

LUCILA COSTALLAT RICCI

"ESTUDO DE RECEPTORES PARA AS ENTEROTOXINAS COLÉRICA
(TC) E TERMOLÁBEIS (LTs) DE ESCHERICHIA COLI , EM
ERITRÓCITOS".

TESE DE DOUTORADO

APRESENTADA AO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLO
GIA DA UNIVERSIDADE ESTA
DUAL DE CAMPINAS.

ORIENTADOR:- PROF.DR. ANTONIO FERNANDO PESTANA DE
CASTRO .

1 9 8 7

Este exemplar corresponde a pedagogia
final da tese defendida pela candidata
P. A. Lucila Costallat Ricci e apro-
vada pela comissão julgadora.

16/12/87



Orientador: Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro.

Ao Paulo

e às nossas filhas

Tatiana

e

Paula

Aos meus pais,

Renato e Bebê

Aos meus sogros,

Ediney e Fiúca

Agradecimentos

Prof.Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro

Prof.Dr. Walter August Hadler

Profa.Dra. Marlene Braide Serafim

Prof.Dr. Tomomasa Yano

Prof.Dr. Sebastião Timo Iaria

Prof.Dr. Octávio Augusto Carvalho Pereira

Profa.Dra. Maria Regina Fernandes Toledo

Prof. Dr. Humberto de Araujo Rangel

Profa. Wirla Maria S. Cunha Tamashiro

Profa. Aparecida Celli Almeida Said

Paula Salek de Siqueira

Manoel Bernardo da Silva

João Garcia de Andrade

Ana Stella Menegon

Lucia Helena Vicentin

Lien Huy Lim

Departamento de Fisiologia Vegetal

Agradeço também aos demais colegas e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP e os órgãos financiadores: FAPESP e FINEP, que subsidiaram o desenvolvimento do presente trabalho.

Í N D I C E

Ítem	pág.
1.....	1
2.....	23
2.1.....	23
2.2.....	23
2.3.....	26
2.4.....	27
2.5.....	30
2.6.....	31
2.6.1...	31
2.6.2...	32
2.6.3...	33
2.7.....	34
2.7.1...	34
2.7.2...	35
2.7.3...	39
2.7.4...	42
2.8.....	43
2.9.....	45

Ítem	pág.
2.10..... Cromatografia em camada delgada de sílica gel.....	47
2.11..... Inibição das reações sorológicas de IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC, por preparados lisados e delipídados de hemácias de carneiro e boi.....	48
2.12..... Inibição pelos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1, das reações sorológicas de IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC.....	50
2.13..... Inibição pelas frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, boi e cobaia, das reações sorológicas de IHR e HI na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC.....	52
2.14..... Inibição pelas frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro pelas enterotoxinas LTh, LTp e TC em células VERO.....	54
3..... Resultados.....	57
3.1..... Adaptação de técnicas sorológicas de detecção das enterotoxinas LTs de origem humana e suína e da TC, a eritrócitos de diferentes origens.....	57
3.2..... Estudo do efeito de diferentes fatores físico-químicos, na ligação das enterotoxinas LTh, LTp e TC, a receptores em hemácias de carneiro.....	63
3.2.1.. Efeito do pH.....	64
3.2.2.. Efeito do tempo de contato.....	64
3.3.3. Efeito da temperatura de incubação.....	64

item	pág.
3.4.....	Efeito de diferentes substâncias químicas em receptores da hemácia de carneiro para as enterotoxinas LTh, LTp e TC..... 69
3.4.1....	Carboidratos e poliálcoois..... 69
3.4.2....	Enzimas..... 70
3.4.3....	Substâncias químicas diversas..... 77
3.4.4....	Formol..... 77
3.5.....	Cromatografia em camada delgada das frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro e cobaia..... 81
3.6.....	Inibição por preparados lisados e delipidados de hemácias de carneiro e de boi, das reações sorológicas de IHR e HI..... 84
3.7.....	Inibição pelos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1 das reações sorológicas de IHR e HI na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC..... 86
3.8.....	Inibição pelas frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, boi e cobaia, das reações sorológicas de IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC..... 94
4.....	Discussão..... 104
5.....	Resumos e conclusões..... 132
6.....	Referências Bibliográficas..... 140

PRINCIPAIS ABREVIATURAS

ST.....	enterotoxina termoestável de <u>E.coli</u>
LT.....	enterotoxina termolábil de <u>E.coli</u>
TC.....	Toxina colérica
LTh.....	enterotoxina termolábil de <u>E.coli</u> , procedente da amostra 40T, de ori gem humana
LTP.....	enterotoxina termolábil de <u>E.coli</u> , procedente da amostra 0149/6, de origem suína
LTs.....	enterotoxinas termolábeis de <u>E.coli</u>
LT-I.....	denominação mais recente da LT clá <u>s</u> sica.
LT-II.....	denominação de nova classe de ente rotoxina termolábil
ETEC.....	<u>E.coli</u> enterotoxigênica
EPEC.....	<u>E.coli</u> enteropatogênica
EHEC.....	<u>E.coli</u> enterohemorrágica
IHP.....	Prova de imuno-hemólise passiva
IHRs.....	Prova de imuno-hemólise radial <u>sim</u> ples.
IHR.....	Prova de imuno-hemólise radial <u>mo</u> dificada
HI.....	Prova de hemaglutinação indireta
ACF.....	Adjuvante completo de Freund
AIF.....	Adjuvante incompleto de Freund
EDTA.....	ácido etilenodiamino tetraacético

ESTUDO DE RECEPTORES PARA AS ENTEROTOXINAS COLÉRICA (TC) E
TERMOLÁBEIS (LTs) DE Escherichia coli, EM ERITRÓCITOS

1. INTRODUÇÃO

Sob o ponto de vista funcional ou fisiológico, o termo "receptor", é usado para definir um componente estrutural da superfície celular, que regularia de maneira reversível um evento biológico, ao contato com um ligante específico (19).

No caso da Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC), importante agente etiológico de doenças diarréicas que acometem o homem e animais de várias espécies (100,106,107), a expressão de sua toxigenicidade depende da ligação das toxinas por ela produzidas, a receptores específicos existentes nas células das vilosidades intestinais.

A ação patogênica dessas bactérias decorre principalmente da elaboração, simultânea ou não, de dois grupos de enterotoxinas distintos, um termoestável, designado de ST e outro termolábil, conhecido como LT (99).

Para que estas toxinas exerçam a sua ação a nível intestinal, com conseqüente produção de diarréia, é necessário primeiramente, que a própria célula bacte-

riana, se fixe na mucosa intestinal do hospedeiro.

Esta aderência da ETEC aos receptores intestinais é realizada, via de regra, por estruturas do tipo fímbria. Várias dessas fímbrias, também conhecidas como fatores de colonização, tem sido descritas desde 1961 em amostras de colibacilos enterotoxigênicos causadores de diarréia no homem e animais (38,70,72,128).

Essas fímbrias de aderência, variam antigenicamente e foram, à princípio, identificadas em amostras de ETEC patogênicas para suínos, recebendo a denominação de K88 (72,73).

Em 1977, foi descrito o antígeno 987P, também identificado em amostras originárias de suínos (70). O antígeno K99 (83,92), inicialmente relatado para amostras de E. coli de origem bovina e ovina, foi posteriormente identificado como sendo importante em amostras de origem suína (70).

Em 1982, foi descrito o antígeno F41 (43), encontrado em amostras de origem bovina e suína.

Recentemente, Yano et al (128), descreveram um novo antígeno, denominado de F42, em amostras de ETEC de origem suína. Também outros antígenos de aderência, ainda não bem caracterizados, tem sido relatados em amostras de ETEC de origem humana e suína (21, 34,68,77).

Por outro lado, em amostras de E. coli de origem humana, já são bem caracterizados os antígenos CFA/I

(31), CFA/II (32), CFA/III (20) e E8775 (121), tendo seu envolvimento com os quadros de diarreia já sido demonstrado.

Também nos grupos das E. coli enteropatogênicas clássicas (EPEC) e enterohemorrágicas (EHEC), de importância em casos de diarreia humana, tem sido observadas estruturas semelhantes a fímbrias, que estariam atuando como fatores de colonização para estas amostras (74,90).

Quanto aos receptores para estas fímbrias de aderência nos animais susceptíveis, Sellwood et al (103) e RUTTER et al (98), demonstraram que existem dois fenótipos nos suínos quanto à presença de receptores específicos para o antígeno de aderência K88.

Isto significa, que células K88+ só poderiam aderir aos enterócitos de porcos, se os respectivos animais apresentassem receptores adequados. Pelas análises das frações solúveis dos enterócitos dos animais ditos "adesivos" e "não adesivos", revelou-se que uma única diferença química existia no perfil dos glicolipídeos entre os dois fenótipos.

Supuseram então, que este glicolipídeo seria provavelmente o receptor para o antígeno de aderência K88 (98,103).

Por outro lado, Faris et al (33), estudaram os receptores específicos para CFA/I e para K99, em hemácias humanas e de carneiro, demonstrando que a hema

glutinação manose-resistente, causada por estes antígenos de aderência, era inibida por mono e disialogangliosídeos, especialmente o GM2.

Um pré-tratamento das hemácias com neuraminidase, inibia a hemaglutinação de CFA/I com hemácias humanas, mas não interferia na hemaglutinação de K99 com hemácias de carneiro. Por outro lado, após tratamento com pronase, a hemaglutinação tornava-se negativa em ambos os casos.

Esses resultados sugerem, que glicolipídeos e glicoproteínas podem estar envolvidos na adesão dessas fímbrias, a receptores existentes nas hemácias utilizadas nos testes de hemaglutinação manose-resistente.

Recentemente, Smith et al (108) isolaram de hemácias de cavalo, um receptor específico de natureza glicolipídica, para o antígeno K99. Por outro lado, Dean e Isaacson (24), caracterizaram bioquimicamente como uma glicoproteína, o receptor em enterócito de coelho para o antígeno de aderência 987P.

A natureza química dos receptores para os fatores de colonização mais recentemente conhecidos, tanto para amostras de E. coli enterotoxigênicas de origem humana como animal, incluindo o CFA/III, E8775, F41, F42 e F165 (34), além dos responsáveis pela aderência localizada em amostras do grupo EPEC e EHEC ainda não é conhecida e carece de investigações adicionais.

No caso das amostras do grupo ETEC, as bactérias patogênicas não só necessitam produzir fímbrias de aderência que se liguem a receptores específicos, como mencionado acima, como também devem produzir enterotoxinas a nível da luz intestinal, que se ligarão a seus próprios e específicos receptores, só então, causando doença.

No grupo das enterotoxinas termoestáveis, ST, encontramos nas ETEC, dois tipos básicos de toxinas caracterizados por peptídeos de baixo peso molecular (1.500 a 3.000 daltons), não homólogos, denominados de STa (ou STI) e STb (ou STII) (2,94,110,113).

Devido ao baixo peso molecular, as enterotoxinas termoestáveis não são imunogênicas em condições naturais, isto é, somente induzem a formação de anticorpos, quando acopladas à proteínas (1).

A atividade de STa é ensaiada em camundongos recém-nascidos (23), enquanto que a STb, é ativa apenas em alças intestinais de porcos de 5 a 6 semanas de idade (8,49). O modo de ação da STb é desconhecido (76), enquanto que a STa ativa o sistema da guanil-ciclase a nível da membrana, o que provoca um acúmulo do GMP-cíclico nas células epiteliais do intestino, alteração do equilíbrio hidrossalino e consequente diarreia (100).

A enterotoxina STa de amostras ETEC de origem humana, bovina e suína, tem sido purificada e sequenciada (2,94,122). Apesar da sequência de aminoácidos nessas

toxinas, ser heterogênea no N-terminal, o sítio toxigênico está restrito a uma sequência de 13 aminoácidos, do segmento C-terminal (129). Desta forma, STa é na verdade uma família de enterotoxinas com mesma atividade biológica, mas com variações nas suas estruturas químicas (80,109).

Como a maioria dos estudos quanto a STa tem sido desenvolvidos em modelos animais, principalmente ca mundongos, coelhos e leitões, vários pesquisadores tem procurado nas vilosidades intestinais desses animais, o provável receptor para STa. Dados obtidos por Dreyfus e Robertson (27), revelaram que grupos tiol dos receptores para STa reagem com pelo menos uma das pontes disulfeto da enterotoxina.

Recentemente, Gariépy e Schoolnik (39), utilizando um análogo sintético da enterotoxina STb marcada com iodo radioativo, demonstraram a ligação dessa toxina a peptídeos obtidos a partir de enterócitos de ratos. Contudo, os resultados até o momento, quanto aos receptores para as enterotoxinas termoestáveis, ainda não estão bem esclarecidos.

Por outro lado, a enterotoxina termolábil, LT, produzida por amostras ETEC, é uma proteína de alto peso molecular (84.000 a 91.000 daltons), imunogênica, assemelhando-se em muitos aspectos à toxina colérica produzida pelo Vibrio cholerae (11,12,13,14).

Estruturalmente, ambas são constituídas por duas subunidades A e B, sendo que A é formada por uma

única cadeia polipeptídica, que pode ser desdobrada em dois fragmentos A1 e A2, após tratamento enzimático com tripsina e a B, disposta sob a forma de cinco cadeias polipeptídicas (42).

O mecanismo de ação da enterotoxina LT, é também idêntico ao da TC, sendo que a subunidade B de ambas, é a responsável pela ligação da toxina aos seus receptores nas células sensíveis, sejam em condições "in vivo" como "in vitro" (28).

"In vivo", após a ligação da toxina, ocorre a penetração da subunidade A na célula da mucosa intestinal, o que provoca a dissociação desse fragmento e consequente ativação da adenil-ciclase, pelo fragmento A1 (69), levando ao acúmulo do AMP cíclico intracelular. Este aumento faz com que haja um bloqueio da absorção de NaCl pelas células apicais da mucosa, estimulando ainda a excreção desse sal pelas células das criptas.

Em consequência destas alterações no metabolismo hidrossalino, ocorre um aumento da quantidade de líquido na luz intestinal e consequente diarréia do tipo osmótico (41).

Tsuji et al (123), demonstraram que a enterotoxina LT procedente de amostras de origem humana, era diferente antigenicamente das produzidas por amostras suínas. Posteriormente, foi verificado que a estrutura molecular da LT de origem suína, era também bastante semelhante à TC, sendo que as três enterotoxinas apresentavam determinantes antigênicos comuns, como também determinantes

exclusivos (67). Em eletroforese de gel de poliacrilamida, foi demonstrado que a mobilidade eletroforética das enterotoxinas LT, de origem humana e suína, e da TC, bem como suas cargas iônicas, eram diferentes (67).

Devido às similaridades imunológicas existentes entre as três enterotoxinas, ocorre uma proteção cruzada nas diferentes infecções, por causa dos epítomos em comum. Recentemente, Jacob et al (71) verificaram que um peptídeo sintético, o CTP3, constituído dos resíduos 50 a 64 da subunidade B da TC, presente também nas enterotoxinas LT de origem humana e suína, era capaz de induzir a produção de um antissoro, que neutralizava as três toxinas.

Antissoro contra um outro peptídeo da TC, o CTP1, constituído dos resíduos 8 a 20, reagiu fracamente com a LT de origem humana, mas não com a de origem suína. Por outro lado, um terceiro antissoro contra quatro outros peptídeos da TC não reagiu cruzadamente com as enterotoxinas heterólogas.

