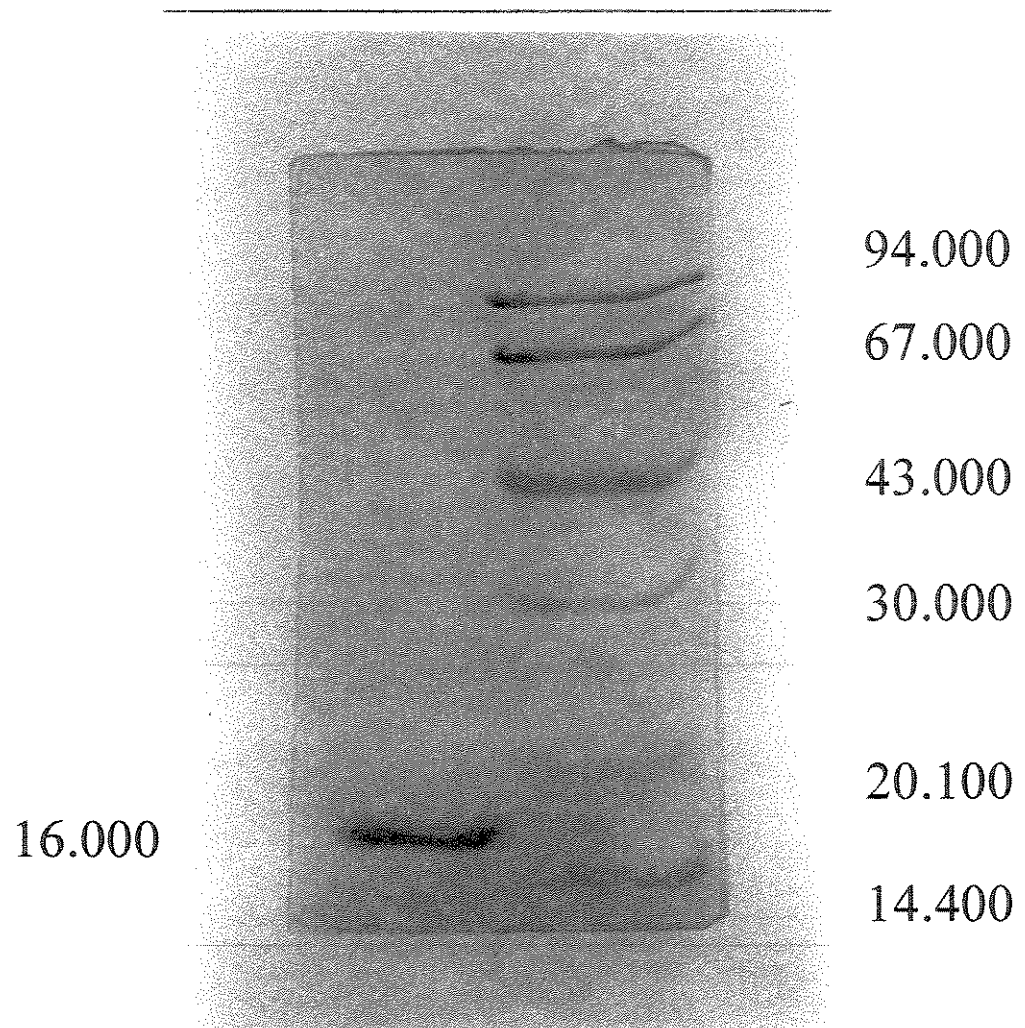
**4.3. Imunodifusão Radial Dupla** - A imunodifusão demonstrou que o material eluído no primeiro pico era o que continha a fimbria F42 (Figura 4). A linha de precipitação foi observada até o título de diluição de 1/8 do antígeno.



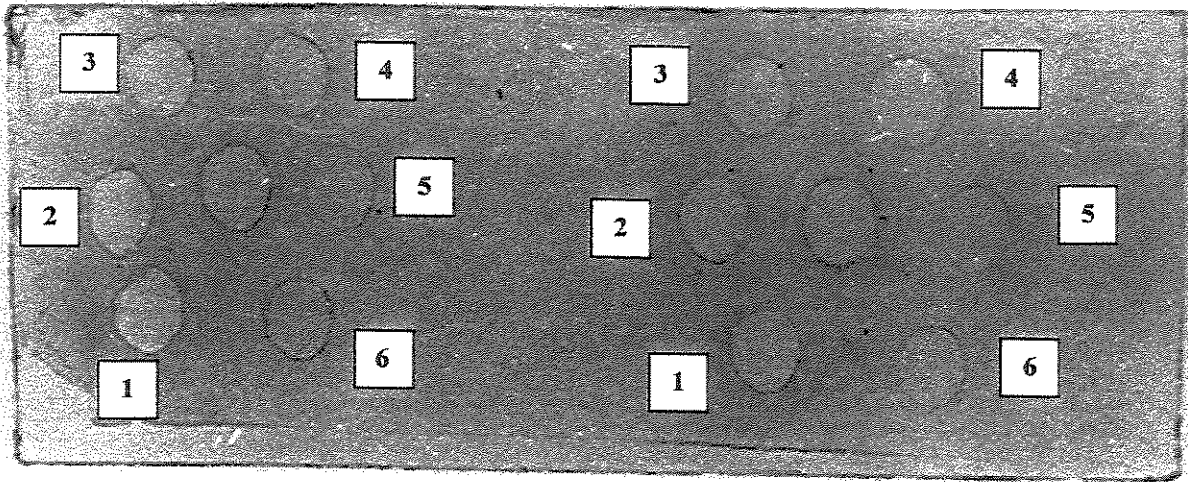
**Figura 1.** Perfil cromatográfico do extrato bruto da fimbria F42 após passagem em coluna Sepharose CL 4B, equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,025 M contendo NaCl 0,15M pH 7,4. As frações foram coletadas em volume de 3 ml por tubo. A adesina foi detectada no primeiro pico. A absorbância das frações foi medida no comprimento de onda igual a 280 nm.



**Figura 2 .** Recromatografia do pico contendo a fimbria F42 (primeiro pico). As condições e coluna utilizadas foram as mesmas da figura anterior.



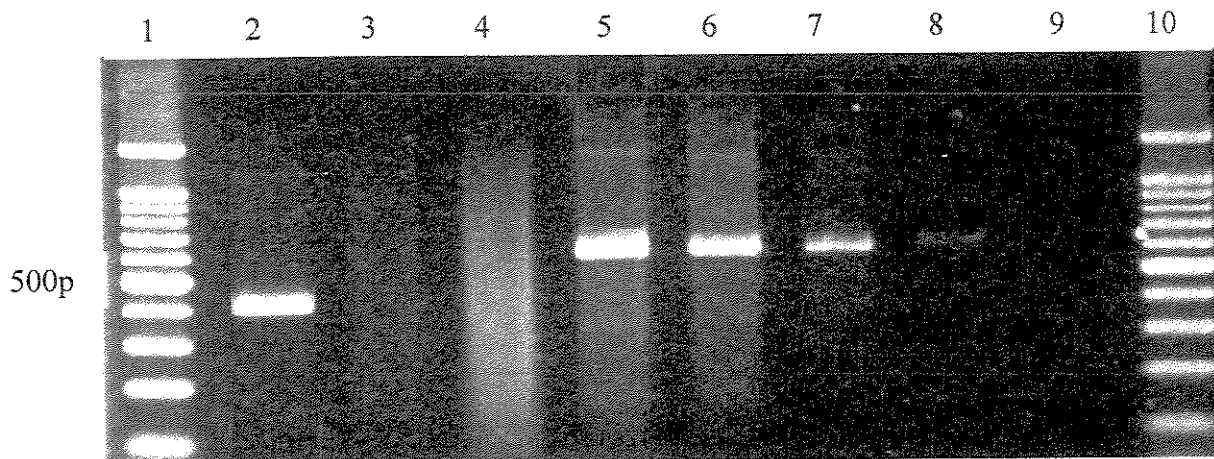
**Figura 3.** Identificação da fimbria F42 pelo SDS-PAGE corado com Coomassie Blue. A banda à esquerda representa F42 purificado pela precipitação com sulfato de amônio a 45% e cromatografia em coluna de Sepharose CL 4B, equilibrada e eluída com tampão Tris-HCl 0,025 M contendo NaCl 0,15M. Os números à direita indicam as massas moleculares dos marcadores de peso molecular (kDa.).



**Figura 4.** Imunodifusão Radial Dupla do primeiro pico eluído da cromatografia em Sepharose CL 4B. (AC) soro anti-F42, (1) antígeno F42 eluído da cromatografia [1/1]; (2) F42 [1/2]; (3) F42 [1/4]; (4) F42 [1/8]; (5) F42 [1/16]; (6) F42 [1/32]. A lâmina foi corada com Coomassie Blue.

**4.4. Extração de DNA plasmidial** – O resultado da extração do DNA plasmidial demonstrou que a amostra apresentava apenas um plasmídio.

**4.5. Reação de polimerase em cadeia (PCR)** – Os resultados do PCR da amostra padrão de *E. coli* 567/7 com os “primer” para F41 e K88 são mostrado na Figura 5.



**Figura 5-** Reação de PCR para os genes F41 (2-4) e K88 (5-9) da amostra 567/7. 1 e 10- Padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder – Promega); 2 - B41 O101 K - F41+ (amostra padrão para F41); 3 e 8 - 567/7; 4 e 9 - DH5a (controle negativo para as duas reações); 5 - (padrão positivo para K88ab); 6 - (padrão positivo para K88ac); 7 padrão positivo para K88ad).

**4.6. Determinação da composição de aminoácidos da proteína** - Os resultados da análise e composição de aminoácidos estão nas Tabelas I e II.

**4.7. Isolamento e purificação dos peptídeos após a digestão com CNBr**  
- Os peptídeos reduzidos e carboximetilados foram separados por cromatografia líquida de alta resolução em coluna de fase reversa (RP-HPLC), apresentando perfis diferentes em todas as cromatografias.

#### **4.8. Digestão enzimática com Tripsina**

A digestão enzimática de 112 µg da fímbria F42 com tripsina em solução resultou em 30 picos distinguíveis na injeção 3 da amostra (Figura 6), e 33 picos na injeção 5 (Figura 7). Os picos foram separados em uma coluna Vydac C<sub>18</sub> narrow bore, de acordo com o descrito acima. Destes, foram escolhidos os picos 12 e 23 da injeção 3 (indicados pela seta na figura), e os picos 2, 3, 4, 5, 6, 16, 27 e 32 da injeção 5 (indicados pela seta na figura), para serem feitas análise da composição de aminoácidos por serem os maiores e mais bem definidos.

A digestão de 26,5 µg de F42 com tripsina “in situ” resultou em 24 picos principais (Figura 8). Os peptídeos foram separados em RP-HPLC capilar em coluna C<sub>18</sub> acoplado a um microblotter. Os picos foram coletados diretamente em membrana PVDF.



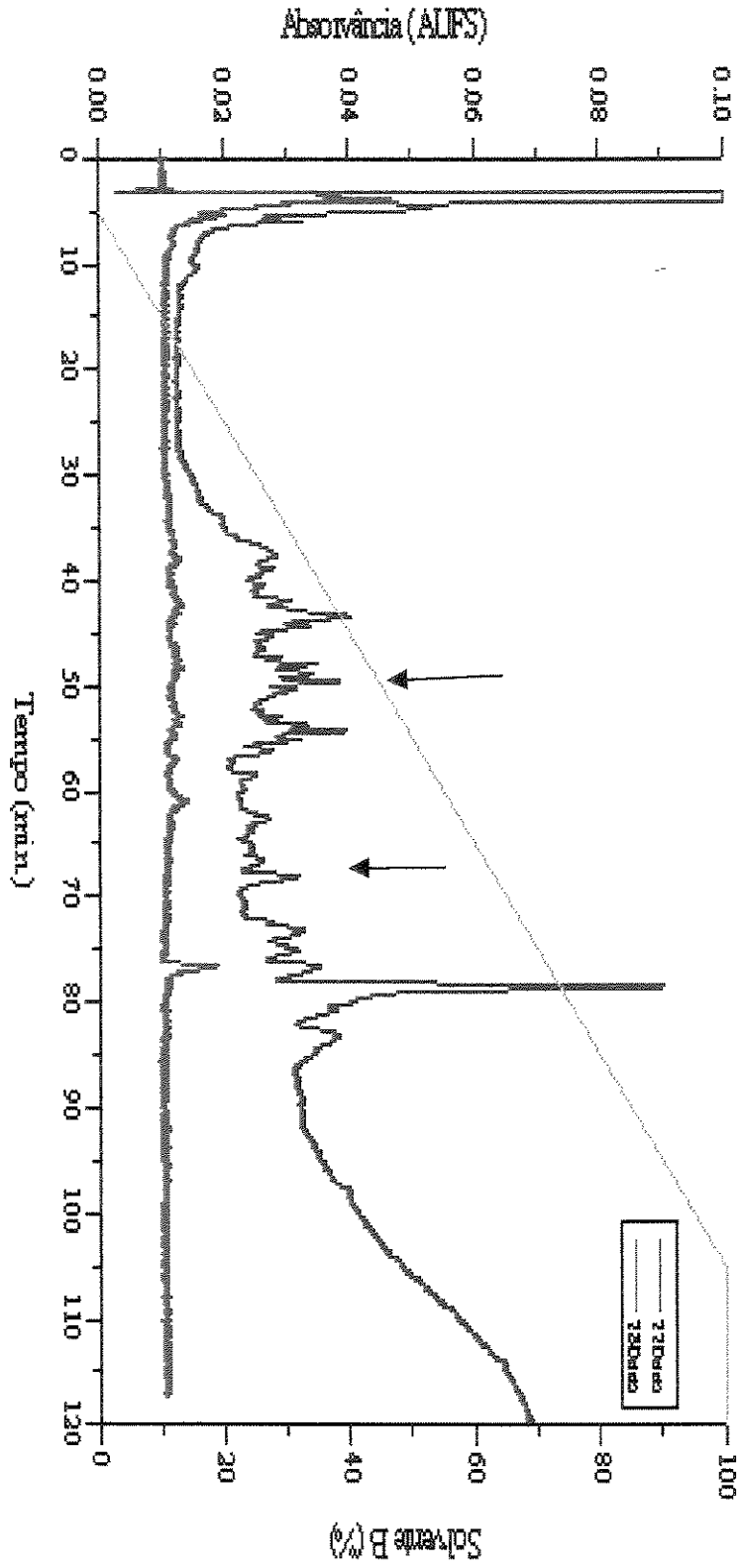
**Tabela II:** Comparação das composições de aminoácidos das fimbrias F42 e F41 de *Escherichia coli*. Dados são referentes às razões molares dos aminoácidos recuperados após hidrólise em 6.0 N HCl à *vácuo* por 22 horas

F42		F41*	
Aminoácido	mol/mol	Aminoácido	mol/mol
ASX	23,9 (24)	ASX	27,4 (27)
GLX	12,7 (13)	GLX	24,3 (24)
SER	22,8 (23)	SER	33
GLY	41,6 (42)	GLY	39,4 (39)
HIS	3,2 (3)	HIS	6,5 (6)
ARG	9,1 (9)	ARG	4,2 (4)
THR	23,7 (24)	THR	17,6 (18)
ALA	46,9 (47)	ALA	16,4 (16)
PRO	16,9 (17)	PRO	10,8 (11)
TYR	19,3 (19)	TYR	13,2 (13)
VAL	19,1 (19)	VAL	16,5 (17)
MET	4,8 (5)	MET	2,9 (3)
CYS	0,3 (1)	CYS	0
ILE	10,9 (11)	ILE	10,4 (10)
PHE	12,2 (12)	PHE	9,3 (9)
LYS	16,9 (17)	LYS	11,9 (12)
LEU	18,5 (19)	LEU	13,8 (14)
TRP	ND**	TRP	ND
HYDROXY LYS	ND	HYDROXY LYS	10,5 (10)
TOTAL	302,8 (304)	TOTAL	268,1 (268)

\* - de Graaf & Roorda (1982)

\*\* - Não Determinado





**Figura 6.** F42 digerido em solução com tripsina, injeção 3. Cromatograma em coluna Vydac  $C_{18}$  (2,5x250mm) com fluxo de 0,2ml/min, e gradiente crescente de acetonitrila (solvente B = 100% AcN e 0,09% TFA). Foram aplicados 20% de 112 $\mu$ g de proteína em solução. Absorbância 220nm (azul) e 280nm (vermelho). As setas indicam os picos selecionados para análise de aminoácidos.

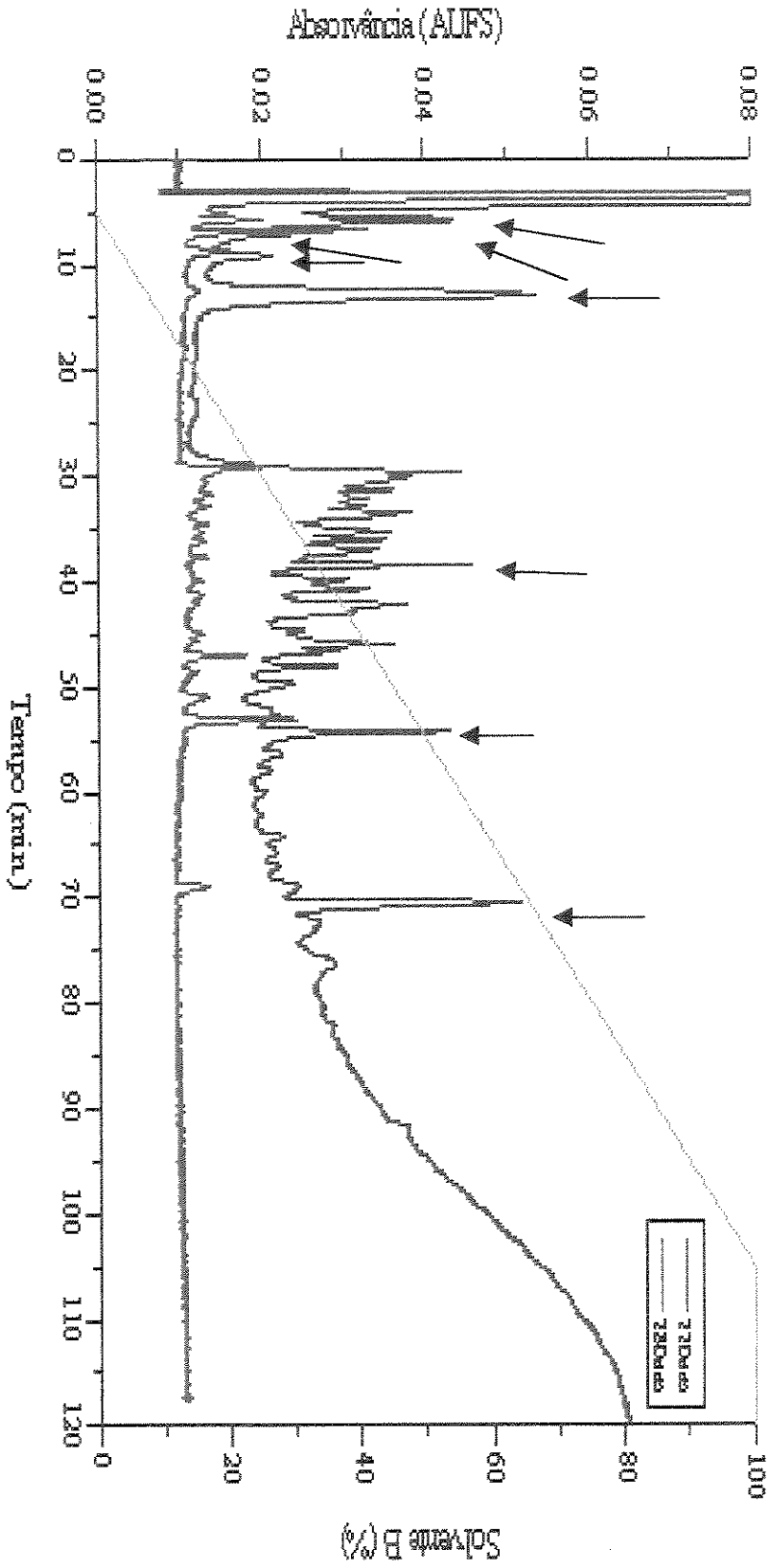
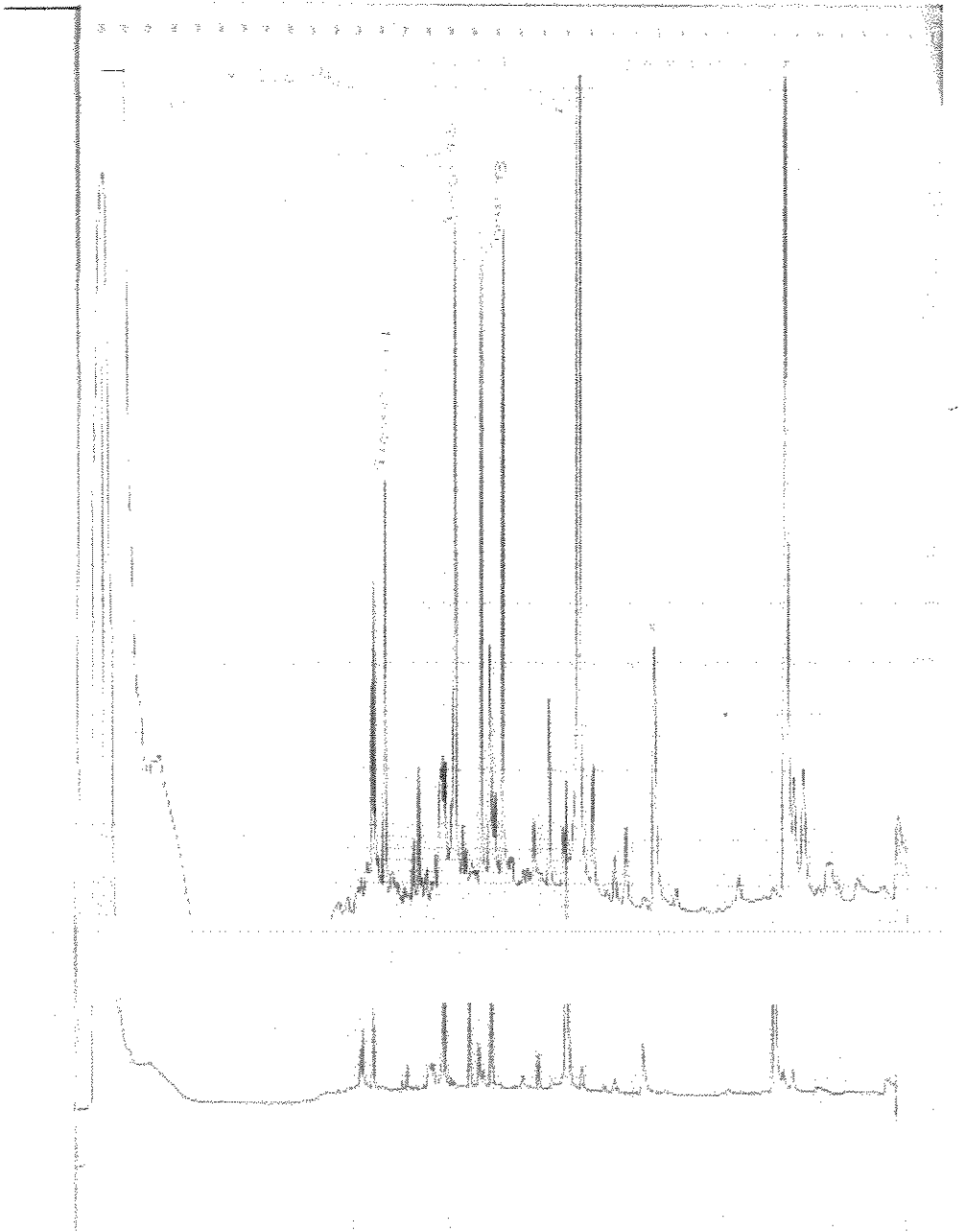


Figura 7. F42 digerido em solução com tripsina, injeção 5. Cromatograma em coluna Ydac C<sub>18</sub> (2,5x250mm) com fluxo de 0,2ml/min, e gradiente crescente de acetonitrila (solvente B = 100% AcN e 0,09% TFA). Foram aplicados 20% de 112µg de proteína em solução. Absorbância 220nm (azul) e 280nm (vermelho). As setas indicam os picos escolhidos para análise de aminoácidos.



**Figura 8.** F42 digerido “in situ” com tripsina. Cromatograma capilar em uma coluna  $C_{18}$  (0,5x150mm) com partículas de 300Å e 5 microns, fluxo de 5,0 $\mu$ L/min e gradiente crescente de acetonitrila. Os solventes utilizados são: solvente A – 0,1% TFA aquoso e, solvente B – 0,07% TFA em acetonitrila. Absorbância 220nm (azul) e 280nm (vermelho).