Os mesmos autores também observaram que o soro anti-CTP3 reagia fortemente com a subunidade B das três enterotoxinas, enquanto que o anti-CTP1 reagia fracamente com as frações B da TC e LT de origem humana, mas não com a mesma fração da LT de origem suína. Porém, esse mesmo soro reagia fortemente com a subunidade A da TC (71).

Diversos experimentos realizados demonstraram também, que as subunidades B das enterotoxinas LT de

origem humana e suína, eram imunologicamente mais próximas entre si, do que em relação à TC.

Todas essas evidências confirmam portanto, que as enterotoxinas LT humana, LT suína e TC, possuem realmente em comum diversos determinantes antigênicos, mas ao mesmo tempo possuem seus próprios e específicos determinantes (40).

Além das semelhanças antigênicas mencionadas, diversas similaridades de efeitos biológicos tem sido caracterizadas em relação às duas enterotoxinas, tais como a ativação do AMP cíclico (87,100) e a ação citotônica em culturas de tecido das linhagens CHO (46), VERO (111) e Y1 (25).

Apesar de todas essas semelhanças, existem importantes diferenças ainda não esclarecidas quanto à atividade dessas enterotoxinas, principalmente no que concerne à duração do efeito biológico causado pelas LTs e TC, o que se reflete diretamente na intensidade da doença clínica a que estão associadas (4,30).

Enquanto que a resposta secretória à TC só atinge o máximo após 3 horas de exposição e é mantida por mais 12 horas, a resposta à enterotoxina LT de E. coli é máxima após 15 minutos e cessa em um período de tempo similar, quando a mesma é lavada da mucosa do intestino delgado de coelho (9,46). Em ambos os casos, o curso da resposta secretória é acompanhada pelo aumento da atividade da adenil-ciclase na mucosa (45,46).

As diferenças observadas quanto ao início da ação das duas enterotoxinas, que ativam a mesma enzima a nível de membrana, poderiam ser devidas a diferenças quanto a ligação às células, entrada da enterotoxina nas mesmas, ou a outros eventos aparentemente ainda não esclarecidos que transcorram antes da ativação da adenil-ciclase, mas depois da exposição à enterotoxina (96).

Na ativação do AMP cíclico, as toxinas LTs de E. coli e a TC agem modificando componentes enzimáticos da superfície interna da membrana plasmática. A ação enzimática dessas toxinas, está associada ao fragmento A e tem sido demonstrada em preparações livres de células (28).

Entretanto, essas atividades são em geral inerentes à toxina intacta e são apenas expressadas após uma ativação apropriada da toxina, pela ligação da fração B aos receptores celulares e resultante liberação da cadeia A, tóxica, ou de fragmentos da mesma.

Por outro lado, a cadeia A livre não é tóxica para animais ou para células, fazendo com que se reconheça que para a enterotoxina exercer sua função, o componente A da mesma tem que estar associado ao componente B. Este último componente seria necessário para que a toxina se ligasse à receptores na superfície das células, iniciando assim, o processo secretório que levaria à diarreia subsequente.

A falta de toxigenicidade das cadeias A livres, sugere que a toxina não entra na célula através de

processos de pinocitose ou similares. Ao contrário, tudo indica que as enterotoxinas LTs e TC, penetrem através de um processo de endocitose (pinocitose mediada por receptor), sendo que o componente B, seria o responsável por esta ligação (28).

Tem sido demonstrado, que o componente B livre ou toxinas que apresentem a fração A inativa, mas o componente B ativo, são capazes de inibir os processos mediados pelas toxinas íntegras, competindo com as mesmas pelos receptores específicos na superfície das células (58).

Quanto aos receptores para as enterotoxinas LTs e TC, muitos trabalhos as tem associado ao gangliosídeo GM1, que seria o receptor celular destas toxinas (17, 52, 56, 57, 63, 85, 88, 130).

Como outros complexos lipídicos, os gangliosídeos tem sido bioquimicamente descritos como esfingolipídeos contendo grupos polares de oligossacarídeos, ligados a uma unidade lipídica, denominada de esfingosina, que é uma molécula de aminoálcool de cadeia longa, associada a um ácido graxo também de cadeia longa (78).

Apresentam considerável variação de estrutura, o mais simples contendo em seu grupo polar duas unidades de açúcares e o mais complexo, nove. Por outro lado, todos os gangliosídeos apresentam como uma ou mais unidades de açúcares terminais, um carboidrato comum, o ácido siálico, denominação genérica de amino-açúcares relacionados derivados do ácido neuramínico (50).

Apesar de cerca de 17 ácidos siálicos diferentes, terem sido descritos (7), apenas alguns deles tem sido detectados nos gangliosídeos. O mais comum deles, é o ácido N-acetilneuramínico (NANA).

A nomenclatura dos gangliosídeos foi proposta em 1963, por Svennerholm (116), sendo que 20 tipos diferentes já foram caracterizados, variando conforme o tamanho do complexo, a posição do ácido siálico e o número do mesmo dentro da estrutura oligossacarídica.

Desta forma, quanto ao número de ácidos siálicos em sua estrutura, os gangliosídeos são denominados de mono (GM), di (GD) e trisiálicos (GT); quanto ao comprimento da cadeia oligossacarídica, como GM1, GM2, GM3 e quanto aos resíduos de galactose aos quais os ácidos siálicos estão associados, por letras minúsculas após os números (Ex: GD1a, GD1b).

No caso da TC, o gangliosídeo GM1 tem sido identificado como o receptor para esta toxina em vários tipos celulares (64). O GM1 especificamente seliga e inativa a TC, sendo que no estudo do efeito desta toxina nas células da mucosa intestinal de diferentes espécies, tem sido demonstrado uma relação direta, entre o número de sítios ligantes para a TC e o conteúdo de GM1 (58).

Por outro lado, GM1 exógeno tem sido incorporado à membrana de células deficientes em gangliosídeos, sensibilizando-as para a TC e apoiando portanto, a hipótese de que o mesmo funcione realmente como o

receptor biológico desta toxina (84).

Entretanto, Morita et al (82) descreveram a presença adicional de glicoproteínas capazes de se ligar à TC em membranas das microvilosidades do intestino de rato.

Porém, tais resultados não foram confirmados por Critchley et al (16), que demonstraram toda a atividade da TC associada nessas membranas, com um glicolípido que cromatograficamente se comportou como o gangliosídeo GM1.

Por outro lado, a natureza dos receptores para as enterotoxinas LTs é mais controvertida. De maneira similar à TC, sabe-se que a LT se liga avidamente ao GM1 "in vitro" e é inativada por esse gangliosídeo (58).

Inclusive um teste diagnóstico para a detecção da LT em filtrados de cultura ou diretamente das fezes, foi desenvolvido por Svennerholm e Holmgren (3,101,118), utilizando em provas de ELISA, o GM1, adsorvido em um suporte plástico.

Também a incorporação do GM1 em uma linhagem de fibroblasto de camundongo deficiente em gangliosídeos, tornou capaz de sensibilizar estas células com a LT de E. coli, respondendo com um aumento no AMP cíclico (86). Todas essas evidências levaram a crer, que os receptores para a TC e LT seriam os mesmos, ou seja, o GM1.

Entretanto, o coleragenóide, toxoide natural da TC, que atuava em muitos experimentos como inibidor competitivo da mesma, em certos casos onde havia sido usado, não inibia a enterotoxina LT de E. coli (58).

Em um estudo dos receptores para as duas enterotoxinas, Holmgren et al (65), analisando enterócitos do intestino delgado de coelho, verificaram que o coleragenóide não inibia a ação da toxina LT de E. coli, inibindo porém a TC.

No mesmo trabalho, os autores confirmaram que o gangliosídeo GM1, é o principal, se não o único, receptor específico para a TC.

Quanto à enterotoxina LT, foi verificado que apenas uma fração dos receptores apresentava as características do GM1, enquanto que a maioria desses (quantitativamente 10 vezes superior ao gangliosídeo GM1), parecia ser de natureza glicoprotéica (65).

Verificaram que as células intestinais de coelho, após terem sido delipidadas por um processo que não extraía glicoproteínas, perderam a capacidade de se ligarem à TC. Por outro lado, a fração delipidada do mesmo seja do duodeno, jejuno ou íleo, ou das membranas dos enterócitos, ainda retinham substancialmente a capacidade de se ligarem à LT de E. coli. O receptor não gangliosídico dessa toxina parece ser de natureza glicoprotéica, por ser resistente à fervura em pH neutro e ser inativado por oxidação pelo periodato.

Trabalhando com intestino de cachorros, Nalin e McLaughlin (89) descreveram, em 1978, que o coleragenóide era capaz de bloquear a secreção de fluido induzida não só pela TC, como também pela LT. Isto sugere que nesta espécie, a maioria dos receptores funcionais para a LT sejam comuns a ambas as toxinas, o que contrasta com os resultados encontrados em coelhos (65).

Recentemente, Holmgren et al (66), trabalhando com células epiteliais do intestino humano e com "brush borders" isolados, demonstraram que a extração dos lipídeos removia completamente os receptores para a TC, mas apenas 50% dos receptores para a LT de E. coli, uma vez que o tecido delipídado ainda retinha a capacidade de se ligar a essa toxina.

Estes autores demonstraram também, que as duas toxinas se ligavam fortemente ao gangliosídeo GM1 e em menor intensidade ao GD1b e a outro monosialogangliosídeo não identificado. Por outro lado, verificaram em resultados obtidos através de cromatografia em camada delgada e auto-radiografia, que os gangliosídeos GM3, GM2, GD3, GD1a e GD1b, não se ligavam à TC e tampouco à LT de E. coli.

Recentemente, foi descrito um novo tipo de enterotoxina LT de E. coli, isolada inicialmente na Tailândia, de fezes diarréicas de búfalo (55,95). Da mesma forma que a TC e o tipo clássico de enterotoxina termolábil de E. coli, o novo padrão de toxina denominado então de LTHI, também era capaz de induzir mudan-

ças morfológicas e de ativar a adenil-ciclase em células Y1 (55) e CHO (47).

Entretanto, ao contrário das demais LTs descritas até o momento neste trabalho, e que podem ser atualmente também denominadas de LThI, quando originárias de amostras humanas e LTpI, quando originárias de amostras suínas, a LTHI não era neutralizada pelos soro anti-TC, anti-LThI nem tampouco pelo anti-LTpI. Por outro lado, antissoros preparados contra a LTHI também não eram capazes de neutralizar as enterotoxinas LThI, LTpI e TC.

Os genes estruturais para as LTIs estão presentes em plasmídios, enquanto que os que codificam para a LTHI, parecem ser cromossomais(44). Sondas genéticas preparadas com os genes para LTpI e LTHI, são tão diferentes em sequência, que não ocorre hibridização entre seus DNAs, mesmo em condições que permitem até 45% de mistura entre os pares de bases.

Quanto a seus efeitos biológicos, a enterotoxina LTHI é 25 a 50 vezes mais potente que a TC ou as LTIs no ensaio em Y1, mas por outro lado, é incapaz de causar uma resposta secretória em alça ligada de coelho, em doses inferiores a 8,8 µg (48).

Quanto a seus receptores, a enterotoxina LTHI, também difere da LThI, LTpI e TC, uma vez que sua toxigenicidade é muito menos susceptível à inibição pelo gangliosídeo GM1, do que por uma mistura de gangliosídeos (48).

Em um levantamento de amostras de E. coli produtoras da enterotoxina LTII em amostras de alimentos e fezes humanas, foram identificadas 6 amostras que se assemelhavam genética e imunologicamente com a LTII (47). Dentre estas a amostra 41, isolada de carne cozida, produzia quantidades de toxina muito superiores às outras 5 amostras. Após a purificação da toxina produzida por esta amostra, verificou-se que ela apresentava certas diferenças em relação à LTII originalmente descoberta.

Com base nas diferenças observadas nos processos de purificação, PI, dose tóxica e tratamento com tripsina, Guth et al (48), propuseram denominar a LTII original de LTIIa e a procedente da amostra 41, isolada em São Paulo, de LTIIb.

Entretanto, no mesmo trabalho, os autores utilizando provas mais sensíveis que testes de imunodifusão, verificaram por radioimunoensaio que existem determinantes em comum entre os grupos LTI e LTII, embora estes sejam pouco imunológicos. Apesar da proposição mencionada acima, de denominarmos de LThI as enterotoxinas termolábeis de E. coli clássicas, de origem humana e de LTpI as de origem suína, tendo em vista a maior facilidade na leitura, convenciamos denominá-las em nosso trabalho, respectivamente, de LTh e LTp. Desta forma, não utilizaremos para as enterotoxinas LTs clássicas, a denominação de LTI.

Ao contrário da LTHI, que não foi identificada nas amostras isoladas em São Paulo pela prova hemolítica da imuno hemólise passiva, adaptada para microplacas (47,104) usando hemácias de carneiro, as LTs e a TC são facilmente detectadas por esta prova e por outros testes envolvendo estes eritrócitos.

Desta forma, tem-se observado que nos eritrócitos de carneiro ocorre uma sensibilização natural dessas células com as enterotoxinas LTs de origem humana e suína e com a TC sem a necessidade de qualquer agente ligante, normalmente descrito como essencial para a sensibilização dessas células com proteínas séricas e outros antígenos protéicos (5,75,81).

Com base nessas características, foi que Evans et al (29,30) desenvolveram em 1977, os testes de inibição da imuno hemólise e imuno hemólise passiva, utilizando uma reação antígeno-anticorpo, para detecção da enterotoxina LT.

Nesta técnica, hemácias de carneiro são sensibilizadas diretamente pelas enterotoxinas LTs preparadas a partir de sobrenadantes de cultura em meio líquido, em especial, o meio de "Casamino Acids East Extract (CAYE)". Posteriormente, estas hemácias sensibilizadas são expostas à antitoxina colérica ou anti-LTs, sendo que após a adição de complemento às reações, ocorre a lise das células e consequente liberação de hemoglobina, que é então medida espectrofotometricamente.

Em trabalhos posteriores, Serafim et al (104), demonstraram que de acordo com a origem da amostra, resultados diferentes eram observados no teste de imuno-hemólise passiva, levando-os a supor, desde 1979, que a LT de origem humana poderia ser diferente da de origem suína.

Posteriormente, Castro et al (10) introduziram modificações nessa prova, que aumentaram a sensibilidade do teste, principalmente na detecção de amostras enterotoxigênicas de E. coli originárias de suínos, substituindo o tampão PBS, normalmente utilizado, pelo veronal contendo íons Ca^{++} e Mg^{++} .

A seguir, a prova hemolítica utilizada na detecção das enterotoxinas LTs e TC foi adaptada por Serafim et al (105), para uma base sólida de agarose. Nessa prova, denominada de imuno-hemólise radial simples, os autores propuseram que hemácias de carneiro fossem inicialmente sensibilizadas pelos sobrenadantes de cultura das enterotoxinas e misturados à agarose, sendo então a mistura vertida sobre uma lâmina de vidro. Posteriormente, eram abertos orifícios no gel, onde se aplicavam os antissoros específicos e por fim, vertia-se complemento sobre a lâmina.

Desta forma, nesta prova apenas uma amostra podia ser analisada por lâmina. Posteriormente, Yano et al (127) propuseram uma modificação deste teste, onde várias amostras poderiam ser analisadas por lâmina. Pela modificação proposta, o suporte de agarose deveria ser preparado com hemácias de carneiro normais, onde se

riam abertos pequenos orifícios para a aplicação de sobrenadantes de cultura de amostras de E. coli provavelmente enterotoxigênicas.

Após um período de difusão, onde as enterotoxinas teriam possibilidade de contatar com as hemácias de carneiro sensibilizando-as, nos mesmos orifícios eram aplicados os antissoros específicos e posteriormente complemento era vertido sobre as lâminas.

Recentemente, Ricci e Castro (97) utilizando-se, mais uma vez, da característica das hemácias de carneiro se sensibilizarem pelas enterotoxinas LT de origem humana e suína além da TC, desenvolveram a prova de hemaglutinação indireta. Neste teste, hemácias sensibilizadas pelas enterotoxinas são colocadas em uma lâmina de vidro, onde se adicionam antissoros anti-TC ou anti-LTs, preparados em coelhos, seguida da adição de anti-IgG de coelho. Sô com a adição deste segundo antissoro, à semelhança do que se observa na caracterização do fator Rh, é que se obtém hemaglutinação positiva, com amostras ETEC produtoras de LT.

Com base na adsorção natural observada nas provas hemolíticas de imuno-hemólise radial e com base na semelhança observada entre a TC e as LTs, Yano et al, relataram na discussão de seu trabalho (127), que seria o gangliosídeo GM1 o receptor responsável pela adsorção destas enterotoxinas às hemácias de carneiro, sem terem entretanto, qualquer dado experimental e concreto à respeito.

Na vasta literatura consultada, ao contrário do que já se faz no estudo dos receptores para fímbrias de aderência, até o momento o modelo em hemácias, nunca foi utilizado para se pesquisar os receptores para as enterotoxinas LTs e tampouco para a TC.

Em vista das considerações apresentadas até o momento, e da facilidade dos modelos "in vitro", utilizando provas sorológicas envolvendo hemácias que se sensibilizam pelas enterotoxinas LTs e TC, nos propusemos no estudo dos receptores destas toxinas, a desenvolver os seguintes objetivos:

1. Caracterizar os receptores encontrados nas hemácias de carneiro, que promovem a adsorção das enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, a essas células, utilizando as provas hemolíticas de imuno-hemólise radial e a hemaglutinação in direta.
2. Verificar a sensibilidade de outros eritrócitos às enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, através de provas hemolíticas e pela hemaglutinação indireta.
3. Verificar o efeito de fatores físico-químicos, sobre a ligação das enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, às hemácias de carneiro.
4. Estudar o efeito de diversas enzimas e substâncias, sobre receptores para as enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, encontrados nas hemácias de carneiro.

5. Verificar o envolvimento das frações gangliosídicas de eritrócitos, na adsorção das enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, à essas células.
6. Verificar a inibição das reações sorológicas de detecção das enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, por gangliosídeos purificados.
7. Verificar a inibição das reações sorológicas de detecção das enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, pelas frações gangliosídicas extraídas de hemácias.
8. Verificar a inibição de atividades biológicas das enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, pelas frações gangliosídicas extraídas de hemácias.
9. Uma vez que não se conhecem as condições que fazem com que o efeito da doença clínica causada pela TC e pelas LTs sejam tão diferentes, procuraremos utilizar o nosso modelo "in vitro", para verificarmos possíveis diferenças entre os receptores para estas enterotoxinas.
10. Considerando-se a facilidade do modelo "in vitro" e as evidências de que a sensibilização dos eritrócitos de carneiro, pelas enterotoxinas LTs e TC, só pode ser devida à presença de receptores específicos nessas células, esperamos contribuir com este estudo, para um melhor entendimento da relação destas enterotoxinas, com membranas celulares.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Selecionamos para o trabalho, 28 amostras de E. coli procedentes de casos de diarréia no homem e em suínos. Destas amostras, 10 eram de origem humana, sendo 8 ETEC e 2 não enterotoxigênicas e 18 de origem suína, sendo 16 ETEC e 2 não enterotoxigênicas. Todas as amostras enterotoxigênicas selecionadas eram produtoras da enterotoxina termolábil LT (LT⁺).

Em algumas provas no decorrer do nosso estudo, trabalhamos com apenas uma amostra de origem humana (40T) e uma de origem suína (0149/6), tomadas como padrão, comparando-se os resultados obtidos nessas provas, com os fornecidos pela TC.

2.2. Preparo das Toxinas e Antissoros

Na maioria das provas realizadas durante a nossa pesquisa, utilizamos preparados brutos das enterotoxinas LT, obtidos a partir de sobrenadantes das amostras de E. coli cultivadas em meio de "casamino acids yeast extract (CAYE)", segundo Castro et al (10).

As amostras em estudo foram semeadas em Erlenmeyers de 125 ml, contendo 10 ml do meio de CAYE e incubadas a 37°C em estufa de agitação (150 rpm), por 18 horas. Após esse período, as

culturas foram então centrifugadas a 3000 rpm a 4°C, por 40 minutos.

Com as amostras 40T e 0149/6 selecionadas, preparamos 500 ml de enterotoxina LT bruta, respectivamente denominadas LT humana (LTh) e LT suína (LTp), pela mesma metodologia descrita acima. Tais sobrenadantes de cultura, foram posteriormente utilizados em diversas provas de inibição de reações sorológicas de detecção da LT, por substâncias químicas, enzimas, gangliosídeos e frações gangliosídicas extraídas de hemácias.

Em algumas provas trabalhamos com a LT de E. coli purificada segundo o método descrito por Clements e Finkelstein (13), a partir das amostras H-10407, de origem humana e 0149/8, de origem suína. No processo de purificação, as amostras foram inicialmente cultivadas em meio de Mundell por 6 h a 37°C e posteriormente semeadas num microfermentador de bancada (Microferm Fermentor - MF 114 - New Brunswick Scientific Co. Inc.), contendo 3000 ml do mesmo meio.

Após 18 h de cultivo, o sedimento bacteriano foi separado do sobrenadante de cultura, por centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos e ressuspenso em tampão Tris-HCl, 0,01M, NaCl 0,9%. A suspensão bacteriana assim obtida recebeu, então, um tratamento de ultra-som (Heat Systems Ultrasonics, Inc. - W185 - Branson Sonic Power Co.), por 18 mi-

nutos em três períodos intermitentes, com 50 Watts de voltagem. O material sonicado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos e seu sobrenadante posteriormente precipitado com 60% de sulfato de amônio. Após a diálise do precipitado, este foi cromatografado em uma coluna de Bio Gel A5m (Bio Rad Laboratories - Richmond, California), equilibrada com tampão TEAN (13). A eluição do material procedeu-se com o mesmo tampão, posteriormente acrescido de 0,3M de D-gá lactose.

As frações eluidas que continham a LT, detectável por reações sorológicas, foram reunidas e concentradas para o volume de 2 ml por ultrafiltração (Amicon) e cromatografadas em uma coluna de Sephacryl S-200.

Toxina colérica purificada, sob a forma liofilizada, foi adquirida junto à Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Esta, foi dissolvida em PBS 0,05M, para a concentração de 1 mg/ml e em seguida armazenada em alíquotas de 100 μ l, a -20°C.

Com as enterotoxinas LTs, de origem humana e suína purificadas e com a TC, foram preparados vários soros, inoculando-se coelhos por via intramuscular, com 50 μ g das mesmas, em adjuvante completo de Freund (ACF). Após 25 e 50 dias do início da inoculação, repetiu-se a dose em adjuvante incompleto de Freund (AIF), sangrando-se então os animais após 10 dias, para prova.

Os antissoros preparados em coelhos foram utilizados nas provas de hemaglutinação indireta (97), juntamente com o soro anti-IgG de coelho, preparado em carneiro. No preparo deste último soro, os animais foram inoculados por via intramuscular, com 1 mg de imunoglobulina G de coelho (Sigma), emulsionada em ACF. Doses adicionais foram administradas após 25 e 50 dias, sangrando-se os animais após 10 dias, para prova.

Com a TC, preparou-se também em cavalo a respectiva antitoxina, inoculando-se 800 µg de toxina no animal, por via intramuscular, utilizando-se o ACF. Doses de reforço foram administradas após 25 e 50 dias, em AIF, procedendo-se então a sangria para prova.

Todos os soros utilizados no trabalho, foram inativados a 56°C por 30 minutos e absorvidos por 3 vezes com a papa das hemácias correspondentes as dos testes em que seriam utilizados.

2.3. Hemácias

Coletamos hemácias das seguintes origens: carneiro, cobaia, coelho, boi e do homem. O sangue foi coletado em solução de Alsever, mantido a 4°C e utilizado para os testes em um prazo máximo de 20 dias. No caso das hemácias de cobaia, procedeu-se a coleta de sangue sempre no dia do uso.

2.4. Técnicas Sorológicas Para Detecção das Enterotoxinas LTs e TC

Na detecção das enterotoxinas LTs e da TC, utilizamos como provas sorológicas hemolíticas, a imuno-hemólise passiva (IHP) (10), imuno-hemólise radial modificada (IHR) (127) e imuno-hemólise radial simples (IHRS) (105), estas duas últimas desenvolvidas sobre um suporte de agarose.

Em todos os testes hemolíticos, as hemácias foram inicialmente lavadas em solução fisiológica e tampão de trietanolamina (79). Com a papa de hemácias obtida, foi preparada uma suspensão no mesmo tampão, que diluída a 1/20 em água destilada, tivesse uma absorção correspondente a 0,42 de D.O. a 550 nm.

O teste de IHP foi realizado seguindo-se as indicações de Serafim et al (104) e Castro et al (10). A única alteração por nós introduzida, foi a substituição do tampão veronal, pelo de trietanolamina. Foram consideradas como positivas, as reações cuja liberação de hemoglobina foi igual ou superior a 30 µg/ml ($A_{420} = 0,17$) (10).

A IHR foi realizada em tampas de placas de microtítulo de 8x12 cm, misturando-se 1,3 ml de hemácias padronizadas a 14,6 ml de agarose a 1% em tampão de trietanolamina, acrescido de 0,02% de azida sódica como conservante. Após a solidificação

do gel, foram feitos orifícios de 4 mm no mesmo, nos quais 15 µl de cada amostra a ser analisada foram aplicados.

As placas de agarose permaneciam então, à temperatura ambiente por 18 horas, aplicando-se após esse período, 15 µl de soro de cavalo antitoxina colérica, deixando-se difundir o mesmo, por cerca de 4 horas. Complemento de cabaia diluído 1/10 no tampão de trietanolamina, era então vertido sobre as placas até cobri-las, permanecendo as mesmas a 37°C por 2 horas. A leitura e respectiva medida dos halos hemolíticos eram feitas após 18 horas de permanência das placas à temperatura ambiente.

A prova de IHRS, foi desenvolvida com he mácias padronizadas como nos testes anteriores, sensibilizadas V/V com as enterotoxinas a 37°C por 30 minutos e misturadas no volume de 0,5 ml, a 2,5 ml de agarose a 1%, preparada no tampão de trietanolamina acrescido de 0,02% de azida sódica. A mistura era então vertida sobre lâminas de vidro de microscópio e uma vez estando a agarose solidificada, orifícios de 4 mm eram feitos no gel, onde se aplicavam 15 µl de antitoxina colérica.

Após 18 h à temperatura ambiente, em câmara úmida, as lâminas eram cobertas com complemento diluído a 1/10 em tampão de trietanolamina e co

locadas a 37°C por 2 h, procedendo-se então, a leitura dos halos hemolíticos.

Nas provas de IHR e IHRS, uma vez que os orifícios abertos no gel eram de 4 mm, consideramos como positivas, as provas cujos halos hemolíticos eram superiores ou iguais a 5 mm. Na determinação dos títulos das toxinas, estes foram definidos como as maiores diluições destas que apresentassem um halo de hemólise maior ou igual a 5 mm.

De maneira geral, utilizamos nas provas hemolíticas de IHP, IHR e IHRS, o soro antitoxina colérica preparado em cavalo.

Finalmente, como técnica sorológica de detecção das enterotoxinas LTs e TC, usamos a prova não hemolítica da hemaglutinação indireta (HI), desenvolvida segundo Ricci e Castro (97). Desta forma, hemácias padronizadas da mesma maneira que para os testes anteriores, foram inicialmente sensibilizadas V/V, com as enterotoxinas LTs e TC, por 30 minutos a 37°C. Após esse período, aplicou-se 18 µl das hemácias sensibilizadas em lâminas de vidro, acrescentando-se igual volume de antitoxina colérica, preparada em coelho. Após homogeneização da reação com um palito estéril, acrescentou-se soro de carneiro anti-IgG de coelho, homogeneizando-se novamente a mistura. Dentro de 2

minutos realizava-se então a leitura da prova, contra um fundo branco. A presença de hemaglutinação, refletia um resultado positivo. Na determinação dos títulos das enterotoxinas, estes foram defi-nidos como as maiores diluições das mesmas que quando misturadas às hemácias e analisadas pela HI, apresentaram ainda, reações de hemaglutinação positiva.

Com exceção dos casos onde se coloca ex-plícito o uso de outros eritrócitos, as provas sorológicas foram sempre realizadas com hemácias de carneiro.

2.5. Adaptação das Técnicas Sorológicas de Detecção das Enterotoxinas LTs de Origem Humana e Suína e da TC, a Eritrócitos de Diferentes Origens

Eritrócitos procedentes de coelho, cobaia, galinha, boi e do homem, foram estudados quanto à sua possível sensibilização pelas enterotoxinas LTs, de origem humana e suína.

Desta forma, as provas de IHP, IHR e HI, foram desenvolvidas com as referidas hemácias, ten-do sido as anti-TC, preparadas em cavalo ou em coe-lho, usadas nestas provas absorvidas previamente com as mesmas. Os resultados obtidos quanto à reações sorológicas positivas na detecção de diferentes amostras enterotoxigênicas de E. coli, de

origem humana e suína, foram sempre correlacionados com os observados nos testes feitos nas mesmas condições, com hemácias de carneiro.

Com relação à TC, procedemos de maneira semelhante, utilizando entretanto, apenas as provas de IHR e HI nos testes de sensibilização e hemácias procedentes de boi, cobaia e do homem.

2.6. Estudos do Efeito de Diferentes Fatores Físico-Químicos, na Ligação das Enterotoxinas LTh, LTp e TC a Receptores em Hemácias de Carneiro

2.6.1. Efeito do pH

A fim de verificarmos o efeito da concentração hidrogeniônica sobre a ligação das enterotoxinas LTs e da TC, aos receptores em hemácias de carneiro, analisamos esta reação em diferentes pHs.

Desta forma, hemácias de carneiro foram lavadas e padronizadas a uma absorvância de 0,42 a 550 nm, em tampão de trietanolamina com o pH acertado para os seguintes valores: 8,5, 7,2 e 5,0.

Em tubos eppendorfs, misturamos então, 0,6 ml das diferentes suspensões de hemácias de carneiro a 0,6 ml de diferentes diluições das enterotoxinas LTh, LTp e

TC, diluídas em razão de 2 nos tampões correspondentes.