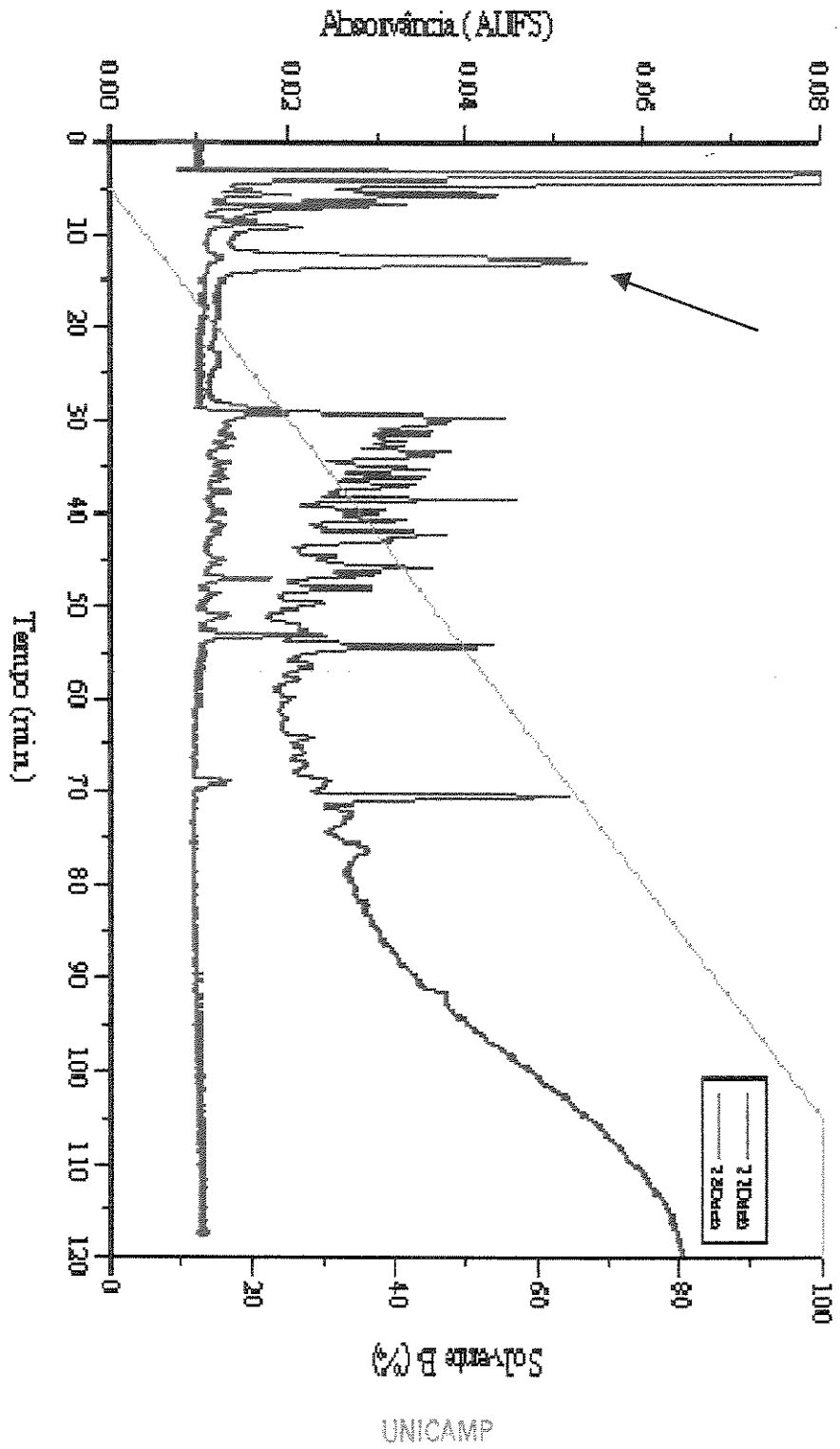


Figura 9. Digestão de 40 µg de proteína com Endo-Asp-N foi feita "in situ" e que resultou em 12 picos distinguíveis. O pico 3 (seta) foi selecionado para análise da composição de aminoácidos.

#### ***4.9. Digestão com Endoproteinase Asp-N***

A digestão de 40 µg de proteína com Endo-Asp-N foi feita “in situ” e resultou em 12 picos (Figura 9). O pico 3 foi selecionado para análise da composição de aminoácidos.

#### ***4.10. Determinação da composição de aminoácidos dos peptídeos***

Foram determinadas, também, as composições de aminoácidos dos picos 12 e 23 da injeção 3 (Tabelas III e IV) e dos picos 2, 3, 4, 5, 6, 16, 27 e 32 da injeção 5 (Tabelas V a XII), ambos da digestão com tripsina em solução; e do pico 3 da digestão com Endoproteinase-Asp-N (Tabela XIII).

#### ***4.11. Sequenciamento automático de proteína/peptídeo***

Foi feito o sequenciamento de aminoácidos da porção N-terminal da proteína nativa obtida através de SDS-PAGE e transferência para membrana de PVDF (blot), obtendo-se 32 resíduos (Tabela XIV).

Foi feito, também o sequenciamento de 4 peptídeos da digestão “in situ” com tripsina (P10400, P10900 – T1, P11000 – T2 e P11100 – T3). Os resultados estão nas Tabelas XV, XVI, XVII e XVIII, respectivamente. A seqüência de aminoácidos do pico 12 da injeção 3 da digestão com tripsina da fimbria em solução é apresentada na Tabela XIX.

Obteve-se, também, a seqüência de aminoácidos referente ao pico 3 da digestão com Endoproteinase-Asp-N, conforme é mostrado na Tabela XX.

**Tabela III:** Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 12 da injeção 3 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada										
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)
	PTC0180 0,033	PTC01800 .034								
Asp	408	316	34,55	26,76	30,65	3,53	1,98	7,53	18,0	5,5
Glu	450	383	38,89	33,10	36,00	4,65	2,32	8,84	11,4	4,1
Ser	518	458	44,50	39,35	41,92	3,65	2,71	10,29	8,7	3,6
Gly	848	789	71,80	66,81	69,31	3,95	4,47	17,01	5,1	3,5
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Arg	62	60	4,92	4,76	4,84	0,76	0,31	1,19	2,3	0,1
Thr	336	313	28,92	26,94	27,93	2,82	1,80	6,86	5,0	1,4
Ala	357	324	27,55	25,00	26,27	1,87	1,70	6,45	6,9	1,8
Pro	879	813	66,19	61,22	63,70	6,19	4,11	15,64	5,5	3,5
Tyr	142	130	9,65	8,83	9,24	1,51	0,60	2,27	6,2	0,6
Val	311	281	22,12	19,99	21,05	2,09	1,36	5,17	7,2	1,5
Met	46	40	3,11	2,71	2,91	0,38	0,19	0,71	9,9	0,3
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Ile	298	256	20,88	17,94	19,41	2,20	1,25	4,77	10,7	2,1
Leu	432	388	29,88	26,83	28,35	3,21	1,83	6,96	7,6	2,2
Phe	156	151	10,79	10,44	10,62	1,56	0,68	2,61	2,3	0,2
Lys	408	352	16,23	14,00	15,12	1,94	0,98	3,71	10,4	1,6
Somatória:			429,97	384,67	407,32	40,30	26,3	100,00		
Massa molecular=		2,6	kDa							
Vol. estoque=		0,100	ml							
Vol. hidrolisado=		0,033	ml		0,31 µg (estoque)					
Vol. diluição=		0,050	ml		3,05 µg / ml					
Vol. injeção=		0,020	ml		0,10 µg / hidrolisado					
					0,04 µg / aplicado					

Tabela IV: Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 23 da injeção 3 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada															
Área		pmol aplicado		Média		Massa (ng)		Nº de resíduos		mol%		Coef. Vari. (%)		Desvio Padrão (área)	
AA	PTC0180 0,035	PTC01800 .036													
Asp	57	64	4,83	5,42	5,12	0,59	1,52	3,49	8,2	0,4	Asp				
Glu	147	164	12,71	14,17	13,44	1,74	3,99	9,17	7,7	1,0	Glu				
Ser	151	170	12,97	14,60	13,79	1,20	4,09	9,40	8,4	1,2	Ser				
Gly	383	432	32,43	36,58	34,50	1,97	10,23	23,53	8,5	2,9	Gly				
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0	His				
Arg	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0	Arg				
Thr	72	79	6,20	6,80	6,50	0,66	1,93	4,43	6,6	0,4	Thr				
Ala	128	144	9,88	11,11	10,49	0,75	3,11	7,16	8,3	0,9	Ala				
Pro	544	609	40,96	45,86	43,41	4,22	12,87	29,61	8,0	3,5	Pro				
Tyr	33	37	2,24	2,51	2,38	0,39	0,71	1,62	8,1	0,2	Tyr				
Val	57	67	4,05	4,77	4,41	0,44	1,31	3,01	11,4	0,5	Val				
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0	Met				
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	Cys				
Ile	0	49	0,00	3,43	1,72	0,19	0,51	1,17	141,4	2,4	Ile				
Leu	68	79	4,70	5,46	5,08	0,58	1,51	3,47	10,6	0,5	Leu				
Phe	0	61	0,00	4,22	2,11	0,31	0,63	1,44	141,4	3,0	Phe				
Lys	83	101	3,30	4,02	3,66	0,47	1,09	2,50	13,8	0,5	Lys				
Somatória:		134,27	158,96	146,61	13,49	43,5	100,00								

Massa molecular=	4,0	kDa
Vol. estoque=	0,100	ml
Vol. hidrolisado=	0,033	ml
Vol. diluição=	0,050	ml
Vol. injeção=	0,020	ml
	0,10	µg (estoque)
	1,02	µg / ml
	0,03	µg / hidrolisado
	0,01	µg / aplicado

Tabela V: Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 2 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada											
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)	
	PTC0180 0,013	PTC01800 .014									
Asp	137	342	11,60	28,96	20,28	2,33	2,11	4,73	60,5	12,3	Asp
Glu	2087	3187	180,38	275,45	227,92	29,43	23,74	53,20	29,5	67,2	Glu
Ser	206	258	17,70	22,16	19,93	1,74	2,08	4,65	15,8	3,2	Ser
Gly	830	1002	70,28	84,84	77,56	4,43	8,08	18,11	13,3	10,3	Gly
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0	His
Arg	98	120	7,78	9,52	8,65	1,35	0,90	2,02	14,3	1,2	Arg
Thr	71	87	6,11	7,49	6,80	0,69	0,71	1,59	14,3	1,0	Thr
Ala	136	164	10,49	12,65	11,57	0,82	1,21	2,70	13,2	1,5	Ala
Pro	222	272	16,72	20,48	18,60	1,81	1,94	4,34	14,3	2,7	Pro
Tyr	38	41	2,58	2,79	2,68	0,44	0,28	0,63	5,4	0,1	Tyr
Val	107	140	7,61	9,96	8,78	0,87	0,92	2,05	18,9	1,7	Val
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0	Met
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	Cys
Ile	53	79	3,71	5,54	4,63	0,52	0,48	1,08	27,9	1,3	Ile
Leu	104	154	7,19	10,65	8,92	1,01	0,93	2,08	27,4	2,4	Leu
Phe	47	45	3,25	3,11	3,18	0,47	0,33	0,74	3,1	0,1	Phe
Lys	203	243	8,07	9,67	8,87	1,14	0,92	2,07	12,7	1,1	Lys
		Somatória:	353,48	503,27	428,38	47,04	44,6	100,00			
		Massa molecular=	4,9		KDa						
		Vol. estoque=	0,1		ml			0,36	µg (estoque)		
		Vol. hidrolisado=	0,033		ml			3,56	µg / mL		
		Vol. diluição=	0,050		ml			0,12	µg / hidrolisado		
		Vol. injeção=	0,020		ml			0,05	µg / aplicado		



Tabela VI: Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 3 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada										
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)
	PTC0180 0,015	PTC01800 .016								
Asp	198	245	16,77	20,75	18,76	2,16	1,13	3,72	15,0	2,8
Glu	1415	1427	122,30	123,34	122,82	15,86	7,38	24,34	0,6	0,7
Ser	353	365	30,33	31,36	30,84	2,69	1,85	6,11	2,4	0,7
Gly	973	1000	82,39	84,67	83,53	4,77	5,02	16,55	1,9	1,6
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Arg	126	130	10,00	10,32	10,16	1,59	0,61	2,01	2,2	0,2
Thr	105	114	9,04	9,81	9,42	0,95	0,57	1,87	5,8	0,5
Ala	205	216	15,82	16,67	16,24	1,15	0,98	3,22	3,7	0,6
Pro	166	186	12,50	14,01	13,25	1,29	0,80	2,63	8,0	1,1
Tyr	46	52	3,13	3,53	3,33	0,54	0,20	0,66	8,7	0,3
Val	2153	2175	153,13	154,69	153,91	15,26	9,25	30,50	0,7	1,1
Met	166	163	11,23	11,03	11,13	1,46	0,67	2,21	1,3	0,1
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Ile	59	59	4,13	4,13	4,13	0,47	0,25	0,82	0,0	0,0
Leu	120	132	8,30	9,13	8,71	0,99	0,52	1,73	6,7	0,6
Phe	51	43	3,53	2,97	3,25	0,48	0,20	0,64	12,0	0,4
Lys	363	395	14,44	15,71	15,08	1,93	0,91	2,99	6,0	0,9
		Somatória:	497,02	512,12	504,57	51,57	30,3	100,00		
		Massa molecular=	3,1							
		Vol. estoque=	0,1		0,39 µg (estoque)					
		Vol. hidrolisado=	0,033		3,91 µg / mL					
		Vol. diluição=	0,050		0,13 µg / hidrolisado					
		Vol. injeção=	0,020		0,05 µg / aplicado					