A mistura permaneceu a 37°C por 30 minutos, após os quais as células foram lavadas por 3 vezes com tampão de trietanolamina, pH 7,2. O sedimento final, representado pelas hemácias lavadas, foi então ressuspense em 0,6 ml do tampão normal, sendo que 0,5 ml desse volume, foi misturado a 2,5 ml de agarose a 1% e analisado pela prova de IHRS e o restante utilizado na prova de HI, determinando-se pelos dois testes, o título das enterotoxinas em estudo.

2.6.2. Efeito do Tempo de Contato

Para avaliarmos a influência do tempo de contato na adsorção da LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro, estas foram misturadas, interrompendo-se o tempo de contato e verificando-se a sensibilização das mesmas.

Desta forma, as hemácias foram lavadas e padronizadas em tampão de trietanolamina, sendo que 0,6 ml dessa suspensão, foram misturados em eppendorfs, ao mesmo volume de diferentes diluições das toxinas.

Após os períodos de 2, 5, 15 e 30 minutos de contato, as hemácias foram imediatamente centrifugadas a 12.000 rpm por 30 segundos, em microcentrífuga (Beckman - Microfuge B) e lavadas três vezes em tampão de trietanolamina. As hemácias lavadas foram então ressuspensas no mesmo tampão, no volume de 0,6 ml, sendo que 0,5 foram misturados a 2,5 ml de agarose a 1%, procedendo-se a prova de IHRS e o volume restante, utilizado nos testes de HI, determinando-se por ambos os testes o título das enterotoxinas.

2.6.3. Efeito da Temperatura de Incubação

Para podermos analisar o efeito da temperatura na adsorção das enterotoxinas LTh, LTp e TC, às hemácias de carneiro, estas foram incubadas em diferentes condições. Desta forma, hemácias de carneiro foram lavadas e padronizadas, misturando-se então, 0,6 ml dessa suspensão a 0,6 ml de diferentes diluições das toxinas, obtidas em razão de 2. As diferentes misturas foram em seguida, incubadas às temperaturas de 4 e 22°C, sendo os resultados obtidos, comparados aos observados a 37°C.

Após 30 minutos de sensibilização, os tubos eppendorfs contendo as hemácias mais as toxinas, foram centrifugados em microcentrífuga a 12.000 rpm por 30 segundos, lavando-se as células por 3 vezes em tampão de trietanolamina.

Com as hemácias assim sensibilizadas, procedeu-se a prova de IHRS e a HI, determinando-se por ambos os testes o título das enterotoxinas.

2.7. Efeito de Diferentes Substâncias Químicas, em Receptores da Hemácia de Carneiro, para as Enterotoxinas LTh, LTp e TC

2.7.1. Carboidratos e Poliálcoois

Conhecendo-se a afinidade da LT pela D-galactose, através dos trabalhos de sua purificação (13) e supondo-se que os receptores para as LTh, LTp e TC em hemácias de carneiro, poderiam eventualmente serem inativados por mono e dissacarídeos, realizamos diversos testes de IHR, na presença desses açúcares, bem como de alguns poliálcoois.

Deste modo, as hemácias de carneiro foram inicialmente lavadas e padronizadas em tampão de trietanolamina, contendo 1% de diferentes carboidratos e poliálcoois, procedendo-se então, a prova de IHR.

Foram analisados quanto a uma possível inibição da reação, os seguintes açúcares e poliálcoois: maltose, lactose, rafinose, D-manose, dulcitol, glicose, metil D-glicosídeo, D-galactose, sorbitol, arabinose, inositol e celobiose. Com relação a essas provas, foram verificados os halos de hemólise de 24 sobrenadantes de cultura de E. coli em meio de CAYE, preparados a partir de amostras enterotoxigênicas, de origem humana e suína, sabidamente produtoras de LT.

2.7.2. Enzimas

Com a finalidade de tentarmos verificar a provável constituição química dos receptores para a LTh, LTp e TC encontrados no nosso modelo de estudo, a hemácia de carneiro, nos propusemos a estudar o efeito de diferentes enzimas sobre a mesma.

Desta forma, as enterotoxinas foram tituladas por testes sorológicos utilizando-se hemácias de carneiro tratadas por diferentes concentrações das seguintes enzimas: neuraminidase, tripsina, protease, papaina, dextranase e ribonuclease (126).

As enzimas foram diluídas segundo Bartus et al (6), utilizando-se 0,05M HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazine-N'-2'-etanosulfônico), como tampão. Na Tabela 1, temos a procedência das enzimas, as concentrações das mesmas que foram testadas e os respectivos diluentes acrescidos do sal acima mencionado, tendo sido o pH final das soluções, acertado com NaOH 0,1N e HCl 0,1N.

Em todos os experimentos enzimáticos, as hemácias de carneiro foram inicialmente lavadas e padronizadas no tampão correspondente da reação (Tabela 1). Separou-se então, em tubos de vidro, 4,0 ml da suspensão de hemácias padronizadas, que foram centrifugadas e ressuspensas no mesmo volume, com as diferentes concentrações das enzimas em análise. Em cada experimento, reservava-se um dos tubos para controle da reação, com as hemácias ressuspensas apenas no tampão diluente das enzimas.

As hemácias permaneciam em contato com as respectivas enzimas por uma hora a 37°C, após a qual eram centrifugadas e lavadas três vezes em tampão de trietanolamina.

Uma vez lavados, os eritrócitos eram ressuspensos em 4,0 ml do mesmo tampão, sendo que 1,3 ml desta suspensão de hemácias eram misturados a 14,6 ml de agarose a 1%, procedendo-se a prova de IHR. O restante era utilizado nas provas de HI, sendo que por ambas as técnicas titulou-se as enterotoxinas LTh, LTp e TC.

O estudo da enzima neuraminidase sobre os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC em hemácias de carneiro, foi estendido para as hemácias de origem humana e de cobaia, utilizando-se para tal, a mesma metodologia descrita acima.

Tabela 1. Reagentes e respectivas concentrações, utilizadas nos ensaios enzimáticos

Reagente	Origem	Diluyente	pH	Concentrações Analisadas
Neuraminidase	SIGMA	PBS	6,0	100, 50, 25, 15, 10, 5 e 1. mu/ml
Tripsina	SIGMA	0,9% NaCl + 1mM CaCl ₂	7,6	10, 2, 1, 0,5, 0,25, e 0,125 mg/ml
Protease	SIGMA	PBS + 1mM Ca ⁺⁺ 1mM Mg ⁺⁺	7,0	2,5, 1,25, 0,675, 0,3115, 0,15625 e 0,078125 mg/ml
Papaina	SIGMA	PBS	6,5	0,1, 0,05, 0,025 e 0,0125 mg/ml
Dextranase	SIGMA	PBS	6,0	25, 10, 5, 2,5 e 0,25 U/ml
Ribonuclease	SIGMA	PBS + 1mM Ca ⁺⁺ 1mM Mg ⁺⁺	7,5	10, 2,5, e 0,675 mg/ml

2.7.3. Substâncias Químicas Diversas

De maneira semelhante aos tratamentos enzimáticos, as hemácias de carneiro foram tratadas por diversas substâncias químicas para que pudéssemos verificar o efeito das mesmas sobre os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC.

As substâncias que analisamos foram: periodato de sódio, EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético), uréia, mercaptoetanol, sulfito de sódio, desoxicolato de sódio e guanidina-HCl.

Temos na Tabela 2, a procedência, diluentes e as respectivas concentrações utilizadas de cada uma dessas substâncias, no decorrer do nosso estudo.

De maneira semelhante à metodologia já descrita quando nos tratamentos enzimáticos, inicialmente as hemácias de carneiro foram lavadas e padronizadas nos tampões diluentes, correspondentes à cada substância (Tabela 2). Em diferentes tubos de ensaio, distribuimos 4 ml de cada suspensão de hemácias, que foram em seguida centrifugadas. O sedimento obtido foi então ressuspenso em igual volume das diferentes concentrações das substâncias, deixando-se a mistura incubada a 37°C por 1 h.

Sempre em cada experimento, reservava-se um dos tubos para controle da reação, ressuspendendo-se as hemácias apenas no tampão diluente.

Após o período de incubação, as hemácias foram lavadas três vezes em tampão de trietanolamina e ressuspensas em 4 ml do mesmo. A partir desta última suspensão, procediam-se as provas de IHR e HI, realizadas com as hemácias tratadas, titulando-se as enterotoxinas LTh, LTp, e TC. Os títulos obtidos nestes testes, eram então comparados aos observados nas provas controle, realizadas com hemácias não tratadas pelas substâncias em questão.

Tabela 2. Substâncias químicas usadas no estudo dos receptores em hemácias de carneiro, para as enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c.

Reagente	Origem	Diluyente	pH	Concentrações Analisadas (moles/ml)
periodato de NA	SIGMA	0,9% NaCl	6,7	0,05; 0,001; 0,0025
EDTA	SIGMA	PBS 0,05M	7,4	0,1; 0,05; 0,025
uréia	ECIBRA	PBS + 1mM Ca ⁺⁺ + 1mM Mg ⁺⁺	7,2	0,5; 0,25; 0,1; 0,05;
mercaptoetanol	SIGMA	PBS 0,05M pH 7,4		0,2; 0,1; 0,05; 0,025
sulfito de NA	ECIBRA	PBS + 1mM Ca ⁺⁺ + 1mM Mg ⁺⁺	7,4	0,2; 0,1; 0,05; 0,025
desoxicolato de Na	MERCK	PBS 0,05M	7,4	0,005; 0,0025
guanidina HCl	SIGMA	PBS + 1mM Ca ⁺⁺ + 1mM Mg ⁺⁺	7,4	0,1; 0,02; 0,01 e 0,005

- a) Preparado bruto de enterotoxina da amostra de E. coli 40T, de origem humana.
b) Preparado bruto de enterotoxina da amostra de E. coli 0149/6, de origem suína.
c) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.

2.7.4. Efeito do Formol

Para verificarmos a estabilidade dos receptores para LTh, LTp e TC em hemácias de carneiro, após o tratamento com formol, analisamos primeiramente a toxigenicidade dos sobrenadantes de cultura preparados com 9 amostras de origem humana e 9 de origem suína, através da técnica de HI, utilizando hemácias formolizadas. Foram determinados também os títulos das enterotoxinas LTh, LTp e TC, obtidos com hemácias frescas e formolizadas, através da mesma técnica.

Para a técnica de formolização, procedeu-se segundo Ingrahan (79), sendo que a adição do formol às hemácias foi gradual e após termos atingido a concentração final de 8%, a suspensão celular ainda permaneceu sob agitação constante por 18 h a 4°C.

Nas reações de HI realizadas com hemácias formolizadas, utilizamos, além do antissoro anti-TC, os soros anti-LT de origem humana e suína, adsorvidos com estas hemácias. Os resultados observados foram comparados aos obtidos com hemácias não tratadas com formol.

2.8. Extração das Frações Gangliosídicas, a partir das Membranas de Eritrócitos de Carneiro, Boi e Cobaia

Com o objetivo de verificarmos se os receptores para as enterotoxinas LTs e TC estariam presentes nas frações gangliosídicas, estas foram extraídas dos eritrócitos de carneiro, boi e cobaia, segundo o método descrito por Suzuki (114). Assim sendo, coletamos em solução de Alsever aproximadamente 500 ml de sangue dos animais mencionados acima. O sangue obtido foi então centrifugado e as hemácias sedimentadas, lavadas três vezes em solução fisiológica. Após a lavagem, as hemácias foram lisadas em tampão fosfato pH 6,8, 0,001M.

Em seguida, este material foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos e, com a finalidade de eliminarmos a hemoglobina liberada, lavado por duas vezes consecutivas, nas mesmas condições, com o tampão de lise.

O sedimento resultante das hemácias lisadas, foi então ressuspense em 20 volumes de uma mistura de cloroformio e metanol (2:1), permanecendo na mesma por 24 h a 4°C, sob agitação constante. O homogeneizado obtido após esta extração, foi filtrado em papel Whatman nº 1 e o resíduo retido novamente homogeneizado em 10 volumes de uma mistura de cloroformio e metanol (1:2). Após permanecer a 4°C por mais 4 horas, o resíduo foi nova-

mente filtrado. Misturamos então os filtrados obtidos após as duas extrações e, mais cloroformio foi adicionado, até alcançarmos a proporção de cloroformio/metanol, igual a 2:1.

Aos filtrados, acrescentou-se na proporção de 1/5 do volume, uma solução de KCl a 0,88%. Após esse procedimento, os materiais foram homogeneizados e colocados em uma proveta de 1000 ml. Uma vez estando as fases bem distintas, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retiramos a fase superior aquosa, enquanto que a fase inferior foi concentrada em um evaporador rotatório.

Ao concentrado da fase inferior, acrescentamos KCl a 0,88%, metanol e cloroformio na proporção de 47:48:3 (V/V/V). A mistura assim preparada, foi novamente colocada em uma proveta de 500 ml e mantida em repouso para que pudéssemos obter uma boa separação de fases. Mais uma vez, retiramos com uma pipeta Pasteur a fase superior aquosa e concentramos a fase inferior em um evaporador rotatório. Ao volume restante, acrescentou-se, agora, água, metanol e cloroformio, na proporção de 47:48:3 (V/V/V). Novamente a mistura permaneceu em uma proveta de 500 ml, sendo que nesta última separação das fases, por um período mais longo, de aproximadamente 48 h, tendo em vista a dificuldade de visualização das diferentes fases.

A fase aquosa superior foi retirada, reunida com as anteriores e concentradas em evaporador rotatório, tendo sido o resíduo resultante, dissolvido em tampão Tris-HCl 0,01M, pH 7,2 e dializado contra o mesmo tampão por 16 h. As frações gangliosídicas assim obtidas das diferentes hemácias, foram então separadas em alíquotas de 200 μ l e estocadas a -20°C .

2.9. Dosagem do ácido siálico

A quantidade de ácido siálico presente nas frações gangliosídicas das diferentes hemácias foi dosada colorimetricamente, pela técnica do resorcinol-HCl, desenvolvida por Svennerholm (115).

Nesta técnica, preparamos um reativo contendo 0,2 g de resorcinol, misturado a 0,25 ml de sulfato de cobre 0,1M, acrescido de 80 ml de HCl concentrado, tendo sido o volume completado para 100 ml com água destilada.

Para a dosagem do ácido neuramínico, misturamos em duplicata, 2 ml de uma diluição a 1/20 das frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, boi e cobaia a 2 ml do reativo descrito acima.

Como controle, misturou-se à mesma reação a ser dosada, 2 ml do reativo, sem o resorcinol.

Paralelamente, consideramos como padrão do ácido siálico, a mistura de gangliosídeo tipo II, purificada a partir de cérebro bovino (SIGMA), contendo aproximadamente 20% de ácido N-acetilneuramínico. A suspensão padrão de gangliosídeos tipo II foi, então, diluída a 15 e 30 µg de ácido siálico por ml, com tampão Tris-HCL, 0,01M, pH 7,2.

Com cada uma dessas diluições padrão, montou-se o mesmo esquema de reação descrito acima para a dosagem de ácido siálico nas frações gangliosídicas extraídas das hemácias. Os tubos com as soluções foram, então, aquecidos em água fervente por 15 minutos e em seguida, resfriados em água corrente.

A cada tubo adicionou-se 5 ml de álcool amílico, agitando-se vigorosamente os mesmos. Após esse procedimento, as reações foram deixadas em banho de gelo por 15 minutos, após os quais transferiu-se o conteúdo dos tubos para caçapas de vidro, centrifugando-se as mesmas a 1.000 rpm por 2 minutos.

Antes da leitura espectrofotométrica, os tubos foram mantidos em banho de gelo, retirando-se para a medida da absorvância, a fase superior amílica, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Esta, foi realizada a 580 nm, sendo a leitura dos tubos controle, subtraída das amostras em teste. A quantidade de ácido siálico dos preparados em teste, foi calculada pela comparação das absorvâncias

obtidas, com as das soluções padrão.

A dosagem de proteínas nas frações gangliosídicas obtidas das hemácias de carneiro, boi e cobaia, foi realizada segundo a técnica de Hartree (51), com o reativo de Folin-Ciocalteu.

2.10. Cromatografia em Camada Delgada de Silica Gel

A cromatografia em camada delgada foi desenvolvida segundo o método de Penick et al. (93), com algumas modificações. Placas de vidro de 20 x 20 cm, foram preparadas com uma mistura de 25 g de Kieselguhr G (MERCK) e 25 g de sílica gel G (MERCK) suspensos em 100 ml de água destilada. As placas foram então secas ao ar em temperatura ambiente e lavadas com uma mistura de metanol-éter, (V/V), permitindo-se que o solvente ascendesse nas mesmas, dentro de uma câmara de vidro.

Após essa lavagem, novamente as placas foram secas ao ar e guardadas em suportes de madeira, sendo que imediatamente antes de serem utilizadas, eram aquecidas a 120°C por 90 minutos. Nas placas, as soluções dos gangliosídeos, quer padrão quer em análise, foram aplicadas em alíquotas de 5 µl, com o auxílio de aplicadores de acrílico, deixando-se uma distância mínima de 1 cm entre as aplicações. Após cada aplicação, os materiais eram completamente secos com o auxílio de um secador de ca

belos, s3o ent3o procedendo-se a aplica33o de alíquotas subseqüentes, até atingirmos a concentra33o apropriada de 15 µg de 3cido si3lico por fra33o gangliosídica dos eritr3citos em estudo.

A cromatografia ascendente nas placas de sílica gel foi desenvolvida com uma mistura de sol_uventes contendo n-propanol e 3gua destilada na propor33o de 7:3 (V/V). As placas foram ent3o novamente secas ao ar e reveladas no interior de uma capela, aspergindo-as com o reagente de resorcinol, o mesmo utilizado na dosagem do 3cido si3lico, com o auxílio de um vaporizador de vidro propulsionado pela saída de ar de uma bomba de v3cuo manual.

Para o desenvolvimento da colora33o indicativa de 3cido si3lico ap3s a aplica33o do reagente, as placas cromatografadas foram cobertas com uma placa de vidro e colocadas em estufa a 130-135°C, por 20 minutos.

2.11. Inibi33o das Rea333es Sorol3gicas de IHR e HI, na Detec33o das Enterotoxinas LTh, LTp e TC, por Preparados Lisados e Delipidados de Hem3cias de Carneiro e de Boi

Para verificarmos se as hem3cias de carneiro e as de boi, submetidas ao tratamento com clo_rof3rmio e metanol para extra33o da fra33o gangliosídica, haviam perdido os receptores para as ente-

rotoxinas LTh, LTp e TC, realizamos diversos experimentos com o estroma obtido após esse procedimento.

Utilizamos ainda para estudos comparativos, membranas dos eritrócitos destes mesmos animais, obtidas após simples lise das células em tampão fosfato 0,001M, pH 6,8. Tanto o estroma delimitado, como a suspensão lisada dessas hemácias, foram centrifugados a 10.000 rpm por 40 minutos, por três vezes. Em ambos os casos, os precipitados obtidos após as lavagens dos materiais, foram ressuspensos em PBS 0,05M e liofilizados. Prepararam-se então, suspensões contendo 20 mg dos liofilizados por ml de PBS, que foram homogeneizadas por tratamento em aparelho de ultra-som (Heat Systems Ultrasonics, Inc. - W185 - Branson Sonic Power Co.), com 50 watts de voltagem por 30 minutos, em banho de gelo.

Em seguida, volumes de 0,5 ml de cada preparação, ou sejam, as obtidas por tratamento das hemácias com cloroformio e metanol ou as resultantes do processo de lise, foram adicionadas a tubos de ensaio e misturadas a 0,5 ml das enterotoxinas LTh, LTp e TC, esta última contendo 10 µg/ml. As misturas permaneceram a 37°C por uma hora, após a qual foram centrifugadas a 10.000 rpm por 40 minutos, diluindo-se os sobrenadantes obtidos com tampão de trietanolamina, na razão de 2.

Verificou-se então o título das enterotoxinas LTh, LTp e TC, após terem tido contato com os preparados delipidados e lisados das hemácias de carneiro e de boi, pelas provas de IHR e HI.

Paralelamente, determinou-se, pelas mesmas técnicas, o título destas enterotoxinas quando não tratadas pelos preparados mencionados acima.

2.12. Inibição Pelos Gangliosídeos GM1, GD1a e GT1 das Reações Sorológicas de IHR e HI, na Detecção das Enterotoxinas LTh, LTp e TC

Para verificarmos a possibilidade de inibição da ligação das enterotoxinas LTs e TC, aos receptores das hemácias de carneiro, pelos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1, estes foram misturados às toxinas, antes de serem as mesmas tituladas pelas provas de IHR e HI. Os gangliosídeos em questão foram adquiridos puros, junto à Supelco Incorp., Bellefonte, Pa (U.S.A.), na concentração de 5 mg/ml e distribuídos em alíquotas de 100 µl, mantidas a -20°C.

Inicialmente, as enterotoxinas LTs, de origem humana e suína, purificadas respectivamente a partir das amostras 10407 e 0149/8, foram diluídas na razão de 2 com tampão de trietanolamina.

Idêntico procedimento foi adotado para a TC, partindo-se de uma solução contendo 0,08 µg/ml, e para as enterotoxinas LTh e LTp.

Em microplacas, misturamos então 100 µl das enterotoxinas acima mencionadas, não diluídas e diluídas, a 100 µl dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1, na concentração de 100 µg/ml. As misturas permaneceram em banho-maria a 37°C, após terem sido recobertas com uma fita adesiva. Findo esse período, 15 µl das diferentes misturas foram aplicadas em placas de agarose, preparadas com hemácias de carneiro e analisados pela IHR (125). Paralelamente, 50 µl das mesmas misturas foram também utilizadas em provas de HI (97), após terem sido misturadas às hemácias de carneiro padronizadas.

Por outro lado, titulamos estas enterotoxinas pelas provas de IHR e HI, para podermos comparar os títulos aos obtidos após a mistura com os gangliosídeos GM1, GD1a e GT1.

Para verificarmos qual dos três gangliosídeos pesquisados teria maior ou menor afinidade pelas enterotoxinas em questão, impedindo que estas se adsorvessem a receptores em hemácias de carneiro, foram os mesmos, posteriormente, diluídos e misturados a uma mesma concentração das enterotoxinas em estudo.

Desta forma, diluimos em microplacas os gangliosídeos GM1, GD1a e GT1, com tampão

Tris-HCl 0,01M, pH 7,2, na razão de 2 e misturamos, em outra microplaca, 100 µl dessas diluições, em separado, a 100 µl das enterotoxinas LTh, LTp e TC (solução contendo 0,08 µg/ml).

Após terem permanecido a 37°C em banho-maria por uma hora, as misturas toxinas-gangliosídeos foram ensaiadas pelas provas de IHR e HI, como descrito acima. Mais uma vez, os resultados obtidos foram comparados aos observados quanto à atividade antigênica das mesmas toxinas usadas nos experimentos, pelas mesmas provas sorológicas, sem terem tido estas, contato algum com os gangliosídeos em questão.

Paralelamente, verificamos como controle se havia um possível efeito direto, nas provas de IHR e HI, das maiores concentrações dos gangliosídeos estudados.

2.13. Inibição pelas Frações Gangliosídicas Extraídas das Hemácias de Carneiro, Boi e Cobaia, das Reações Sorológicas de IHR e HI na Detecção das Enterotoxinas LTh, LTp e TC

As frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, boi e cobaia, foram dosadas pelo método do resorcinol-HCl (115) e tiveram suas concentrações acertadas para aproximadamente

15 μg de ácido siálico/ml, com tampão de trietanolamina. Em uma placa de microtitulação, misturamos 50 μl de várias diluições (obtidas em razão de 2) das enterotoxinas LTh, LTp e TC, à igual volume das frações gangliosídicas, estas na concentração de 15 μg de ácido siálico/ml.

Após ter sido coberta com uma fita adesiva, a microplaca permaneceu em banho-maria a 37°C por uma hora, tendo sido então verificada a atividade antigênica das misturas, pelas provas de IHR e HI.

Posteriormente, para compararmos qual das frações gangliosídicas seria capaz de inibir as reações sorológicas em menor concentração, estas foram diluídas em microplacas, em razão de 2, aproximadamente a partir de 6 μg de ácido siálico/ml e misturadas V/V, a uma mesma concentração das enterotoxinas LTh, LTp e TC (solução contendo 0,08 $\mu\text{g}/\text{ml}$). As misturas também permaneceram em contato por 1 hora a 37°C e foram examinadas quanto à presença de toxinas antigenicamente ativas, pelas provas de IHR e HI. Como controle, as mesmas toxinas sem terem tido contato com as frações gangliosídicas, foram examinadas pelas provas sorológicas mencionadas acima, determinando-se os títulos das mesmas.

Paralelamente, verificamos como controle, se havia um possível efeito direto, nas provas

de IHR e HI, das maiores concentrações das frações gangliosídicas estudadas.

2.14. Inibição pelas Frações Gangliosídicas Extraídas das Hemácias de Carneiro, Boi e Cobaia do Efeito Citotônico causado pelas Enterotoxinas LTh, LTp e TC em Células VERO.

Com o objetivo de verificarmos a possibilidade de inibição de um efeito biológico das enterotoxinas LTh, LTp e TC, pelas frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, boi e cobaia, estas foram incubadas com diluições das toxinas, observando-se posteriormente o efeito citotônico dessas misturas em culturas de células VERO.

Desta forma, inicialmente titulamos o efeito de nossos preparados das enterotoxinas LTh, LTp e da TC (solução contendo 10 µg/ml), diluídas em razão de 2, em microplacas contendo células VERO. No preparo das toxinas para a cultura de tecido, estas foram centrifugadas em tubos eppendorfs estéreis, a 12.000 rpm, por 30 minutos, acrescidas de 80 µg de gentamicina /ml. Após a centrifugação, transferiu-se assepticamente o sobrenadante para outras caçapas estéreis, com o auxílio de pipetas Pasteur. Foram então adicionados nas concavidades contendo cerca de $2 \cdot 10^4$ células VERO, 50 µl de ca-

da diluição da toxina em teste e 50 μ l do meio de Eagle sem soro.

Decorridas 18 horas a 37°C, procedia-se a leitura do teste, considerando-se como positivas, a ocorrência de alongamento nas células, contrastando-se aos controles negativos, que apresentavam células inalteradas. Para podermos trabalhar nas provas de inibição com as frações gangliosídicas extraídas das hemácias, inicialmente consideramos como uma unidade de efeito citotônico em células VERO (LUEC), a mais alta diluição das enterotoxinas, que ainda era capaz de causar alongamento nas referidas células.

Uma vez tituladas as enterotoxinas LTh, LTp e TC, escolhemos para trabalhar nos testes de inibição destas toxinas, 4UEC das mesmas. Exemplificando, se LUEC da toxina fosse igual a 1/512, utilizaríamos nos testes de inibição, a diluição 1/128.

Esta conduta foi necessária porque na incubação com as frações gangliosídicas, as toxinas deveriam ser diluídas na proporção de 1/2.

Posteriormente, nova diluição 1/2 deveria ser realizada na aplicação das misturas às células VERO, uma vez que seriam diluídas com o meio de Eagle sem soro.

Desta forma, as diluições selecionadas foram então misturadas em tubos eppendorfs às frações gangliosídicas (aproximadamente 7,5 µg de ácido siálico/ml) e incubadas a 37°C, por 1 h em banho-maria.

Após esse período, as misturas foram examinadas pelo ensaio em células VERO, como descrito acima, e os resultados obtidos comparados aos observados com as mesmas diluições das toxinas, -sem - terem sido estas misturadas às frações gangliosídicas. Paralelamente, como controle, também verificamos se havia algum efeito biológico direto das frações gangliosídicas em questão sobre a cultura de células VERO.

3. RESULTADOS

3.1. Adaptação de Técnicas Sorológicas de Detecção das Enterotoxinas LTs de Origem Humana e Suína e da TC, a Eritrócitos de Diferentes Origens

Seguindo as mesmas técnicas normalmente utilizadas nos testes de IHP, IHR e HI realizados com hemácias de carneiro, procuramos através delas pesquisar a sensibilização de diferentes hemácias pelas enterotoxinas LTs de origem humana e suína.

Verificamos na Tabela 3, que considerando-se como positivas as reações que liberam no teste de IHP uma quantidade de hemoglobina igual ou superior a 30 µg/ml, as hemácias bovinas apresentaram resultados 100% concordantes com os de carneiro. Essa concordância foi encontrada também nas provas de IHR e HI, tanto para amostras humanas como suínas.

Na mesma tabela, verificamos que no caso das hemácias de galinha, a concordância foi parcial no teste de IHP, tendo sido detectadas apenas 66,7% das amostras enterotoxigênicas de origem humana e 50% das de origem suína.

Já na prova de IHR, os resultados obtidos com estas hemácias foram 100% concordantes aos de carneiro, no caso de amostras humanas, e 75% pa-

ra amostras de origem suína. Pela HI, 75% das amostras ETEC de origem humana e 57,1% das suínas foram sorologicamente positivas quando se utilizou nesta prova, as hemácias de galinha.

Quanto às hemácias de coelho, tivemos na IHP uma concordância parcial de resultados quando comparados aos obtidos utilizando-se na mesma prova, hemácias de carneiro. Desta forma, verificamos com relação às amostras humanas e suínas, respectivamente, 37,5% e 35,7% de concordância.

Por outro lado, na prova de IHR realizada com hemácias de coelho, a concordância no caso de amostras humanas foi de 100% e nas suínas de 66,7%. Quanto à prova de HI, as amostras humanas foram 62,5% concordantes com os resultados obtidos com hemácias de carneiro, enquanto que as suínas foram 57,1% concordantes.

Com hemácias humanas, verificamos na Tabela 3, que não se observaram reações positivas na prova de IHP. Contudo, na IHR verificamos 87,5% de concordância das amostras ETEC de origem humana e suína, apesar dos halos hemolíticos terem sido bem menos intensos que os observados com hemácias de carneiro. Por outro lado, na prova de HI obtivemos 37,5% das amostras ETEC de origem humana com sorologia positiva e 28,6% nas de origem suína.

Quanto às hemácias de cobaia, na IHP também não observamos reações positivas, como no caso

das hemácias humanas. Da mesma forma, observamos na IHR com hemácias de cobaia, reações de pouca intensidade, verificando com as amostras humanas 12,5% de concordância de resultados em relação aos obtidos com hemácias de carneiro e 6,3% com as amostras ETEC de origem suína.

Já na prova de HI realizada com estas hemácias, os resultados foram 50% concordantes no caso das amostras humanas e 57,1% para as amostras suínas.