**Tabela VII:** Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 4 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada										
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)
	PTC0180 0.017	PTC01800 .018								
Asp	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	Asp
Glu	232	404	20,05	34,92	27,48	3,55	2,07	15,72	38,2	Glu
Ser	113	121	9,71	10,40	10,05	0,88	0,76	5,75	4,8	Ser
Gly	758	804	64,18	68,08	66,13	3,77	4,98	37,82	4,2	Gly
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	His
Arg	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	Arg
Thr	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	Thr
Ala	145	155	11,19	11,96	11,57	0,82	0,87	6,62	4,7	Ala
Pro	280	333	21,08	25,08	23,08	2,24	1,74	13,20	12,2	Pro
Tyr	113	111	7,68	7,54	7,61	1,24	0,57	4,35	1,3	Tyr
Val	92	94	6,54	6,69	6,61	0,66	0,50	3,78	1,5	Val
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	Met
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	Cys
Ile	33	37	2,31	2,59	2,45	0,28	0,18	1,40	8,1	Ile
Leu	77	79	5,33	5,46	5,39	0,61	0,41	3,09	1,8	Leu
Phe	29	30	2,01	2,07	2,04	0,30	0,15	1,17	2,4	Phe
Lys	314	310	12,49	12,33	12,41	1,59	0,93	7,10	0,9	Lys
	Somatória:		162,57	187,11	174,84	15,94	13,2	100,00		
	Massa molecular=	1,2	KDa							
	Vol. estoque=	0,1	ml		0,12	µg (estoque)				
	Vol. hidrolisado=	0,033	ml		1,21	µg / mL				
	Vol. diluição=	0,050	ml		0,04	µg / hidrolisado				
	Vol. injeção=	0,020	ml		0,02	µg / aplicado				

Tabela VIII: Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 5 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada										
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)
	PTC0180 0,022	PTC01800 .023								
Asp	0	76	0,00	6,44	6,44	0,74	1,06	8,32	70,7	4,6
Glu	124	145	10,72	12,53	11,62	1,50	1,91	15,02	11,0	1,3
Ser	101	118	8,68	10,14	9,41	0,82	1,54	12,16	11,0	1,0
Gly	201	211	17,02	17,87	17,44	1,00	2,86	22,54	3,4	0,6
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Arg	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Thr	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Ala	61	71	4,71	5,48	5,09	0,36	0,84	6,58	10,7	0,5
Pro	219	240	16,49	18,07	17,28	1,68	2,84	22,33	6,5	1,1
Tyr	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Val	40	41	2,84	2,92	2,88	0,29	0,47	3,72	1,7	0,1
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Ile	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Leu	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Phe	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0
Lys	176	187	7,00	7,44	7,22	0,93	1,19	9,33	4,3	0,3
	Somatória:		67,46	80,88	77,38	7,31	12,7	100,00		
	Massa molecular=	1,20	kDa							
	Vol. estoque=	0,1	ml		0,06 µg (estoque)					
	Vol. hidrolisado=	0,033	ml		0,55 µg / mL					
	Vol. diluição=	0,050	ml		0,02 µg / hidrolisado					
	Vol. injeção=	0,020	ml		0,01 µg / aplicado					

Tabela IX: Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 6 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada										
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)
	PTC0180 0,024	PTC01800 .025								
Asp	88	100	7,45	8,47	7,96	0,92	0,23	0,48	9,0	0,7
Glu	6579	6935	568,63	599,39	584,01	75,41	16,62	35,09	3,7	21,8
Ser	168	178	14,43	15,29	14,86	1,29	0,42	0,89	4,1	0,6
Gly	8195	8951	693,90	757,92	725,91	41,41	20,65	43,62	6,2	45,3
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
Arg	44	54	3,49	4,29	3,89	0,61	0,11	0,23	14,4	0,6
Thr	54	59	4,65	5,08	4,86	0,49	0,14	0,29	6,3	0,3
Ala	114	110	8,80	8,49	8,64	0,61	0,25	0,52	2,5	0,2
Pro	143	164	10,77	12,35	11,56	1,12	0,33	0,69	9,7	1,1
Tyr	197	199	13,38	13,52	13,45	2,19	0,38	0,81	0,7	0,1
Val	67	63	4,77	4,48	4,62	0,46	0,13	0,28	4,4	0,2
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0
Cys	2274	2635	201,60	233,60	217,60	22,44	6,19	13,08	0,0	22,6
Ile	125	85	8,76	5,96	7,36	0,83	0,21	0,44	26,9	2,0
Leu	802	725	55,46	50,14	52,80	5,97	1,50	3,17	7,1	3,8
Phe	0	55	0,00	3,80	1,90	0,28	0,05	0,11	141,4	2,7
Lys	117	122	4,65	4,85	4,75	0,61	0,14	0,29	3,0	0,1
	Somatória:		1600,74	1727,62	1664,18	154,65	47,3	100,00		
	Massa molecular=	4,4	kDa							
	Vol. estoque=	0,1	ml	1,17	µg (estoque)					
	Vol. hidrolisado=	0,033	ml	11,72	µg / ml					
	Vol. diluição=	0,050	ml	0,39	µg / hidrolisado					
	Vol. injeção=	0,020	ml	0,15	µg / aplicado					

Tabela X: Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 16 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada											
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)	
	PTC0180 0,028	PTC01800 .029									
Asp	514	478	43,52	40,47	42,00	4,83	1,75	6,31	5,1	2,2	Asp
Glu	834	844	72,08	72,95	72,52	9,36	3,01	10,89	0,8	0,6	Glu
Ser	877	865	75,34	74,31	74,83	6,52	3,11	11,24	1,0	0,7	Ser
Gly	1725	1751	146,06	148,26	147,16	8,40	6,11	22,11	1,1	1,6	Gly
His	80	86	7,46	8,02	7,74	1,06	0,32	1,16	5,1	0,4	His
Arg	200	207	15,87	16,43	16,15	2,52	0,67	2,43	2,4	0,4	Arg
Thr	257	260	22,12	22,38	22,25	2,25	0,92	3,34	0,8	0,2	Thr
Ala	488	494	37,65	38,12	37,89	2,69	1,57	5,69	0,9	0,3	Ala
Pro	1472	1412	110,84	106,33	108,58	10,55	4,51	16,31	2,9	3,2	Pro
Tyr	212	228	14,40	15,49	14,95	2,44	0,62	2,25	5,1	0,8	Tyr
Val	316	316	22,48	22,48	22,48	2,23	0,93	3,38	0,0	0,0	Val
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	Met
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	Cys
Ile	343	320	24,04	22,42	23,23	2,63	0,97	3,49	4,9	1,1	Ile
Leu	537	535	37,14	37,00	37,07	4,19	1,54	5,57	0,3	0,1	Leu
Phe	229	265	15,84	18,33	17,08	2,51	0,71	2,57	10,3	1,8	Phe
Lys	555	541	22,08	21,52	21,80	2,79	0,91	3,27	1,8	0,4	Lys
		Somatória:	666,93	664,50	665,71	64,98	27,7	100,00			
		Massa molecular=	2,70								
		Vol. estoque=	0,1		0,49 µg (estoque)						
		Vol. hidroliado=	0,03		4,92 µg / ml						
		Vol. diluição=	0,050		0,16 µg / hidroliado						
		Vol. injeção=	0,020		0,06 µg / aplicado						

Tabela XI: Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 27 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada											
	Area		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)	
	PTC0180 0,026	PTC01800 .027									
AA											
Asp	81	92	6,86	7,79	7,32	0,84	1,19	3,08	9,0	0,7	Asp
Glu	126	132	10,89	11,41	11,15	1,44	1,81	4,69	3,3	0,4	Glu
Ser	132	126	11,34	10,82	11,08	0,97	1,80	4,66	3,3	0,4	Ser
Gly	254	257	21,51	21,76	21,63	1,23	3,52	9,10	0,8	0,2	Gly
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	His
Arg	51	50	4,05	3,97	4,01	0,63	0,65	1,69	1,4	0,1	Arg
Thr	34	32	2,93	2,75	2,84	0,29	0,46	1,19	4,3	0,1	Thr
Ala	87	77	6,71	5,94	6,33	0,45	1,03	2,66	8,6	0,5	Ala
Pro	1661	1759	125,08	132,45	128,77	12,51	20,95	54,17	4,1	5,2	Pro
Tyr	225	275	15,29	18,68	16,98	2,77	2,76	7,14	14,1	2,4	Tyr
Val	64	75	4,55	5,33	4,94	0,49	0,80	2,08	11,2	0,6	Val
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	Met
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	Cys
Ile	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	Ile
Leu	100	103	6,92	7,12	7,02	0,79	1,14	2,95	2,1	0,1	Leu
Phe	134	135	9,27	9,34	9,30	1,37	1,51	3,91	0,5	0,0	Phe
Lys	164	154	6,52	6,13	6,32	0,81	1,03	2,66	4,4	0,3	Lys
		Somatória:	231,90	243,50	237,70	24,59	38,7	100,00			
Massa molecular=	4,0		kDa								
Vol. estoque=	0,100		ml	0,19	µg (estoque)						
Vol. hidrolisado=	0,033		ml	1,86	µg / ml						
Vol. diluição=	0,050		ml	0,06	µg / hidrolisado						
Vol. injeção=	0,020		ml	0,02	µg / aplicado						

**Tabela XII:** Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 32 da injeção 5 da digestão de F42 com tripsina em solução.

Cálculo da massa aplicada											
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)	
	PTC0180 0,031	PTC01800 .032									
Asp	136	190	11,52	16,09	13,80	1,59	3,05	9,28	23,4	3,2	
Glu	184	202	15,90	17,46	16,68	2,15	3,68	11,21	6,6	1,1	
Ser	230	247	19,76	21,22	20,49	1,78	4,52	13,77	5,0	1,0	
Gly	301	323	25,49	27,35	26,42	1,51	5,83	17,76	5,0	1,3	
His	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0	
Arg	36	44	2,86	3,49	3,17	0,50	0,70	2,13	14,1	0,4	
Thr	72	76	6,20	6,54	6,37	0,64	1,41	4,28	3,8	0,2	
Ala	159	175	12,27	13,50	12,89	0,92	2,84	8,66	6,8	0,9	
Pro	258	279	19,43	21,01	20,22	1,96	4,46	13,59	5,5	1,1	
Tyr	51	53	3,46	3,60	3,53	0,58	0,78	2,37	2,7	0,1	
Val	158	138	11,24	9,82	10,53	1,04	2,32	7,07	9,6	1,0	
Met	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,0	
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0	
Ile	32	35	2,24	2,45	2,35	0,27	0,52	1,58	6,3	0,1	
Leu	71	75	4,91	5,19	5,05	0,57	1,11	3,39	3,9	0,2	
Phe	44	45	3,04	3,11	3,08	0,45	0,68	2,07	1,6	0,0	
Lys	117	95	4,65	3,78	4,22	0,54	0,93	2,83	14,7	0,6	
		Somatória:	142,97	154,61	148,79	14,50	32,8	100,00			
		Massa molecular= Vol. estoque= Vol. hidrolisado= Vol. diluição= Vol. injeção=		3,2 0,100 0,033 0,050 0,020	kDa ml ml ml ml				0,11 1,10 0,04 0,01	µg (estoque) µg / mL µg / hidrolisado µg / aplicado	

**Tabela XIII:** Resultados da análise e composição de aminoácidos do pico 3 da digestão de F42 com Endoproteinase Asp-N “in situ”.

Cálculo da massa aplicada										
AA	Área		pmol aplicado	pmol aplicado	Média	Massa (ng)	Nº de resíduos	mol%	Coef. Vari. (%)	Desvio Padrão (área)
	PTC0170 0,019	PTC01700 .021								
Asp	284	154	24,05	13,04	18,54	2,13	0,94	4,45	42,0	7,8
Glu	608	625	52,55	54,02	53,28	6,88	2,71	12,78	1,9	1,0
Ser	598	608	51,37	52,23	51,80	4,51	2,63	12,42	1,2	0,6
Gly	1095	1089	92,72	92,21	92,46	5,28	4,69	22,17	0,4	0,4
His	58	59	5,41	5,50	5,46	0,75	0,28	1,31	1,2	0,1
Arg	140	145	11,11	11,51	11,31	1,77	0,57	2,71	2,5	0,3
Thr	215	222	18,50	19,10	18,80	1,90	0,95	4,51	2,3	0,4
Ala	421	444	32,48	34,26	33,37	2,37	1,69	8,00	3,8	1,3
Pro	294	304	22,14	22,89	22,52	2,19	1,14	5,40	2,4	0,5
Tyr	122	130	8,29	8,83	8,56	1,40	0,43	2,05	4,5	0,4
Val	239	248	17,00	17,64	17,32	1,72	0,88	4,15	2,6	0,5
Met	241	246	16,31	16,64	16,47	2,16	0,84	3,95	1,5	0,2
Cys	0	0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,0	0,0
Ile	210	222	14,72	15,56	15,14	1,71	0,77	3,63	3,9	0,6
Leu	425	428	29,39	29,60	29,50	3,34	1,50	7,07	0,5	0,1
Phe	141	144	9,75	9,96	9,85	1,45	0,50	2,36	1,5	0,1
Lys	311	322	12,37	12,81	12,59	1,61	0,64	3,02	2,5	0,3
		Somatória:	418,16	415,81	416,98	41,16	21,2	100,00		
		Massa molecular=	2,1	KDa						
		Vol. estoque=	0,125	ml	0,51	µg (estoque)				
		Vol. hidrolisado=	0,025	ml	4,12	µg / ml				
		Vol. diluição=	0,050	ml	0,10	µg / hidrolisado				
		Vol. injeção=	0,020	ml	0,04	µg / aplicado				



Tabela XIV. Seqüenciamento da porção N-terminal da proteína F42 transferida para membrana de PVDF.

ciclo	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Matriz	Memor
1	42,59	4,42	1,95	2,62	7,11	1,48	2,94	2,99	3,75	1,44	3,77	1,36	3,11	2,05	3,32	2,53	3,84	1,56	2,51	A	1
2	5,52	51,86	3,85	3,1	5,94	0,41	3,58	2,66	5,33	0,56	3,23	2,12	2,6	0,97	1,78	3,49	5,27	1,39	3,58	D	2
3	4,56	6,91	2,41	4,15	7,08	0,28	4,43	2,9	4,03	0,31	3,35	2,69	2,64	0,001	2,35	2,46	5,02	27,1	3,56	W	3
4	4,98	5,61	2,7	4,4	6,99	0,001	3,07	2,83	4,34	0,75	4,02	2,86	2,53	1,98	2,06	24,83	5,28	2,13	4,48	T	4
5	5,24	4,54	24,97	4,41	7,65	0,41	3,89	3,49	4,05	0,94	4,9	3,17	2,47	0,54	2,29	4,6	5,07	1,37	3,37	E	5
6	5,58	5,22	4,87	5,2	30,09	0,53	3,52	4,24	5,92	0,67	5,02	2,83	2,67	1,17	2,16	3,13	5,85	1,62	3,52	G	6
7	5,21	6,21	5,8	5,8	9,65	0,001	3,69	3,81	5,44	0,72	4,86	2,37	2,812	0,9	2,55	0,001	6,02	1,7	2,99	Q	7
8	5,76	6,38	2,75	5,42	8,38	0,001	3,83	4,63	5,24	1,1	6,18	21,35	5,67	1,89	2,05	3,61	5,71	1,86	3,49	P	8
9	6,26	6,63	2,4	4,38	26,68	0,41	4,08	4,87	6,02	0,69	5,65	5,21	3,1	1,52	1,89	2,9	5,62	1,85	3,08	G	9
10	6,41	30,31	2,44	4,63	11,07	0,001	3,99	5,51	5,89	0,94	5,23	2,75	2,5	0,82	2,3	3,27	6,8	1,83	2,96	D	10
11	6,87	10,08	2,42	4,66	8,71	0,63	23,4	4,83	6,24	1,07	5,22	2,42	2,83	1,09	2,2	3,43	6,72	1,86	3,18	I	11
12	6,37	8,11	2,52	5,36	9,25	0,4	25,73	5,29	6,47	1,12	4,75	2,57	3,07	0,61	2,19	4,05	6,83	2,18	3,14	I	12
13	6,47	7,11	2,6	4,65	9,16	0,71	25	5,07	6,9	1,25	4,94	2,39	2,99	1,16	2,34	3,82	6,29	2,08	2,96	I	13
14	6,86	7,23	2,88	5,02	22,17	0,8	8,44	5,17	6,9	1,26	5,11	2,48	3,71	0,89	2,39	3,9	6,42	2,2	3,52	G	14
15	6,52	6,58	2,79	4,93	23,73	0,32	5,84	4,89	6,55	1,4	5,26	2,56	4,17	0,7	2,33	4,48	6,49	2,18	3,15	G	15
16	6,67	6,56	12,48	5,4	11,78	0,001	5,27	5,38	6,7	1,37	5,33	2,58	4,17	1,09	2,69	4,84	6,71	2,42	3,39	E	16
17	6,58	6,37	4,63	5,19	9,37	0,42	17,73	5,16	6,71	1,61	5,31	2,45	3,51	1,13	2,71	4,4	7,2	2,18	3,4	I	17
18	6,9	6,25	3,12	4,85	8,95	0,42	7,22	4,97	6,66	1,74	5,54	2,39	4,47	2,19	2,47	10,96	6,51	1,44	3,56	T	18
19	7,16	6,19	2,9	5	9,24	0,6	5,38	4,83	7	1,63	5,62	2,69	2,94	1,24	4,19	5,47	6,93	1,61	3,91	S	19
20	6,82	6,15	2,84	5,3	9,09	0,001	5,21	5,52	7,12	1,58	5,46	7,24	2,67	1,51	2,79	4,4	6,91	1,51	3,28	P	20
21	6,83	6,04	2,68	5,39	8,84	0,28	5,01	5,14	7,21	1,49	5,57	4,66	2,71	1,36	3,69	4,54	6,96	1,7	3,39	S	21
22	6,73	6,03	2,64	5,43	9,03	0,38	4,91	5,35	6,72	1,34	5,74	3,53	3,05	1,11	3,03	4,68	9,56	1,75	3,45	V	22
23	6,66	5,98	2,68	5,61	9,12	0,31	4,96	8,3	6,9	1,33	5,64	3,04	3	1,3	2,6	4,41	8,72	1,86	3,47	K	23
24	6,37	5,58	2,59	5,14	8,48	0,44	4,64	6,85	6,49	1,3	5,31	2,74	2,77	0,71	2,5	4,15	7,67	2,26	3,12	W	24
25	6,63	5,86	2,72	5,22	8,81	0,37	4,84	6,57	8,75	1,58	5,75	2,56	2,95	0,75	2,35	4,04	7,59	2,08	3,32	L	25
26	6,61	5,93	2,66	5,05	8,66	0,31	4,78	6,03	8,15		5,63	2,72	2,73	1,42	2,42	4,05	7,23	2,7	3,31	W	26
27	6,51	5,72	2,58	4,94	8,35	0,25	5,03	7,66	7,83	1,82	5,52	2,56	2,65	1,32	2,22	3,96	7,27	2,42	3,34	K	27
28	6,7	5,91	2,57	4,97	8,54	0,63	4,91	7,08	7,44	1,52	5,57	2,56	3,02	0,89	2,39	5,22	7,18	2,05	3,12	T	28
29	6,42	5,87	2,49	5,01	9,19	0,001	4,93	6,49	7,09	1,45	5,5	2,55	2,73	1,19	2,24	4,79	7,07	2,29	3,28	G	29
30	6,58	5,88	3,18	4,86	9,21	0,45	4,73	6,14	6,82	1,49	5,43	2,49	2,8	1,43	2,18	4,47	6,78	2,16	3,36	E	30
31	6,44	5,7	3,03	4,99	9,47	0,32	4,83	5,75	6,87	1,32	5,29	2,44	2,79	0,72	2,22	4,34	6,66	2,03	3,11	R	31
32	6,28	5,57	2,82	4,82	9,14	0,001	4,55	5,48	7,48	1,4	5,19	2,41	2,67	0,63	2,08	4,04	6,5	1,89	3,12	G	32

Tabela XV. Seqüência do peptídeo P10400 da digestão "in situ" da fimbria F42 (4,8µg) com tripsina. Os peptídeos foram coletados em PVDF e aplicados no sequenciador automático Procise.

ciclo	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Matriz	Menor
1	0,91	0,56	0,52	0,41	2,59	0,2	0,4	0,3	1,63	0,14	0,29	0,45	0,5	1,23	0,52	0,52	0,14	0,32	G	L/S	1
2	1,26	0,41	0,36	0,36	2,53	0,11	0,21	0,07	0,5	0,16	0,22	0,46	0,56	0,15	0,28	0,12	0,56	0,13	A	G	2
3	0,39	0,33	1,25	0,65	1,24		0,14		0,32	0,2	0,34	0,37	0,45	0,3	0,09	0,21		0,24	E	F/N/Y	3
4	0,38	0,93	0,6	0,32	1,39		0,26		0,41	0,2	0,31	0,59	0,52	0,19	0,17	0,42	0,55		D	T/V	4
5	0,31	0,48	0,39	0,33	1,25	0,09	0,19	0,05	0,62	0,16	1,01	0,38	0,48	0,25	0,13	0,4	0,03	0,14	N	L/S	5
6	0,32	0,42	0,45	0,34	1,19	0,12	1,2	0,08	0,39	0,14	0,81	0,45	0,81	0,36	0,36	0,14	0,32		I	Y/Q	6
7	0,33	0,39	0,33	0,38	0,99		0,4	0,1	0,32	0,14	1,25	0,54	0,73	0,46	0,35	0,24	0,25	0,32	N	T	7
8	0,26	0,24	0,31	0,62	1,34		0,27	0,11	0,48	0,14	0,44	0,44	0,78	0,71	0,17	0,9		0,19	V	R/G/F	8
9	0,29	0,16	0,24	0,19	1,04		0,09	0,23		1,77	0,3	0,37	1,84	0,12	0,23		0,16	1,17	M/W	Q	9
10	0,29	0,84	0,72	0,12	0,85	0,17		0,22		0,52	0,5	0,56	0,87		0,18		0,57	0,14	D	E/N/P	10
11	0,24	0,17	0,31	0,41	1,23		0,13		0,18	0,11	0,63	0,36	0,66	0,33	0,1	0,16	0,21	0,03	G	F/N	11
12	0,26	0,29	0,22	0,41	0,97	0,08	0,13	0,1	0,18		1,33	0,36	0,9	0,4	0,31	0,15	0,25		N	Q	12
13	0,26	0,41	0,56	0,37	0,79	0,06	0,12	0,04	0,2	0,21	0,57	0,33	1,08	0,56		0,14	0,16		E	D/Q/R	13
14	0,26	0,43	0,43	0,35	0,72	0,07		0,06	0,22	0,26	0,34	0,25	1,39	0,65	0,11	0,07	0,11		Q	R/D	14
15	0,25	0,26	0,27	0,1	0,78			0,37	0,22	0,34	0,32	0,2	1,2				0,71		W	M/K	15

Ost: Quantidade expressa em pmol

Tabela XVI. Sequência do peptídeo P10900 – T1 da digestão “in situ” da fimbria F42 (100pmoles) com tripsina. Os peptídeos foram coletados em PVDF e aplicados no sequenciador automático Procise.

Ciclo	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Major	Menor	
1	5,68	1,83	1,36	6,72	8,44	0,77	1,26	1,34	1,71	0,38	1,14	0,92	1,43	0,4	8,95	2,86	1,77	0,28	1,07	F	A/G/S	1
2	1,38	1,94	1,34	1,22	8,3	0,35	0,74	0,88	1,9	0,38	1,63	0,96	1,91	1,32	2,43	3,83	1,15	0,06	0,73	T	L	2
3					0,07				0,11	0,11		0,06		0,3	4,22	0,09	0,09	0,06		X		3
4				0,08								0,07			3,94	0,12		0,06		X		4
5	0,91	1,25	1,03	1,03	4,38		0,68	1,04	1,92	0,4	4,64	0,68		1,03	0,97	0,43	0,84		0,52	N	G	5
6		0,94	0,89	1,03	4,26		4,93	0,91	1,05		1,61	0,71	1,56	0,59	0,92	0,39	0,72		0,93	I		6
7							0,08		0,05			0,1	0,08	0,3	4,26					X		7
8		0,04	0,2	0,04					0,1	0,29		0,12		0,26	4,14					X		8
9						0,21			0,07	0,17		0,09			4,18	0,13			0,08	X		9
10	0,8	0,8	0,83	1,79	4,76	0,25	1,23	1,75	1,19		1,09	0,86	1,82	0,41	0,66	0,37	0,75	1,46	0,7	K	G	10

Obs.: Quantidade expressa em pmol

Tabela XVII. Sequência do peptídeo P11000 – T2 da digestão “in situ” da fimbria F42 (100pmoles) com tripsina. Os peptídeos foram coletados em PVDF e aplicados no sequenciador automático Procise.

Ciclo	Quantidade expressa em pmol																				Melhor		Menor	
	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y					
1	13,37	2,58	2,16	1,66	13		2,17	1,89	3,78	0,61	2,15	1,07	2,33	1,19	15,42	5,52	3,24	0,48	1,75	S	A/G	1	1	
2	4,43	1,46	1,21	0,93	8,09		0,63	0,62	1,75		0,56	0,79	1,15		1,53	0,52	2,42		0,38	V	G	2	2	
3	1,21	1,25	3,05	2,6	4,62	0,33	0,63	0,66	1,01	0,48	0,83	0,78	1,21	0,45	1,45	0,31	0,84		0,77	E	F	3	3	
4	1,37	1,54	1,19	1,06	5,93		0,92	1,1	1,26	0,26	0,77	0,87	1,35	0,72	0,74	1,71	2,44		0,68	V	T	4	4	
5	1,14	1,39	1,18	1,56	6,82		1,04	1,08	4,48	3,04	1,99	1,02	1,69	0,54	1,58	0,69			0,7	L	N/S	5	5	
6	1,06	1,19	0,99	1,34	4,48	0,44	1,79	0,77	1,49	0,38	2,45	1,01	1,47	0,27	1,42	0,56	1,07		2,93	Y	N	6	6	
7	1,01	1,24	0,94	1,22	4,26		1,06	0,75	1,3	0,37	1,98	0,95	1,5	1,03	1,74	1,11	0,9		1,41	S	T/R	7	7	
8	0,9	0,93	0,87	2,89	5,96	0,22	0,75	0,62	2,25		1,13	0,94	1,51	0,55	0,93	0,55	1,76		0,97	G	F/L	8	8	
9	0,91	0,91	0,81	3,13	4,84		1,51	0,66	1,09		0,98	1	1,49	0,6	1,18	0,42	1,65		0,86	I	F	9	9	

Obs.: Quantidade expressa em pmol

Tabela XVIII. Sequência do peptídeo P11100 – T3 da digestão “in situ” da fimbria F42 (100pmoles) com tripsina. Os peptídeos foram coletados em PVDF e aplicados no sequenciador automático Procise.