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo inicial, podemos estabelecer extremos de sensibilização entre as hemácias estudadas: hemácias bovinas são tão sensibilizadas pelas enterotoxinas LTs, quanto as de carneiro e hemácias de cobaia são as menos sensibilizadas por estas enterotoxinas.

Como essas diferenças de sensibilização encontradas nas diferentes hemácias estudadas devem refletir diferenças qualitativas e/ou quantitativas de receptores para a enterotoxina LT nas mesmas, escolhemos, para muitos de nossos experimentos posteriores, as hemácias de boi e de cobaia. A primeira, pela semelhança de sensibilização com relação à de carneiro e a última pela fraca afinidade pelas enterotoxinas LTs. Em alguns estudos posteriores, incluímos também as hemácias humanas, mais uma vez, pela baixa afinidade com as entero-

toxinas LTs.

Por termos decidido incluir em nossos estudos uma análise em paralelo da TC em relação a seus receptores em hemácias, temos na Tabela 4 a verificação da sensibilização dos eritrócitos de cobaia, boi e do homem, por esta enterotoxina, examinada pelas provas de IHR e HI. Desta forma, determinamos o título de uma solução da TC contendo 10 µg/ml da mesma, através das provas mencionadas acima, utilizando as hemácias selecionadas e comparando os resultados aos obtidos com hemácias de carneiro.

Nossos estudos a esse respeito não se estenderam ao teste de IHP, porque nos propusemos a seguir com apenas uma prova hemolítica, IHR ou IHRS e outra não hemolítica, a HI. No caso da nossa escolha com relação às provas hemolíticas, esta deveu-se à facilidade dos testes em um suporte de agarose e a certas condições de alguns experimentos.

Podemos observar na Tabela 4, que apesar de em menor intensidade, a TC se adsorve não só às hemácias de carneiro e bovinas, como também às de cobaia e humanas, embora nestas últimas em quantidades consideravelmente menores. De maneira geral, os títulos observados com essas diferentes hemácias foram superiores na prova de HI, quando comparados aos obtidos pela IHR.

origem humana e suína, através das provas sorológicas de IHP^a, IHR^b e HI^c

cias/amostras	Provas sorológicas					
	IHP		IHR		HI	
	humanas	suínas	humanas	suínas	humanas	suínas
boi	8/8 ^d (100) ^e	16/16 (100)	8/8 (100)	16/16 (100)	8/8 (100)	16/16 (100)
galinha	4/6 (66,7)	4/8 (50)	8/8 (100)	12/16 (75)	6/8 (75)	4/7 (57,1)
coelho	3/8 (37,5)	5/14 (35,7)	8/8 (100)	10/15 (66,7)	5/8 (62,5)	4/7 (57,1)
homem	0/8 (0)	0/16 (0)	7/8 (87,5)	14/16 (87,5)	3/8 (37,5)	2/7 (28,6)
cobaia	0/7 (0)	0/11 (0)	1/8 (12,5)	1/16 (6,3)	4/8 (50)	4/7 (57,1)

Prova de imuno-hemólise passiva.

Prova de imuno-hemólise radial.

Prova de hemaglutinação indireta.

Número de amostras enterotoxigênicas com resultados positivos com a hemácia em questão/número de amostras enterotoxigênicas positivas com a hemácia de carneiro, pela mesma prova sorológica.

Porcentagem de concordância de resultados positivos em relação aos obtidos com hemácias de carneiro.

Tabela 4. Estudo da sensibilização de diferentes hemácias pela TC^a, através das provas de IHR^b e HI^c

Prova	Origem da hemácia			
	carneiro	cobaia	humana	
IHR	1/4096 ^d	1/4	1/4	1/4096
HI	1/8192	1/8	1/64	1/8192

- a) Toxina colérica
- b) Prova de imuno-hemólise radial
- c) Prova de hemaglutinação indireta
- d) Título da TC, a partir de uma solução contendo 10 µg/ml

3.2. Estudo do Efeito de Diferentes Fatores Físico-Químicos, na Ligação das Enterotoxinas LTh, LTp e TC, a Receptores em Hemácias de Carneiro

3.2.1. Efeito do pH

A fim de observarmos a influência da concentração hidrogeniônica na ligação das enterotoxinas LTh, LTp e TC, aos receptores em hemácias de carneiro, os eritrócitos foram sensibilizados em diferentes pHs e após terem sido lavados, utilizados nas provas de IHRS e HI.

Podemos observar na Tabela 5, que quanto à LTh e à TC, a sensibilização dos eritrócitos não se alterou, como podemos verificar pela determinação dos títulos das mesmas nas provas de IHRS e HI.

Quanto à LTp, temos na mesma tabela, que houve um ligeiro aumento no título da enterotoxina em pH 8,0, portanto, uma melhor sensibilização das hemácias de carneiro, verificada tanto na prova de IHRS, como na HI. Por outro lado, no pH 5,0 os títulos obtidos da LTp foram ligeiramente inferiores.

3.2.2. Efeito do Tempo de Contato

No estudo da determinação do tempo de contato necessário para a adsorção das enterotoxinas LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro, utilizamos as provas de IHRS e HI, titulando as toxinas que permaneceram misturadas às células por diferentes espaços de tempo.

Podemos observar pela Tabela 6, que pelos testes realizados, a adsorção das toxinas às hemácias de carneiro é muito rápida, sendo que, após dois minutos de contato, grande parte das enterotoxinas (pelo menos 25% das mesmas) já havia se ligado aos eritrócitos. Aos 15 minutos de contato, podemos observar que o título nas provas de IHRS e HI, é o mesmo que aos 30 minutos, indicando que nesses tempos, sob o ponto de vista quantitativo, as toxinas já se haviam adsorvido completamente às hemácias de carneiro.

3.3.3. Efeito da Temperatura de Incubação

Com o objetivo de verificarmos a influência da temperatura na adsorção das enterotoxinas LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro, estas foram misturadas e as misturas mantidas às temperaturas de 4,

22 e 37°C.

Decorridos 30 minutos de sensibilização a essas temperaturas, as hemácias sensibilizadas com diferentes diluições das enterotoxinas foram lavadas e utilizadas, então, nas provas de IHRS e HI.

Podemos verificar pela Tabela 7, que o título das toxinas LTh, LTp e TC permaneceu o mesmo quando este foi verificado pela IHRS. Por outro lado, observa-se uma diminuição do título das enterotoxinas LTh e LTP na prova de HI, quando a sensibilização foi realizada na temperatura de 4°C.

Tabela 5. Efeito do pH na ligação das enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c, a receptores de hemácias de carneiro, estudado através das provas de IHRS^d e HI^e

Prova sorológica	Toxinas	pH dos tampões utilizados		
		8,5	7,2	5,0
IHRS	LTh	1/128 ^f	1/128	1/128
	LTp	1/32	1/16	1/8
	TC	1/4096	1/4096	1/4096
HI	LTh	1/64	1/128	1/128
	LTp	1/16	1/8	1/8
	TC	1/4096	1/4096	1/4096

- a) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- b) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- c) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.
- d) Prova de imuno-hemólise radial simples.
- e) Prova de hemaglutinação indireta.
- f) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2.

Tabela 6. Efeito do tempo de contato, na ligação das enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c, a receptores de hemácias de carneiro, estudado através das provas de IHRS^d e HI^e

Prova sorológica	Toxinas	Tempo de contato (em minutos)		
		2	5	15
IHRS	LTh	1/64 ^f	1/64	1/64
	LTP	1/8	1/16	1/16
	TC	1/2048	1/2048	1/8192
HI	LTh	1/16	1/64	1/64
	LTP	1/16	1/16	1/32
	TC	1/2048	1/2048	1/8192

- a) Preparado bruto de enterotoxina LT de *E. coli*, da amostra 40F, de origem humana.
 b) Preparado bruto de enterotoxina LT de *E. coli*, da amostra 0149/6, de origem suína.
 c) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.
 d) Prova de imuno-hemólise radial simples.
 e) Prova de hemaglutinação indireta.
 f) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2.

Tabela 7. Efeito da temperatura, na ligação das enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c, a receptores de hemácias de carneiro, estudado através das provas de IHRS^d e HI^e

Prova sorológica	Toxinas	Temperatura de sensibilização de hemácias		
		4°C	22°C	37°C
IHRS	LTh	1/64 ^f	1/64	1/64
	LTp	1/16	1/16	1/16
	TC	1/8192	1/8192	1/8192
HI	LTh	1/16	1/64	1/64
	LTp	1/4	1/16	1/32
	TC	1/8192	1/8192	1/8192

- a) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- b) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- c) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.
- d) Prova de imuno-hemólise radial simples.
- e) Prova de hemaglutinação indireta.
- f) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2.

3.4. Efeito de Diferentes Substâncias Químicas em Receptores da Hemácia de Carneiro para as Enterotoxinas LTh, LTp e TC

3.4.1. Carboidratos e Poliálcoois

Conhecendo-se a afinidade das enterotoxinas LTs pela D-galactose, através dos trabalhos de sua purificação (13), e supondo-se que os receptores para esta toxina em hemácias pudessem ser bloqueados pela presença de mono e dissacarídeos, realizamos diversos testes de IHR, na presença desses açúcares, bem como de alguns poliálcoois.

No estudo da inibição da IHR utilizando 24 amostras enterotoxigênicas de E. coli, de origem humana e suína, não verificamos alteração significativa dos halos hemolíticos, frente aos 12 carboidratos e poliálcoois analisados (dados não apresentados). Portanto, tais compostos parecem não impedir, na concentração em que foram utilizados, a ligação dos preparados brutos da enterotoxina LT de origem humana e suína, aos receptores em hemácias de carneiro.

3.4.2. Enzimas

Com o objetivo de verificarmos o efeito de diferentes enzimas sobre os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC, encontrados nas hemácias de carneiro, testes de IHR e HI foram desenvolvidos com estes eritrócitos após o tratamento com diversas enzimas, em várias concentrações, como descrito na Tabela 1.

Tais estudos revelaram que das enzimas estudadas, pode-se notar alguma alteração significativa apenas com relação ao tratamento das hemácias de carneiro pela neuraminidase.

Inicialmente, observamos pela prova de HI, que principalmente em relação à LTp, o tratamento pela neuraminidase, na dependência da concentração da enzima, aumentou o título da toxina determinado por esta prova sorológica (Tabela 8).

Em virtude desses achados, e supondo-se que este aumento de título na HI fosse devido a uma ação da neuraminidase em outros gangliosídeos que não o GM1, uma vez que este é resistente a esta enzima, resolvemos estender nossos estudos, não só às hemácias de carneiro, como também às hemácias menos sensibilizadas por estas ente-

rotoxinas, ou sejam, as de cobaia e humanas.

Conforme podemos verificar na mesma tabela, em ambas as provas houve um aumento do título das enterotoxinas LTh, LTp e TC, quando estes foram determinados com hemácias de cobaia tratadas por diferentes concentrações da neuraminidase. Isto implicaria em uma maior sensibilização dessas hemácias pelas enterotoxinas em questão, após o tratamento enzimático.

No que concerne às hemácias de origem humana, observamos na prova de IHR um aumento significativo do título da TC, bem como reações positivas para as enterotoxinas LTh e LTp, que haviam sido negativas nas reações controle, isto é, aquelas realizadas com hemácias humanas não tratadas pela neuraminidase.

Na prova de HI, na mesma Tabela 8, em relação às hemácias humanas tratadas pela neuraminidase foi verificado um aumento do título da reação, na detecção da TC. Contudo, o mesmo fenômeno não foi observado em relação às LTh e LTp quando a prova de HI foi realizada com hemácias tratadas pela neuraminidase, isto é, os títulos obtidos para estas toxinas foram pra

ticamente iguais ao da reação controle, realizada com hemácias não tratadas por esta enzima.

No estudo da atividade proteolítica das enzimas tripsina, protease e papaína sobre os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC, em hemácias de carneiro, verificamos pelas Tabelas 9, 10, e 11, que a determinação do título das mesmas nas provas de IHR e HI praticamente não sofreu alterações. Desta forma, este tratamento das hemácias pelas enzimas proteolíticas em questão, não alterou a capacidade das mesmas de se sensibilizarem com as enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Resultados semelhantes foram obtidos nas provas de IHR e HI, realizadas com hemácias tratadas pela ribonuclease e dextranase, onde nenhuma alteração foi observada nos títulos das enterotoxinas LTh, LTp e TC (dados não apresentados).

Tabela 6. Efeito da neuraminidase sobre receptores em hemácias de carneiro, cobaia e humanas, para as enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c, estudado através das provas de IHR^d e HI^e

Parte A - Prova de IHR

Toxina analisada		Hemácias utilizadas nos testes de IHR								
		carneiro			cobaia			humana		
		LTh	LTp	TC	LTh	LTp	TC	LTh	LTp	TC
Diluições da enzima (mu/ml)	15	1/32 ^f	1/8	1/512	n.t.**	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
	10	1/32	1/4	1/512	1/256	1/32	n.t.	1/8	1/2	1/1024
	5	1/32	1/4	1/512	1/256	1/32	n.t.	1/8	1/2	1/1024
	1	1/64	1/8	1/1024	1/256	--	n.t.	1/4	1/1	1/512
Controle ^g		1/64	1/8	1/1024	1/1	-- ⁱ	n.t.	--	--	1/4

Parte B - Prova de HI

Toxina analisada		Hemácias utilizadas nas provas de HI								
		carneiro			cobaia			humana		
		LTh	LTp	TC	LTh	LTp	TC	LTh	LTp	TC
Diluições da enzima (mu/ml)	10	1/512 ^f	1/512	1/4096	1/128	1/256	1/2048	1/64	1/4	1/512
	5	1/512	1/512	1/4096	1/256	1/64	1/2048	1/64	1/8	1/512
	1	1/256	1/64	1/4096	1/128	1/128	1/2048	1/64	1/4	1/512
Controle ^g		1/256	1/64	1/4096	1/2	1/2	1/8	1/128	1/4	1/64

Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.

Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.

Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.

Prova de imuno-hemólise radial.

Prova de hemaglutinação indireta.

Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtido com hemácias tratadas.

Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtido com hemácias não tratadas.

ulo das nas pela IHR	Toxinas	Diluições da enzima (mg/ml)				Controle ^f
		10	2	1	0,5	
	LTh	1/32 ^g	n.t. ^h	1/32	1/64	1/64
	LTP	1/16	1/16	1/16	1/16	1/16
	TC	1/512	n.t.	1/512	1/512	1/512
	LTh	1/128 ^g	n.t.	1/128	1/128	1/256
	LTP	1/64	n.t.	n.t.	1/64	1/64
	TC	1/8192	n.t.	1/4096	1/8192	1/8192

Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.

Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.

Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.

Prova de imuno-hemólise radial.

Prova de hemaglutinação indireta.

Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtidos com hemácias não tratadas.

Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtidos com hemácias tratadas.

Não testado.

	Toxinas	Diluições da enzima (mg/ml)	Control ^f
	0,675	0,1563	---
Título das toxinas pela IHR	ITh	1/256	1/256
	ITh	1/128	1/64
	TC	1/4096	1/4096
Título das toxinas pela HI	ITh	n.t.	1/256
	ITh	1/16	1/16
	TC	1/512	1/1024

- a) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- b) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- c) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.
- d) Prova de imuno-hemólise radial.
- e) Prova de hemaglutinação indireta.
- f) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtidos com hemácias não tratadas.
- g) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtidos com hemácias tratadas.
- h) Não testado.