Ciclo	Quantidade expressa em pmol																				Maior	Menor	
	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y				
1	22,92	3,11	5,13	1,4	13,35	0,62	2,7	1,79	2,65	0,34	2,45	1,05	5,31	0,94	18,33	4,74	3,72		1,84	A	G/S	1	
2	2,19	5,68	2,34	0,99	7,03		1,69	0,78	1,48		0,8	1,23	1,59	0,22	1,61	0,52	1,34		0,79	D	L	2	
3	0,86	2,38	0,97	1,23	4,95		0,93	0,51	0,91	0,46	0,88	0,77	1,23	0,37	0,78	0,34	1,45		1,3	F	M	3	
4	1,54	1,65	0,91	1	4,67		1,16	0,52	1,73	0,31	0,79	1,38	1,62	0,59		2,63	1,26		0,66	T	M/L/P/Q	4	
5	0,85	1,13	3,46	1,02	4,87		0,37	0,45	1,04	1,04	1,02	1,6	1,59	0,27	0,93	0,49	1,14		0,62	E	P	5	
6	0,83	1,38	1,46	1,11	8,14		0,71	0,58	1,22	0,42	1,02	1,04	2,09	0,39	0,85	0,49	1,06		1,4	G	Y/Q	6	
7	0,6	1,15	1,3	0,87	3,87		1,11	0,46	0,91		0,75	0,88	4,05		0,6	0,46	0,76		0,98	Q	I	7	
8	0,86	1,24	1,02	1	5,15		0,81	0,57	1,39		1,2	4,33	2,34	0,52	0,71	0,76	0,87		0,86	P	G/L/N	8	
9	0,87	0,98	0,83	1,13	8,11		0,98	0,49	1,05		0,9	1,51	2,02	0,48	0,9	0,4	0,94		0,66	G	I/F	9	
10	0,7	3,68	0,81	1,87	4,55		1,43	0,94	1,26	0,31	1,26	1,14	2,15	0,36	0,59	0,38	1,13		0,6	D	N	10	
11	0,79	1,45	0,74	0,97	3,77		4,34	0,66	1,03	0,38	0,9	0,78	1,96	0,3	0,56	0,36	0,78		0,58	I		11	
12	0,72	0,89	0,71	2,12	3,71		5,13	1,05	1,42		0,77	0,87	2,01		0,48	0,45	0,79		0,52	I		12	

Obs.: Quantidade expressa em pmol

Tabela XIX. Sequência do peptídeo pico-12 inj-3 da digestão em solução da F42 com tripsina, após HPLC narrow bore e aplicados no sequenciador automático Procise.

ciclo	Quantidade expressa em pmol																				Maior		Menor
	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	S/L/A	G		
1	729	566	358	268	874	178	378	224	664	204	371	116	312	227	641	245	449	145	294	Q	G		
2	409	553	221	370	725	042	264	116	378	113	359	166	503	166	171	142	399		220	Q	F/P		
3	308	426	148	255	822	031	241	095	259	133	213	174	242	141	133	115	295		265	G	H/A		
4	404	404	181	218	601	132	450	101	302	039	202	176	274	125	097	105	226		226	I	H/A		
5	338	392	133	287	635	079	225	105	289	063	210	155	264	109	121	103	440		189	V			
*6	289	465	132	218	541	034	192	104	255	086	470	132	509	150	418	224	239		238	Q	R		
7	243	330	115	159	501	032	169	084	283	019	163	156	224	132	110	099	215		188	L			
8	244	369	142	189	582	024	170	097	241	025	159	129	225	127	090	121	192	103	171	G			

Tabela XX. Seqüência do peptídeo pico 3 da digestão "in situ" da fimbria F42 (100pmoles) com Endo-Asp-N. Os peptídeos foram coletados em PVDF e aplicados no sequenciador automático Procise.

ciclo	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	Matr	Menor
1	17,87	17,30	4,53	5,37	26,89	2,72	3,88	6,35	4,97	1,06	4,45	2,20	5,39	2,47	34,02	10,41	9,69	3,02	5,43	S	D/A/G
2	4,13	12,32	2,53	3,89	13,34	0,05	2,88	2,68	3,13	0,06	4,59	3,70	3,26	1,72	2,85	1,62	4,02	2,32	2,93	P	
3	3,28	7,47	1,84	3,21	11,66		2,30	2,13	2,72	0,67	8,07	2,44	2,96	1,78	1,70	1,87	3,91	2,31	2,64	N	M
4	3,60	7,10	1,47	2,71	7,99	0,06	2,17	5,23	3,00	0,22	4,99	1,94	2,01	1,33	0,88	1,61	3,06	1,54	2,09	K	L
5	3,84	5,49	1,48	1,73	6,79	0,35	4,95	4,27	6,63	0,18	3,39	1,74	2,68	1,47	0,49	1,87	3,45	0,97	1,75	L	I/Q
6	3,37	7,45	1,23	2,69	5,08		5,86	3,14	5,39	1,45	2,51	1,52	4,63	0,76	0,63	1,73	3,65		1,21	Q	M/I
7	3,37	5,16	1,36	3,28	4,76		5,82	2,21	7,65		2,42	1,48	2,42	1,32	0,59	1,15	3,35		1,65	L	F/R/Y
8	3,50	6,46	1,11	3,46	6,09	0,62	3,32	2,08	5,56	0,19	2,34	1,21	2,35	1,19	0,82	1,38	2,83	1,26	3,76	Y	G/H/W
9	3,10	4,54	1,22	2,42	8,69	0,10	1,93	2,00	4,05	0,35	2,13	1,17	2,72	0,88	0,76	1,56	2,70	1,07	3,03	G	E/G/R/N/Q/V
10	3,39	2,20	2,57	2,25	8,29	0,10	1,74	3,84	3,63		2,55	1,22	3,14	1,34	0,52	0,81	3,17		2,39	K	F
11	2,91	2,08	2,09	3,08	6,18		3,81	3,24	3,20	0,21	2,36	1,21	2,63	0,02	0,71	1,20	4,59	1,77	1,65	V	F/T/W
12	3,04	6,17	1,95	2,00	5,33		2,57	2,56	2,90	0,41	2,88	1,14	2,34	1,18	0,47	1,57	5,81		1,83	V/N	D/R
13	3,66	7,23	1,73	1,82	6,43		1,94	1,81	3,00	0,09	6,55	1,26	4,00	1,68	2,40	2,22	5,73		2,12	N/S	A/D/G/Q/R/T

Obs.: Quantidade expressa em pmol

**4.12. Sequenciamento da porção Carboxi-terminal com carboxipeptidase Y** – O sequenciamento da porção C-terminal não proporcionou bons resultados, pois todos os resíduos foram liberados antes de 5 minutos, em ambas as digestões, dificultando a interpretação dos dados.



## 5. DISCUSSÃO

A fimbria F42 foi purificada essencialmente de acordo com o descrito por Leite et al. (1988). Porém, o tampão de eluição da cromatografia teve que ser alterado, devido ao fato de conter uréia, na concentração de 2M, pois, como é sabido, uréia interfere na análise do sequenciamento de aminoácidos, principalmente se existirem muitos resíduos de glutamina pois estes, reagem com a uréia e podem produzir ácido piroglutâmico (PCA), que é um tipo de bloqueio N-terminal. Isto reduz o produto inicial do sequenciamento, diminuindo o número de ciclos identificáveis e, portanto, prejudicando a análise do sequenciamento. Para que isso não ocorresse, foi necessário utilizar outra substância. Foi testada a guanidina-HCl, que também é desnaturante. Porém, este tampão não apresentou bons resultados. Devido aos problemas apresentados com a proteína pura devido à grande quantidade de uréia e amônio ligados a ela, foram feitas algumas modificações no método de extração e purificação da fimbria, substituindo-se fosfato, uréia e amônio por outros sais sempre que possível. Com isso, desejávamos evitar problemas com a análise de aminoácidos e sequenciamento. O tampão Tris-HCl contendo NaCl foi o escolhido por, tanto o Tris quanto o NaCl, apresentarem pouca interferência nos passos posteriores de análise de aminoácidos e sequenciamento e apresentarem perfil cromatográfico muito próximo dos outros tampões. A cromatografia do material apresentou dois picos após a passagem do material contendo a fimbria em uma coluna Sepharose CL 4B. O pico contendo a fimbria foi recromatografado seguidas vezes, e sempre apresentava o mesmo perfil (Figuras 1 e 2).

Como os padrões de bandas em SDS-PAGE dos dois picos eram idênticos (dados não apresentados), chegou-se à conclusão de que se tratava de um caso de dissociação da proteína, uma vez que os dois picos eluídos na cromatografia apresentavam um equilíbrio dinâmico e, que as proteínas da família das fimbrias bacterianas são proteínas hidrofóbicas, que tendem a se agregarem em meio aquoso. Isso poderia explicar, também o fato de, na primeira purificação, feita pelo Dr. Domingos Leite, o material apresentar-se somente com uma banda no SDS-PAGE corado com Coomassie blue, com uma massa molecular aparente de 31 kDa. A Figura 3 mostra que, após o tratamento com DOC, o material apresentava uma banda principal de massa molecular aparente de 16 kDa. O material que não foi tratado apresentou várias bandas, sendo que as principais apresentaram massas moleculares aproximadas de 62 kDa, 43 kDa, 31 kDa e 16 kDa. (dados não mostrados). Esses valores podem indicar um agregamento das subunidades de 16 kDa. O tratamento com DOC após a cromatografia mostrou-se mais eficiente na purificação da fimbria, uma vez que, depois de cromatografado, o material contém menos contaminante e o DOC pode atuar mais eficientemente na precipitação de lipídeos e lipoproteínas de membrana que são extraídos junto com a fimbria de células bacterianas.

O resultado da análise genética (PCR) da amostra padrão de *E. coli* F42+ (567/7), com os "primers" para a fimbria F41, mostrou que essas duas fimbrias, apesar de muito semelhantes, não são idênticas, pois os "primers" não foram capazes de reconhecer a seqüência alvo no genoma da amostra (Figura 5), sugerindo que, ao contrário do que foi proposto por Sperandio & Silveira (1993), estas duas fimbrias sejam realmente diferentes, confirmando o proposto por Yano et al. (1986)

O resultado da análise de PCR da amostra padrão com os "primers" para a fimbria K88, mostrou que existe uma região de homologia entre os genes que codificam para K88ab, K88ac, K88ad e F42 (Figura 5). O fato da banda do produto amplificado da amostra 567/7 aparecer com uma intensidade menor do que as bandas das amostras padrão para K88 (ab, ac e ad), pode ser decorrência da interação do "primers" com os diferentes genes envolvidos; e/ou pelo fato da homologia dos "primers" com o gene que codifica para F42 não ser tão alta quanto com os genes das amostras padrão, o que pode resultar na ligação de apenas um dos "primers" (PCR assimétrico), resultando numa banda menos intensa.

A análise do perfil plasmidial da amostra 567/7 (dados não mostrados) mostrou que esta possui atualmente apenas um plasmídio, diferentemente do que foi descrito por Silveira et al. (1987), onde a amostra padrão se apresentava com 6 plasmídios. Uma outra amostra, também 567/7, fornecida pelo Dr. Domingos Leite, com características hemolíticas, apresentou apenas duas bandas, também diferindo do anteriormente descrito. Apesar de ter perdido plasmídios, a amostra padrão 567/7 preservou suas características de aglutinar hemácias de galinha e de cobaio, levando-nos a sugerir que, caso o gene não seja cromossomal, como ocorre com F41, ele esteja presente neste plasmídio.

Após a purificação da proteína e análise genética, foi feita a determinação da composição de aminoácidos da fimbria F42 nativa, que é apresentada na Tabela I e mostra diferenças entre a fimbria F42 e a fimbria F41 quanto à sua composição de aminoácidos (Tabela II), sugerindo que, ao

contrário do que foi proposto por Sperandio & Silveira (1993), estas duas fimbrias sejam realmente diferentes, confirmando o proposto por Yano et al. (1986). Nota-se que aminoácidos como *Glx*, *Ser*, *His*, *Arg*, *Thr*, *Ala*, *Pro*, *Tyr*, *Leu* e *Lys*, apresentam, proporcionalmente, grande diferença no número de resíduos, o que significa uma mudança na conformação tridimensional da proteína, conferindo-lhe características diferentes daquelas da fimbria F41. Assim, as diferenças na composição e análise de aminoácidos sugerem que as duas fimbrias são realmente diferentes.

Seguindo-se à determinação da composição de aminoácidos da fimbria, foi feita a sua digestão com brometo de cianogênio.

O perfil cromatográfico dos peptídeos resultantes da digestão da proteína por brometo de cianogênio (CNBr) não se apresentou uniforme. Foram feitas várias digestões, e todas elas apresentaram perfil diferente, independente do eluente utilizado (foram utilizados gradiente de 0.1% de TFA em H<sub>2</sub>O e 0.1% de TFA em acetonitrila; 10 mM de acetato de amônio em H<sub>2</sub>O e 10 mM de acetato de amônio em acetonitrila; 0.1 M de bicarbonato de amônio em H<sub>2</sub>O) ou da coluna de cromatografia (foram utilizadas colunas de fase reversa C<sub>8</sub> e C<sub>18</sub>; e de gel filtração Superdex Peptide H/R). Isso, talvez, se deva à qualidade do brometo de cianogênio, uma vez que outras digestões foram tentadas no laboratório e também apresentaram problemas. Outro motivo pode ser o fato de a proteína ser muito hidrofóbica e, por isso, não se dissolver totalmente, tanto em TFA quanto em ácido fórmico, dificultando a digestão. A presença de sais de amônia nos tampões, ao contrário do que esperávamos, não havia sido completamente retirada das amostras na dessalinização em coluna de gel filtração Sephadex G-25, interferindo no resultado da hidrólise para a determinação da composição de aminoácidos dos

peptídeos. O método de análise de aminoácidos utilizado necessita de alguns cuidados básicos para não haver prejuízo na quantificação. A hidrólise em fase vapor é utilizada em vez do método clássico de hidrólise em fase líquida, porque existe a interferência do silicato liberado durante a hidrólise ácida. Sais, metais e detergentes contidos na amostra podem interferir na etapa de derivação da amostra (Dupont et al., 1989). O método apresenta pouca tolerância a interferentes externos, sendo sensível tanto a contaminantes da amostra como dos subprodutos e do próprio PITC, que absorvem em um comprimento de onda de 254nm. Tampões de sais de amônio ou amônio terciário, não apresentam efeitos negativos na cromatografia até a concentração de 1µmolar; acima disso, como é o caso dos nossos peptídeos, houve problema na quantificação da prolina, visto que a amônia co-eluiu com ela, superestimando, desse modo, sua quantidade na amostra. A quantificação da tirosina também ficou prejudicada, uma vez que a amônia interferiu no seu pico. Da mesma forma, ela interferiu no tempo de retenção de todas os aminoácidos que são eluídos após a prolina; houve a formação de muitos subprodutos, como a feniltiouréia (PTU); os aminoácidos leucina e isoleucina, que apresentam tempo de retenção muito próximos, passaram a eluir juntos e, houve uma queda na recuperação da treonina, tudo isso dificultando a interpretação dos resultados. Após a verificação dos problemas, foi tentada uma nova dessalinização com uma coluna Sephadex G10, mas, apesar de ter sido diminuída a quantidade de amônia, ela ainda continuou grande o suficiente para interferir negativamente nas análises. Devido a todos estes problemas, a digestão com CNBr acabou não sendo de grande ajuda na determinação da estrutura primária da proteína.

Após isto, foi feita a clivagem da fimbria por tripsina tratada com N-tosil-L-fenilalanilclorometil cetona (TPCK). A técnica foi feita segundo o descrito por Fushitani et al., (1988) e por Matsuura et al., (1990), a 37°C por 24 horas. Os peptídeos resultantes desta clivagem foram separados através de cromatografia de alta performance em coluna de fase reversa (RP-HPLC) C<sub>18</sub> Vydac narrow bore (2,5x250 mm), com fluxo de 0,2 ml/min e gradiente linear crescente de 0 a 100% do solvente B (100% de acetonitrila + 0,085% de TFA), para determinar sua complexidade.

A digestão enzimática da fimbria F42 com tripsina em solução resultou em 30 picos distinguíveis na injeção 3 da amostra (Figura 6), e 33 picos na injeção 5 (Figura 7). Essa diferença na quantidade de picos se deve, talvez, ao fato de as injeções 5 e 6 terem sido feitas dois dias depois das primeiras injeções e a proteína ter ficado mais tempo em contato com a enzima (a amostra ficou na geladeira e não congelada). Porém, é possível alinhar vários picos das duas corridas, enquanto outros são realmente diferentes. Além disso, uma grande quantidade de enzima foi requerida devido à presença de sal na solução (a enzima é modificada, sendo muito pouco autodigerida). Outras digestões foram tentadas com quantidades menores de enzima, na proporção de 1/50 e 1/10 (m/m), e não obtivemos boa ou alguma digestão. Vale salientar que foi medida a condutividade da solução contendo a proteína, a fim de se estimar a concentração de sal, e foi obtido um valor surpreendentemente baixo (4,85 $\mu$ S equivalente a aproximadamente 9 $\mu$ M de NaCl). Novamente foi tentada a retirada de sal da solução com uma coluna de gel filtração P2 (Bio-Rad), que tem limite de exclusão de 2000 daltons, mas a proteína só eluía juntamente com o sal. Este comportamento sugere que a proteína possa ter grande afinidade por sais, visto que anteriormente tivemos muitas dificuldades

em retirar amônio da solução onde estava a amostra. Foi tentada ultrafiltração com Centricon (Amicon), mas à medida que o sal em solução era retirado, a amostra precipitava saturando a membrana de filtração. Esta presença de sal na solução dificultou as digestões, nos levando a optar pelas digestões “in situ”, uma vez que, após a eletroforese, a amostra apresentava-se livre de sal. Por outro lado, a quantidade de amostra suportada pelos géis de eletroforese era pequena, o que nos levava a ter um rendimento menor pois, além disso, existem perdas na própria corrida, extração e lavagem. Apesar destas dificuldades, foram obtidas as seqüências de alguns peptídeos da digestão.

O pico 23 da injeção 3 apresentou em sua composição de aminoácidos uma quantidade desproporcional de resíduos de prolina, o que prejudicou a obtenção de informações acerca do peptídeo e inviabilizou o seu sequenciamento.

Os picos 4 e 5 da injeção 5 apresentaram uma quantidade muito pequena de material, o que dificultou a análise e nos levou a descartar os seus sequenciamentos. O pico 2 com *Glx*, pico 3 com *Glx* e valina, pico 6 com *Glx*, glicina, cisteína e leucina e, o pico 27 com prolina, todos da injeção 5, apresentaram quantidades desproporcionalmente grandes destes resíduos em relação aos demais e, também foram descartados para o sequenciamento.

O pico 16 da injeção 5 foi escolhido para ser seqüenciado, mas devido a problemas com o seqüenciador que “perdeu” os primeiros ciclos de sequenciamento (inclusive o padrão), a seqüência de aminoácidos do peptídeo não pôde ser determinada.

A digestão “in situ” com tripsina proporcionou alguns picos aptos ao sequenciamento (Figura 8). Não foi possível determinar a composição de aminoácidos destes picos devido ao fato destes serem coletados diretamente sobre membrana de PVDF através de blotter. Os picos P10400, P10900 – T1, P11000 – T2 e P11100 – T3 foram escolhidos por apresentarem uma quantidade maior de material e por estarem, aparentemente, puros. Todos, porém, apresentaram mais de um resíduo em alguns ciclos.

O peptídeo P10400 apresentou 15 resíduos de aminoácidos em sua seqüência (Tabela XV), sendo que esta não coincidiu com nenhum ponto da seqüência da fimbria F41, podendo representar uma importante diferença entre as duas proteínas.

O peptídeo P10900 foi seqüenciado até o seu 10<sup>o</sup> resíduo, apresentando, porém, problemas nos resíduos 3, 4, 7, 8 e 9 (Tabela XVI). Mesmo assim, foi possível alinhar esta porção com a fimbria F41 entre os aminoácidos 161 e 169. O pico P11000 apresentou 9 resíduos sequenciáveis (Tabela XVII). Apesar de aparecerem mais de um resíduo por ciclo, foi possível, também, alinhar este peptídeo com a fimbria F41 entre os aminoácidos 68 e 76 com a seguinte seqüência (que não foi a principal): **GVFVGNTLI**. O peptídeo referente ao pico P11100 forneceu 12 sinais de resíduos de aminoácidos (Tabela XVIII). A seqüência mostrou-se idêntica à porção N-terminal da fimbria F41 e da proteína nativa. Essas semelhanças indicam que, realmente, existe uma grande homologia entre as fimbrias F42 e F41, sugerindo que elas possam pertencer a uma mesma família de fimbrias. Reforçando esta idéia, temos a seqüência de 32 resíduos de aminoácidos da porção N-terminal obtida



da proteína nativa que foi transferida do gel de eletroforese para uma membrana de PVDF. Todos os 32 resíduos são idênticos aos da fimbria F41.

O pico 12 da injeção 3 foi seqüenciado e apresentou sinal até o 8º resíduo (Tabela XIX). Este peptídeo, derivado da digestão com tripsina, apresentou homologia de 4 aminoácidos com a fimbria F41 dos resíduos 122 ao 125, não coincidindo o resto da seqüência. Isto pode indicar uma região onde aparecem algumas diferenças entre as duas proteínas. A Tabela 21 apresenta a seqüência de aminoácidos da fimbria F41 deduzida a partir do gene *fim41a* (Fidock et al., 1989).

A seqüência de aminoácidos do pico 3 da digestão de F42 com Endoproteinase Asp-N apresentou 13 resíduos, conforme mostrado na Tabela XX. Apesar de indicar a presença de uma serina no primeiro resíduo, devido à sua maior quantidade, este deve ser um ácido aspártico, que também aparece em grande quantidade, visto que a enzima cliva na parte amino terminal do resíduo. Este peptídeo não apresenta homologia com nenhuma porção da fimbria F41, indicando, novamente, que as duas fimbrias apresentam regiões onde não ocorrem homologias e, portanto, devem ser as regiões responsáveis pelas diferenças antigênicas.

A digestão com carboxipeptidase Y não proporcionou bons resultados, dificultando a interpretação dos dados, pois todos os resíduos foram liberados antes de 5 minutos de digestão, mesmo com a proporção de 1/700 (mol/mol) de proteína/enzima, impedindo a determinação da seqüência de aminoácidos da porção carboxi-terminal. Apesar de ser uma técnica que necessita de uma quantidade grande de material e de ter um rendimento baixo, ela foi tentada

pois esta região é a mais variável entre as proteínas da família das fímbrias. Portanto, determinando a seqüência desta região, pode-se definir se uma fímbria é diferente ou não da outra.

A obtenção das seqüências anteriormente mencionadas nos dá bons indícios de que, apesar de muito similares, as fímbrias F41 e F42 são, na verdade, duas proteínas distintas que devem pertencer à mesma família, caso que ocorre com certa freqüência entre os antígenos de aderência bacterianos, vide as famílias K88, F18 e até mesmo as similaridades genéticas entre K88, F41 e CS31A. Vale lembrar, que fímbrias da mesma família, como no caso do K88 (K88ab, K88ac e K88ad), apresentam grande homologia na porção N-terminal da molécula, sendo que a homologia fica em torno de 90%, concentrando as diferenças mais na porção C-terminal da molécula. Apesar de tamanha identidade, estas fímbrias possuem diferenças antigênicas e soros e vacinas específicos para uma, reconhecem só parcialmente as outras. Isto nos motiva ainda mais a terminar a seqüência completa da proteína F42, a fim de se determinar quais as diferenças estruturais entre as fímbrias e o que isto acarreta antigenicamente.

Apesar desta identidade, Leite et al. (1988) demonstrou que F42 era reconhecida apenas pelo seu antissoro homólogo (Figura 4), não sendo reconhecida pelo soro anti-F41 e, o soro anti-F42 não reconhecia a fímbria F41 em procedimentos de imunoeletroforese. Além disso, F42 aglutina hemácias de galinha, o que não ocorre com a fímbria F41 (Yano et al., 1986; Leite et al., 1988). Outro dado importante foi a constatação da presença de uma banda de massa molecular aparente de 16 kDa., a qual nunca foi descrita nos trabalhos de purificação de F41 e/ou F42. Esta banda eluiu no primeiro

pico da cromatografia da fimbria e foi reconhecida especificamente pelo soro anti-F42 em imunodifusão radial dupla (Figura 4) e em imunoblot (dados não apresentados). Este reconhecimento elimina a possibilidade de a banda ser a fimbria K99, que está associada à F41 em *E. coli*, uma vez que tanto o soro anti-F41 quanto o anti-F42 não reconhecem esta fimbria (de Graaf & Roorda, 1982).