Tabela 11. Efeito da papaína sobre receptores encontrados em hemácias de carneiro, para as enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c, estudado através das provas de IHR^d e HI^e

Toxinas	Diluições em enzima (mg/ml)			Controle ^f
	0,1	0,05	0,025	
Título das toxinas pela IHR	LTh	1/64	1/64	1/64
	LTP	1/8	1/8	1/16
	TC	1/1024	1/2048	1/1024
Título das toxinas pela HI	LTh	1/256 ^g	1/512	1/512
	LTP	1/128	1/128	1/256
	TC	1/2048	1/2048	1/4096

- a) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- b) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- c) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.
- d) Prova de imuno-hemólise radial.
- e) Prova de hemaglutinação indireta.
- f) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtidos com hemácias não tratadas.
- g) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, obtidos com hemácias tratadas.

3.4.3. Substâncias Químicas Diversas

Hemácias de carneiro foram tratadas por diversas substâncias químicas em diferentes concentrações, como descrito na Tabela 2, com a finalidade de verificarmos um possível efeito sobre receptores para LTh, LTp e TC, encontrados nesses eritrócitos.

A determinação dos títulos das enterotoxinas em questão, em placas de IHR e pela prova de HI, realizadas com hemácias de carneiro padronizadas e tratadas por 1 h a 37°C com essas substâncias, não apresentou qualquer alteração significativa, quando comparado aos testes controlados realizados com eritrócitos tratados apenas com o tampão diluente (dados não apresentados).

3.4.4. Formol

Hemácias de carneiro foram tratadas por uma solução de formalina, com o objetivo de verificarmos se este tratamento teria algum efeito sobre receptores encontrados nessas células para as enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Podemos observar pela Tabela 12, que no estudo da detecção de 18 amostras

ETEC LT⁺, de origem humana e suína, a sensibilidade do teste diminuiu significativamente após o tratamento das hemácias com formol, obtendo-se 33% de correlação de resultados, em relação aos obtidos com hemácias frescas, no caso de amostras humanas e 44,4%, no caso de amostras de origem suína.

Na determinação dos títulos das enterotoxinas LTh, LTp e TC, temos, na Tabela 13, que houve uma diminuição dos mesmos quando estes foram determinados com hemácias formolizadas.

Tabela 12. Efeito do formol sobre receptores de hemácias de carneiro, estudados através da reação de HI^a realizada com hemácias frescas e formolizadas, utilizando amostras ETEC LT⁺ de origem humana e suína^b

Origem das amostras	Hemácias		
	Frescas	Formolizadas	% de correlação ^c
humana	9	3	33%
suína	9	4	44,4%

a) Prova de hemaglutinação indireta.

b) Para amostras de origem humana, utilizamos soro anti-LT humana e para as de origem suína, anti-LT suína.

c) % de correlação = $\frac{\text{n}^\circ \text{ de amostras LT positivas na HI realizada com hemácias frescas}}{\text{n}^\circ \text{ de amostras LT positivas na HI com hemácias formolizadas}}$

Tabela 13. Efeito do formol sobre receptores para as enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c, estudado através da determinação dos títulos das mesmas por reações de HI^d, realizadas com hemácias frescas e formolizadas

Toxinas	Hemácias	
	Frescas	Formolizadas
LTh	1/64 ^e	1/16
LTp	1/16	1/2
TC	1/8192	1/4096

- a) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- b) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- c) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.
- d) Prova de hemaglutinação indireta.
- e) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2.

3.5. Cromatografia em Camada Delgada das Frações Gangliosídicas Extraídas das Hemácias de Carneiro e Cobaia

Com a finalidade de verificarmos os gangliosídeos existentes nas hemácias de carneiro, a fração gangliosídica dessas células foi extraída pelo método de Suzuki (114) e analisada em cromatografia de camada delgada. Com base nos resultados da Tabela 3, optamos por extrair paralelamente as frações gangliosídicas das hemácias de cobaia e de boi. A primeira por ser sensibilizada como a de carneiro pelas LTs de origem humana e suína e TC, e a segunda, por ser a menos sensibilizada por estas enterotoxinas, quando examinadas pelas provas de IHR e HI.

Antes de aplicarmos as frações gangliosídicas extraídas das hemácias, nas placas de sílica gel, estas foram dosadas quanto a quantidade de ácido siálico pelo método de HCl-resorcinol. Como na fração gangliosídica extraída das hemácias bovinas obtivemos uma baixa concentração de ácido siálico, esta fração não foi aplicada nas placas de cromatografia delgada, uma vez que, isto exigiria um volume excessivo para esta técnica.

Desta forma, podemos observar na Figura 1, apenas a cromatografia das frações gangliosídicas obtidas a partir das hemácias de carneiro e de cobaia, onde verificamos que em ambas está presente

o GMI, comparando-se as manchas obtidas, às dos padrões.

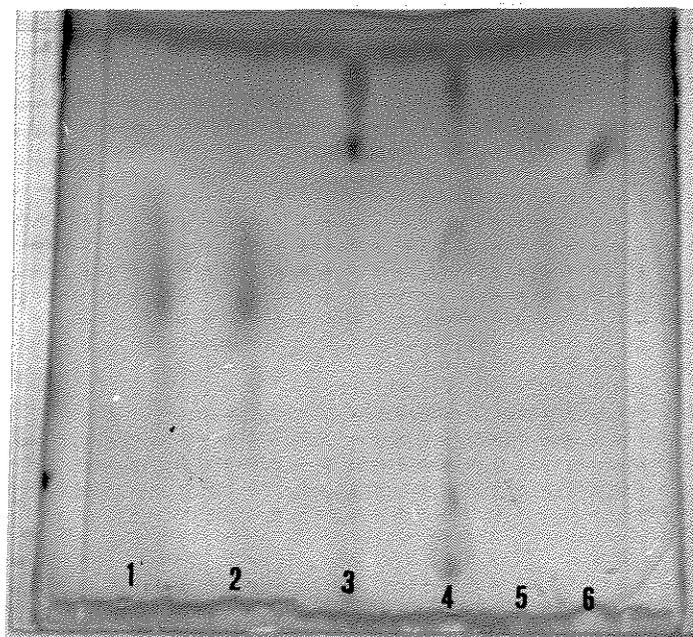
Quanto aos gangliosídeos GD1a e GT1, não verificamos claramente em nenhuma das frações extraídas das hemácias de carneiro e cobaia, manchas que pudessem ser correlacionadas com esses dois gangliosídeos. Entretanto, não podemos descartar a presença de outros gangliosídeos em manchas coradas pelo reativo de resorcinol, mas não identificadas.

Figura 1. Cromatografia em sílica gel, das frações gangliosídicas extraídas de aproximadamente 500 ml de sangue desfibrinado de carneiro e cobaia.

Metodologia de extração - vide texto.

Solvente: n-propanol e água destilada (7:3, V/V). As frações gangliosídicas extraídas foram aplicadas, contendo aproximadamente 15 ug de ácido siálico/ml. Pontos aplicados: (1) GT1; (2) GD1a; (3) Fração gangliosídica extraída das hemácias de carneiro; (4) Fração gangliosídica, extraída das hemácias de cobaia; (5) Padrões de gangliosídeos cedidos pelo Prof. Lars Svennerholm, (6) GM1

Os controles GT1, GD1a e GM1, foram adquiridos junto à Supelco Inc.



3.6. Inibição por Preparados Lisados e Delipidados de Hemácias de Carneiro e de Boi, das Reações Sorológicas de IHR e HI

Conforme descrito em material e métodos, hemácias bovinas e de carneiro foram delipidadas durante o processo de extração da fração gangliossídica, com uma mistura de cloroformio e metanol.

O material resultante desta extração foi inicialmente lavado e liofilizado, preparando-se com o mesmo, um homogenado com 20 mg por ml de PBS. Paralelamente, hemácias de carneiro foram lisadas, tratadas de maneira idêntica às delipidadas, preparando-se uma suspensão na mesma concentração.

O mesmo procedimento foi repetido com as hemácias bovinas, tendo em vista sua semelhança de sensibilização pelas enterotoxinas LTs e TC, em relação às hemácias de carneiro.

Após a mistura dessas suspensões com as enterotoxinas LTh, LTp e TC, vemos na Tabela 14, que as mesmas tiveram seus títulos diminuídos nas provas de IHR e HI, após o contato com os preparados lisados, mas não com os delipidados.

Este fenômeno ocorreu tanto no caso das suspensões procedentes de hemácias de carneiro, como bovinas.

Parte A - Hemácias de carneiro

Preparados de hemácias	Prova sorológica			
	IHR	HI		
Título das toxinas	Lisados	Delipidados	Controle	Controle
LTH	1/16 ^f	1/32 ^g	1/32 ^h	1/256
LTP	-- i	1/8	1/8	1/8
TC	1/512	1/4096	1/4096	1/16384

f) Reações sorológicas negativas.

Parte B - Hemácias de boi

Preparados de hemácias	Prova sorológica			
	IHR	HI		
Título das toxinas	Lisados	Delipidados	Controle	Controle
LTH	-- i	1/128 ^g	1/128 ^h	1/256
LTP	--	1/32	1/32	1/128
TC	1/256 ^f	1/1024	1/2048	1/8192

a) Prova de imuno-hemólise radial.

b) Prova de hemaglutinação indireta.

c) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.d) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.

e) Toxina colérica, em solução contendo 10 µg/ml.

f) Título das enterotoxinas, após terem sido misturadas aos preparados lisados.

g) Título das enterotoxinas, após terem sido misturadas aos preparados delipidados.

h) Títulos normais das enterotoxinas.

i) Inibição total da reação sorológica correspondente.

3.7. Inibição pelos Gangliosídeos GM1, GD1a e GT1 das Reações Sorológicas de IHR e HI, na Detecção das Enterotoxinas LTh, LTp e TC

Soluções das enterotoxinas LTs de origem humana e suína purificadas, além dos preparados brutos de LTh e LTp e de uma solução de TC, contendo 0,08 µg/ml, foram diluídas em microplacas em razão de 2 e misturadas às soluções contendo 100 µg/ml dos gangliosídeos GM1, GT1 e GD1a. As misturas foram então incubadas a 37°C por uma hora e, após esse período, determinou-se o título das enterotoxinas, através das provas de IHR e HI.

Podemos observar, pela Tabela 15, que nas concentrações de 100 µg/ml os gangliosídeos inibiram completamente as reações sorológicas. Desta forma, tanto no caso dos preparados brutos das toxinas, como com as soluções puras, a pré-incubação com os gangliosídeos impediu que as enterotoxinas se adsorvessem às hemácias de carneiro. Assim sendo, todas as diluições das toxinas em estudo apresentaram resultados sorológicos negativos nas provas de IHR e HI.

Com o objetivo de determinarmos qual dos três gangliosídeos conseguia uma maior inibição das provas sorológicas, estes foram diluídos na razão de 2 misturados em microplacas, a uma mesma concentração das enterotoxinas LTh, LTp e TC, cujos títulos, para que estas pudessem ser avaliadas

quantitativamente, estão expressos na Tabela 16.

Após incubação das misturas por 1 hora a 37°C, a atividade antigênica das toxinas foi verificada pelas provas de IHR e HI. Observamos pela Tabela 15, que o gangliosídeo GM1 foi o que em menor concentração conseguiu inibir as reações sorológicas, impedindo, desta forma, que as enterotoxinas LTh, LTp e TC se ligassem às hemácias de carneiro.

Na mesma tabela, podemos verificar que os gangliosídeos GT1 e GD1a inibem, na prova de IHR, a ligação das enterotoxinas LTh e LTp às hemácias de carneiro, respectivamente em concentrações 160 a 310 vezes maiores que o GM1.

Ainda na prova de IHR, verificamos com relação à TC, que a inibição das reações com os gangliosídeos GT1 e GD1a é menos intensa, só alcançada em concentrações de no mínimo 0,78 e 25 µg/ml.

Assim sendo, as concentrações de GT1 e GD1a necessárias para inibir, nas condições do experimento, a ligação da TC às hemácias de carneiro, foram pelo menos, respectivamente, 78 a 2.500 vezes superiores às do GM1.

Na prova da HI, podemos observar que o gangliosídeo GM1 inibe, mais uma vez, em menores concentrações, a adsorção das enterotoxinas LTh e LTp às hemácias de carneiro. No caso da LTh, a concen

tração dos gangliosídeos GT1 e GD1a, necessária para inibir a reação, é 4 vezes superior à de GM1. Com relação à LTp, esta mesma relação é 8 vezes superior à concentração de GM1 necessária para inibir a reação sorológica.

Os resultados obtidos na prova de HI, quanto à inibição da TC pelos gangliosídeos GM1, GT1 e GD1a, foram bastantes semelhantes aos observados na prova de IHR, isto é, o GM1 inibe as reações em concentrações pelo menos 1041 vezes menores que o GT1 e GD1a.

Temos na Figura 2, uma placa de IHR mostrando a inibição da reação hemolítica na detecção da LTh, pela pré-incubação da toxina, com diferentes diluições dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1. Nas Figuras 3 e 4, verificamos respectivamente, da mesma forma que para LTh, inibição das reações na detecção das enterotoxinas LTp e TC, pelos mesmos gangliosídeos.

Tabela 15. Inibição pelos gangliosídeos GM1, GT1 e GD1a, das reações sorológicas de IHR^a e HI^b, na detecção das enterotoxinas LTh^c, LTp^d e TC^e

Prova sorológica	Toxinas	Gangliosídeos			
		GM1	GT1	GD1a	Controle ^f
IHR	LT humana pura ^g	+ ⁱ	+	+	1/8
	LT suína pura ^h	+	+	+	1/16
	LTh	+	+	+	1/64
	LTp	+	+	+	1/16
	TC	+	+	+	1/32
HI	LT humana pura ^g	+	+	+	1/8
	LT suína pura ^h	+	+	+	1/16
	LTh	+	+	+	1/128
	LTp	+	+	+	1/32
	TC	+	+	+	1/32

a) Prova de imuno-hemólise radial.

b) Prova de hemaglutinação indireta.

c) Preparado bruto de enterotoxina LT de *E. coli*, da amostra 40T, de origem humana.

d) Preparado bruto de enterotoxina LT de *E. coli*, da amostra 0149/6, de origem suína.

e) Toxina colérica, em solução contendo 0,08 µg/ml.

f) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2, sem terem sido misturadas aos gangliosídeos.

g) Purificada a partir da amostra H10407.

h) Purificada a partir da amostra 0149/8.