## **6. CONCLUSÕES**

1. A fimbria F42, ao contrário do proposto, deve ter massa molecular aparente de 16.000 Daltons, e não 31.000Da. (SDS-PAGE).
2. A análise da composição de aminoácidos da fimbria, mostra diferenças significativas em relação à fimbria F41.
3. Apesar de apresentar os 32 resíduos da porção N-terminal idêntica à F41, alguns peptídeos internos se mostraram diferentes em suas seqüências de aminoácidos.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Alexander, T. J.** 1994. Neonatal diarrhoea in pigs. In: Gyles, C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, Cab. International, Wallingford, UK. 1994, pp 151 - 169.
- Ambler, R.P.** 1967. Enzymatic hydrolysis with carboxypeptidases. In: *Methods in Enzymology* (HIRS, C.H.W.; ed.), v.11, New York, Academic Press, pp. 155-168.
- Ambler, R.P.** 1967. Carboxypeptidases A and B. In: *Methods in Enzymology* (HIRS, C.H.W.; ed.), v.11, New York, Academic Press, pp. 436-444.
- Antonini, E.; Wyman, J.; Zito, R.; Rossi-Fanelli, A.; Caputo, A.** 1961. Studies on carboxypeptidase digests of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.*, v.236(9), pp.PC60-PC63.
- Atherton, D., Fernandez, J., DeMott, M., Andrews, L. & Mische, S.M.** 1993. Routine protein sequence analysis below ten picomols: one sequencing facility's approach (Angeletti, R.H., ed.), V4, San Diego, Academic Press, pp. 409-419.
- Bertschinger, H.U., Bachmann, M., Mettler, C., Pospischil, A., Schraner, E.M., Stamm, M., Sydler, T. & Wild, P.** 1990. Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs. *Vet. Microbiol.* 25: 267-281.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen, S.A. & Tarvin, T.L.** 1984. Rapid analysis of amino acid using pre-column derivatization. *J. Chromat.* 336: 93-104.

- Blanco, J.; Blanco, M.; Alonso, M. P.; Garabal, J. I.; Blanco, J. E.; Gonzáles, E. A.** 1992. Factores de virulência de los *Escherichia coli* causantes de infecciones extraintestinales. Santiago: n° 170 (monografía de Universidade de Compostela. Universidade de Santiago de Compostela. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico).
- Blanco, J. & Blanco, M.** 1993. *Escherichia coli* enterotoxigénicos, necrotoxigénicos y verotoxigénicos de origem humano y bovino, patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. In Servicio Pub. Diputacion Provincial, Lugo, Espanha.
- Brito, B. G.** 1997. Factores de Virulência de *Escherichia coli* isoladas de suínos com bacteriúria. Londrina. [Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Paraná].
- Casey, T.A., Nagy, B. & Moon, H.W.** 1992. Pathogenicity of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* that do not express K88, K99, F41 and 987P adhesins. Am. J. Vet. Res. 53(9) : 1488-1492.
- Castro, A. F. P.; Serafim, M. B.; Brito, J. R. F.; Barcellos, D. S. E. N. De & Colli, I. A. G.** 1984. Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concórdia, Santa Catarina, Brazil, Pesq. Vet. Bras., 4: 109-114.
- Castro, A.F.P., Piffer, I.A., Serafim, M.B., Leite, D.S. & Colli, I.A.G.** 1990. Reprodução experimental da colibacilose suína em leitões. Pesq. Vet. Bras. 10: 11-18.
- Corrêa, W.; Correia, C.N.** 1992. Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos. Editora Médica e Científica Ltda. MEDSI – 2ª ed., p 175-187. Rio de Janeiro - RJ.
- Davis, B.D. & Minglioli, E.S.** 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B. J. Bact. 60: 17-28.

- De, S. N. & Chatterjee, D. N.** 1953. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Pathol. Biol.* **66**: 559-562.
- Dean, A. G.; Williams, R.G. & Harden, L. B.** 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* **125**: 407-411.
- Dean-Nystrom, E.A., Casey, T.A., Schneider, R.A. & Nagy, B.** 1993. A monoclonal antibody identifies 2134P fimbriae as adhesins on enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs. *Vet. Microb.* **37** : 101-114.
- De Graaf, F.K. & Roorda, I.** 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect. Immun.* **36**:751-758.
- De Graaf, F.K. & Mooi, F.R.,** 1986. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. In: Rose, A. H. and Tempest, D. W., eds. *Advances in Microbiol. Physiol.* vol. 28. New York: Academic Press Inc., 65-143.
- Donnenberg, M.S. & Kaper, J.B.** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**: 3953-3961.
- Dubreuil, J. D. & Fairbrother, J. M.** 1992. Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165<sub>2</sub>. *FEMS Microbiol. Lett.*, **74**: 219-224.

- Dykes, C. W.; Halliday, I. J.; Hobden, A. N.; Read, M. J. & Harford, S.** 1985. A comparison of the nucleotide sequence of the A subunit of heat labile enterotoxin and cholera toxin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **26**: 171-174.
- Echeverria, P.; Seriwatana, J.; Patolomoroj, U.; Moseley, S. L.; Mcfarland, A.; Chityothin, O & Chaicumpa, W.** 1984 Prevalence of heat-stable II enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs, water, and people at farms in Thailand as determined by DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 489-491.
- Edwards, P. R. & Ewing, W. H.** 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3 ed. Minneapolis, Burgess Publishers.
- Fairbanks, G., Stehm, T.L. & Wallaca, D.F.H.** 1971. Eletrophoretic analysis of the major polipeptide of human erythrocyte membrane. *Biochemistry.* **10**: 2606-2617.
- Fairbrother, J. M.; Larivière, S. & Lallier, R.** 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect. Immun.* **51**: 10-15.
- Fairbrother, J. M.; Broes, A.; Jacques, M. & Larivière, S.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K "V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *American J. vet. Res.* **50**: 1029-1036.
- Fidock, D.A., McNicholas, P.A. and Lehrbach, P.R.** 1989. Nucleotide sequence of the F41 fimbriae subunit gene in *Escherichia coli* B41. *Nucleic Acids Res.* **17**(7), 2849.



- Fushitani, K., Matsuura, M.S.A. & Riggs, A.F.** 1988. The amino acid sequences of chains a, b, and c that form the trimer subunit of the extracellular hemoglobin from *Lumbricus terrestris*. *J. Biol. Chem.* 263(14): 6502-6517.
- Gaastera, W. De Graaf, F. K.** 1982. Host - specific fimbrial adhesins of noninvasive *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* 46 (2): 129-161.
- Gonzalez, E. A; Blanco, J.** 1987. Propiedades de los *Escherichia coli* causantes de diarrea en seres humanos: E. Coli enterotoxigénicos (ETEC), enteropatógenos clásicos (EPEC) y enteroinvasivos (EIEC), ed. Servicio de Publicacións e Intercambio Científico p 1-110 Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, España.
- Guinée, P. A. M. & Jansen, W. H.** 1979. Detection of enterotoxigenicity and attachment factors in *Escherichia coli* strains of human, porcine and bovine origin; a comparative study. *Zentrabl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 24: 245-257.
- Guth, B. E. C.; Twiddy, E. M.; Trabulsi, L. R. & Holmes, R. K.** 1986. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 54: 529-536.
- Gyles, C. L.** 1979. Limitations of infant mouse test for *Escherichia coli*. Heat-stable enterotoxins. *Can. J. Comp. Med.*, 34: 337-349.
- Gyles, C. L.** 1986. *Escherichia coli*. In: C.L. Gyles and C.O. Thoen (eds). Pathogenesis of bacterial infections in animals. P. 114-131. The Iowa States University Press, Ames, EUA.

- Hayashi, R.** 1977. Carboxypeptidase Y in sequence determination of peptides. In: *Methods in Enzymology* (HIRS, C.H.W.; TIMASHEFF, S.N.; eds), v.47, New York, Academic Press, pp. 84-96.
- Heinrikson, R.L. & Meredith, S.C.** 1984. Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: pre-column derivatization with phenylisothiocyanate. *Anal. Biochem.* 136: 65-74.
- Holland, R.E.** 1990. Some infectious of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 3: 345-375.
- Holmes, R. K.; Twiddy, E. M. & Pickett, C. L.** 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 53: 464-477.
- Imberechts, H., De Greve, H., Schlicker, C., Bouchet, H., Pohl, P., Charlier, G., Bertschinger, H., Wild, P., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van Montagu, M. & Lintermans, P.** 1992. Characterization of F107 fimbriae of *Escherichia coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. *Infect. Immun.* 5: 1963-1971.
- Imberechts, H., Van Pelt, N., De Greve, H. & Lintermans, P.** 1994. Sequences related to the major subunit gene *fedA* fo F107 fimbriae in porcine *Escherichia coli* strains that express adhesive fimbriae. *FEMS.* 119: 309-314.
- Isaacson, R. E.; Nagy, B. & Moon, H. W.** 1977. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli*: colonization and adhesion factors of pig enteropathogenic that lack K88. *J. Infect. Dis.* 135: 531-539.

- Kilmatin, J.V.** 1981. Removal of specific C-terminal residues from human hemoglobin using carboxypeptidases A and B. In: *Methodos in Enzymology* (Antonini, E.; Rossi-Bernardi, L.; Chiancone, E.; eds), v.76, San Diego, Academic Press, pp. 167-171.
- Klemm, P.** The complete amino-acid sequence of the K88 antigen, a fimbrial protein from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 117:617-627. 1981.
- Leite, D.S., Yano, T. & Pestana de Castro, A.F.** 1988. Production, purification and partial characterization of a new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 139: 295-306.
- Leite, D. S.; Yano, T. & Pestana De Castro, A. F.** 1997. Receptors on chicken Erythrocytes for 42 Fimbriae of *Escherichia coli* Isolated from Pigs. *Zbl. Bakt.* 286: 383-388.
- Levine, M.M.** 1987. *E. coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Infect. Dis.* 155: 377-389.
- Lior, H.** Classification of *Escherichia coli* In Gyles C. L. (Ed.) 1994. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB. International, 31-72.
- Matsuura, M.S.A., Fushitani, K. & Riggs, A.F.** 1990 The amino acid sequences fo the  $\alpha$  and  $\beta$  chains of hemoglobin from the snake, *Liophis miliaris*. *J. Biol. Chem.* 264(10):5515-5521.
- Moon, H. W.; Kohler, E. M.; Schneider, R. A. & Whipp, S. C.** 1980. Prevalence of pilus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K88 negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.*, 27: 222-230.

- Morris, J. A.; Stevens, A. E. & Sojka, W. T.** 1978. Anionic and cationic components of the K99 surface antigen from *Escherichia coli* B41. *J. Gen. Microbiol.* **107**: 173-175.
- Morris, J. A., Sojka, W. J.,** 1985. *Escherichia coli* as pathogens in animals. In: Sussman, M. ed. "The virulence of *Escherichia coli*: reviews and methods". New York: Academic Press Inc., 45-47.
- Nagy, B., Casey, T.A., Whipp, S.C. & Moon, H.W.** 1992. Susceptibility of porcine intestine to pilus-mediated adhesion by some isolates of piliated enterotoxigenic *Escherichia coli* increase with age. *Infect. Immun.* **60**: 12285-1294.
- Nataro, J.P.; Kaper, J.B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Reviews*, **1**: 183-184.
- Nataro, J. P.; Levine, M. M.** *Escherichia coli* Diseases in Humans In Gyles C. L. (Ed.) 1994. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB. International, Wallingford, UK. 1994, p.285-333.
- Ojeniyi, B. Ahrens, P. & Meyling, A.** 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhoea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *J. Vet. Med.* **B 41**, 49-59.
- ØRskov, I.; ØRskov, F.; Sojka, W. J. & Leach, J. M.** 1961. Simultaneous occurrence of *Escherichia coli* B and antigens in strains from disease swine. *Acta. Pathol. Icrobiol. Scand.* **53**: 404-422.
- Ørskov, I.; ØRskov, F.; Smith, H. W. & Sojka, W. J.** 1975. The establishment of K99, a thermolabile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco" possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* **83**: 31-36.

- Ouchterlony, O.** 1958. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* 5:1.
- Robins-Browné, R. M.** 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.* 9: 28-53.
- Rosa, J.C., Oliveira, P.S.L., Garrat, R., Beltramini, L., Resing, K., Roque-Barreira, M.C., Greene, L.J.** KM+, a monnose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: Amino acid sequence, predicted tertiary structure, carbohydrate recognition, and analysis of the  $\beta$ -prism fold. *Protein Science.* 8:13-24.
- Sears, C. L. & Kaper, J. B.** 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 60: 167-215.
- Silveira, W.D., Yano, T., Azevedo, J.L. & Castro, A.F.P.** 1987. Plasmid-mediated production of a new colonization factor (F42) in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Rev. Genet.* x,4: 635-646.
- Smith, H.W. & Gyles, C.L.** 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. *J. Microbiol.* 3: 387-401.
- Smith, H.W. & Lingood, M.A.** 1972. Further observations on *Escherichia coli* enterotoxins with particular regard to those produced by atypical piglet strains and by calf and lamb strains. *J. Med. Microbiol.* 5: 243-250.
- Sperandio, V. & Silveira, W.D.** 1993. Comparison between enterotoxigenic *Escherichia coli* strains expressing "F42", F41 and K99 colonization factors. *Microbiol. Immunol.* 37(11): 896-875.
- Stirm, S., Ørskov, F. & Mansa, B.** 1967. Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. II. Isolation and chemical analysis. *J. Bacteriol.* 93: 731-739.

- Yamamoto, T.; Gojobori, T. & Yokota, T.** 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* 01. *J. Bactriol.*, **169**: 1352-1357.
- Yano, T., Leite, D. S., Camargo, I. J. B., Pestana de Castro, A. F.,** 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. *Microbiol. Immunol.*, **30**: 495-508.
- Zerbini, L. F. C.** 1993. Fatores de Virulência e Sorotipos de *Escherichia coli* isolada de suínos durante as primeiras semanas de vida. São Paulo. [Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de São Paulo , São Paulo].