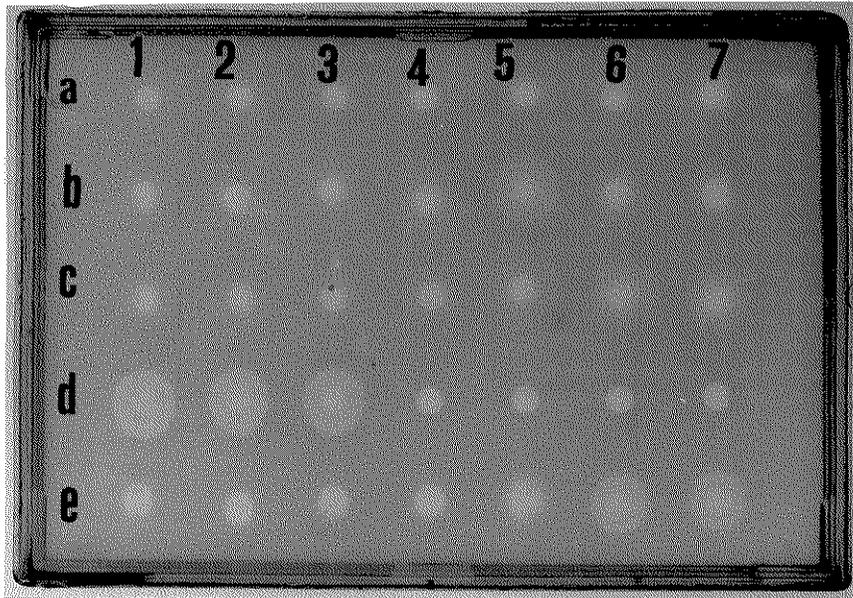
i) Inibição total da reação sorológica correspondente.

inibir as reações sorológicas de IHR^a e HI^b, na detecção das enterotoxinas LTh^c, LTP^d e TC^e

Prova sorológica	Toxinas	Menor conc. dos gangliosídeos capaz de inibir as reações de IHR e HI ^f			Controle ^g
		GMI	GTI	GDla	
IHR	LTh	0,01	1,6	3,1	1/64
	LTP	0,01	1,6	3,1	1/16
	TC	0,01 ^h	0,78	25	1/32
HI	LTh	0,048	0,1953	0,1953	1/128
	LTP	0,024	0,1953	0,1953	1/16
	TC	0,024	25	25	1/32

- a) Prova de imuno-hemólise radial.
- b) Prova de hemaglutinação indireta.
- c) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- d) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- e) Toxina colérica, em solução contendo 0,08 µg/ml.
- f) Expressos em µg de ácido siálico/ml.
- g) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2.
- h) Valores inferiores ao indicado.

Figura 2. Placa de IHR, mostrando inibição na detecção da LTh, pela pré-incubação da toxina com diferentes diluições dos gangliosídeos GMI, GD1a e GT1

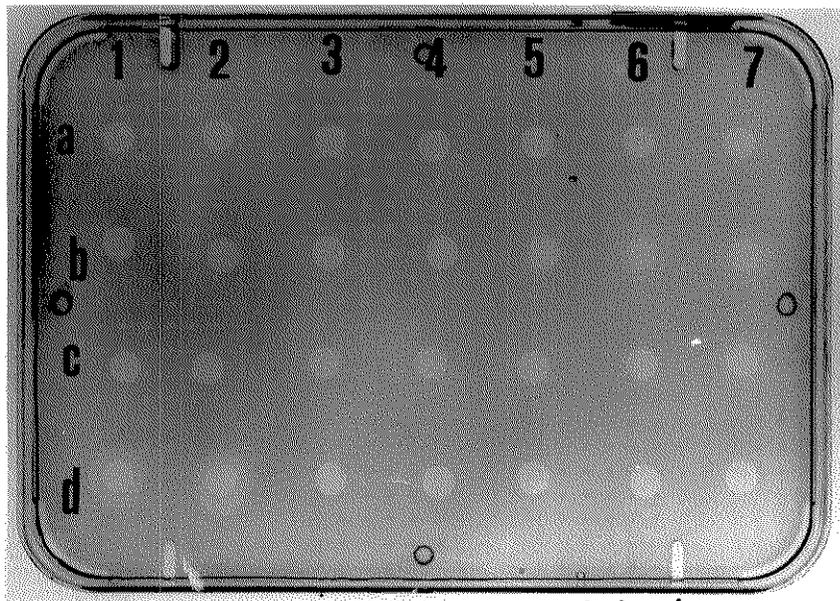


Nas fileiras A, B e C, enterotoxina LTh, pré-incubada a respectivamente diferentes concentrações dos gangliosídeos GMI, GD1a e GT1. Na coluna 1, a concentração dos gangliosídeos, foi de 25 $\mu\text{g/ml}$ e nas colunas subsequentes, diluições destas soluções, obtidas em razão de 2.

Na fileira D, colunas 1, 2 e 3, controle do LTh. Na mesma fileira, colunas 4, 5, 6 e 7, controles negativos, representados por sobrenadantes de culturas de amostras não enterotoxigênicas (K12 e 104) e pelas maiores concentrações dos gangliosídeos GMI e GD1a.

Na fileira E, colunas 1 e 2, controle negativo do GT1 e a partir da coluna 3, na mesma fileira, diluições do GMI, em continuação à fileira A.

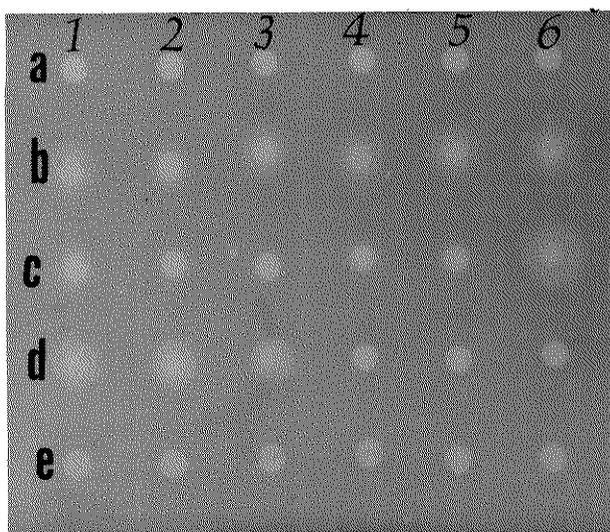
Figura 3. Placa de IHR, mostrando inibição na detecção da LTp, pela pré-incubação da toxina, com diferentes diluições dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1



Nas fileiras A, B e C, enterotoxina LTp, pré-incubada a respectivamente, diferentes concentrações dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1. Na primeira coluna, a concentração dos gangliosídeos foi de 50 µg/ml e nas colunas subsequentes, diluições destas soluções, obtidas em razão de 2.

Na fileira D, colunas 1 e 2, controle da LTp, e na mesma fileira controles negativos, representados na 3ª e 4ª colunas, por sobrenadantes de cultura de amostras não enterotoxigênicas (K12 e 104) e nas colunas 5, 6 e 7, respectivamente pelas maiores concentrações dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1 utilizadas.

Figura 4. Placa de IHR, mostrando inibição, na detecção da TC, pela pré-incubação da toxina, com diferentes diluições dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1.



Nas fileiras A, B e C, TC (solução a 0,08 $\mu\text{g/ml}$), pré-incubada a respectivamente diferentes concentrações dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1. Na primeira coluna, a concentração dos gangliosídeos foi de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ e nas colunas subsequentes, diluições destas soluções, obtidas em razão de 2.

Na fileira D, colunas 1, 2 e 3, controle da TC em condições normais, sem contato com os gangliosídeos.

Na fileira E, controles negativos, representados nas colunas 1 e 2, por sobrenadantes de cultura de amostras não enterotoxigênicas (K12 e 104) e nas colunas 3, 4 e 5, respectivamente pelas maiores concentrações dos gangliosídeos GM1, GD1a e GT1 utilizadas.

3.8. Inibição pelas Frações Gangliosídicas Extraídas das Hemácias de Carneiro, Boi e Cobaia, das Reações Sorológicas de IHR e HI, na Detecção das Enterotoxinas LTh, LTp e TC

Com o objetivo de verificarmos a capacidade inibitória das frações gangliosídicas obtidas a partir das hemácias de carneiro, boi e cobaia, sobre a ligação das enterotoxinas LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro, estas frações foram misturadas às toxinas, que foram então, após o período de incubação, verificadas quanto às suas características antigênicas, pelas provas de IHR e HI.

Desta forma, as frações gangliosídicas foram inicialmente padronizadas para uma concentração de aproximadamente 15 µg de ácido siálico/ml e misturadas em microplacas, a diferentes diluições das toxinas.

Podemos observar pela Tabela 17, que na presença da fração gangliosídica obtida das hemácias de carneiro, verificou-se uma inibição total das reações de IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Por outro lado, quanto às frações gangliosídicas extraídas das hemácias de cobaia e de boi, observamos a mesma inibição verificada com as frações de carneiro, com relação às enterotoxinas LTp e TC. Contudo, no que diz respeito à LTh, verifi-

cou-se a presença desta toxina, em título de 1/2, mesmo após a mistura com as frações gangliosídicas de cobaia e de boi.

Para verificarmos quais das frações gangliosídicas inibiria em menor concentração a ligação das toxinas às hemácias de carneiro, tornando negativas as reações de IHR e HI realizadas com essas hemácias, as frações gangliosídicas foram diluídas em microplacas na razão de 2 e misturadas a uma mesma concentração das toxinas. Para determinarmos quantitativamente as enterotoxinas misturadas às frações gangliosídicas, temos na Tabela 17, a determinação do título das mesmas na coluna das reações controle.

Desta forma, verificamos na mesma tabela, que quanto à LTh menores concentrações das frações gangliosídicas das hemácias de carneiro e de boi foram capazes de inibir a reação de IHR, em relação às procedentes das hemácias de cobaia. Através da prova de HI, podemos observar que, a fração gangliosídica da hemácia de carneiro conseguiu inibir a reação em menor concentração que as obtidas das hemácias de boi e de cobaia.

Na inibição das reações de detecção da LTh pela IHR, a concentração da fração gangliosídica das hemácias de cobaia necessária para inibir a reação é apenas 2 vezes maior que as obtidas das hemácias de carneiro e de boi. Na prova

de HI, a concentração da fração gangliosídica das hemácias de cobaia, necessária para inibir a detecção desta mesma toxina, é 4 vezes superior que a obtida da hemácia bovina e 8 vezes superior que a de carneiro.

Quanto à LTp, verificamos pela prova de IHR, que a fração gangliosídica bovina inibiu esta reação em menores concentrações que as frações obtidas das hemácias de carneiro e de cobaia. Desta forma, a concentração da fração gangliosídica das hemácias de cobaia necessária para inibir as reações da LTp na IHR, foi 3,9 vezes maior que a de carneiro e 8,3 vezes maior que a extraída das hemácias bovinas.

Na prova de HI, temos na Tabela 17, que a fração gangliosídica obtida a partir das hemácias de carneiro, inibiu em menores concentrações esta reação na detecção da LTp, que as demais. Assim sendo, a concentração da fração gangliosídica extraída das hemácias de cobaia, necessária para inibir esta toxina na HI, é 2 vezes superior que a obtida das hemácias de boi e 3,9 vezes superior que a de carneiro.

No que diz respeito à TC, verificamos que na prova de IHR a concentração da fração gangliosídica das hemácias de cobaia, necessária para inibir esta reação, na detecção desta enterotoxina, é 2 vezes superior que a extraída das hemácias bovi-

nas e 4 vezes superior que a de carneiro. Quanto à prova de HI na detecção da TC, podemos observar que a concentração da fração gangliosídica extraída das hemácias de cobaia, necessária para inibir a reação, é 7,9 vezes maior que a extraída das hemácias de carneiro.

Na Figura 5, temos uma placa de IHR, mostrando a inibição do halo hemolítico da LTh, pela pré-incubação da toxina com as frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, cobaia e boi. Na Figura 6, verificamos, da mesma forma que para LTh, inibição das reações hemolíticas da TC, pelas mesmas frações gangliosídicas mencionadas acima.

Tabela 17. Inibição pelas frações gangliosídicas obtidas a partir das hemácias de carneiro, cobaia e boi, das reações sorológicas de IHR^a e HI^b, na detecção das enterotoxinas LTh^c, LTp^d e TC^e

Prova sorológica	Toxinas	Origem da fração gangliosídica			Controle ^f
		Carneiro	Cobaia	Boi	
IHR	LTh	+ ^g	1/2 ^h	1/2	1/32
	LTp	+	+	+	1/8
	TC	+	+	+	1/32
HI	LTh	+	+	+	1/256
	LTp	+	+	+	1/16
	TC	+	+	+	1/64

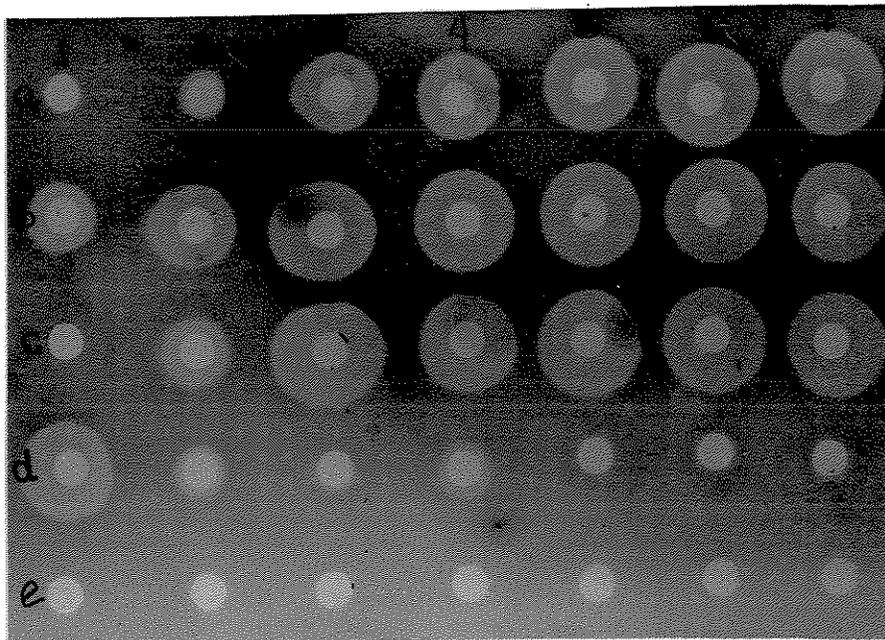
- a) Prova de imuno-hemólise radial.
- b) Prova de hemaglutinação indireta.
- c) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- d) Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem humana.
- e) Toxina colérica, em solução contendo 0,08 µg/ml.
- f) Título das enterotoxinas, diluídas em razão de 2.
- g) Inibição total da reação sorológica correspondente.
- h) Inibição parcial da respectiva reação, em relação ao controle.

Tabela 18. Determinação das menores concentrações das frações gangliosídicas obtidas a partir das hemácias de carneiro, cobaia e boi, capazes de inibir as reações sorológicas de IHR^a e HI^b, na detecção das enterotoxinas LTh^c, LTP^d, e TC^e

Prova sorológica	Toxinas	Menor concentração das frações gangliosídicas capaz de inibir as reações de IHR e HI ^f			Controle ^g
		Carneiro	Cobaia	Boi	
IHR	LTh	1,5	3,0	1,5	1/32
	LTP	0,19	0,75	0,09	1/8
	TC	0,375	1,5	0,75	1/32
HI	LTh	0,75	6,0	1,5	1/256
	LTP	0,19	0,75	0,375	1/16
	TC	0,19	1,5	n.t.h	1/64

- Prova de imuno-hemólise radial.
- Prova de hemaglutinação indireta.
- Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- Preparado bruto de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- Toxina colérica, em solução contendo 0,08 µg/ml.
- Expressos em µg de ácido siálico/ml.
- Título das enterotoxinas diluídas em razão de 2.
- Não testado.

Figura 5. Placa de IHR, mostrando inibição na detecção da LTh, pela pré-incubação das toxinas com diferentes diluições das frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, cobaia e boi



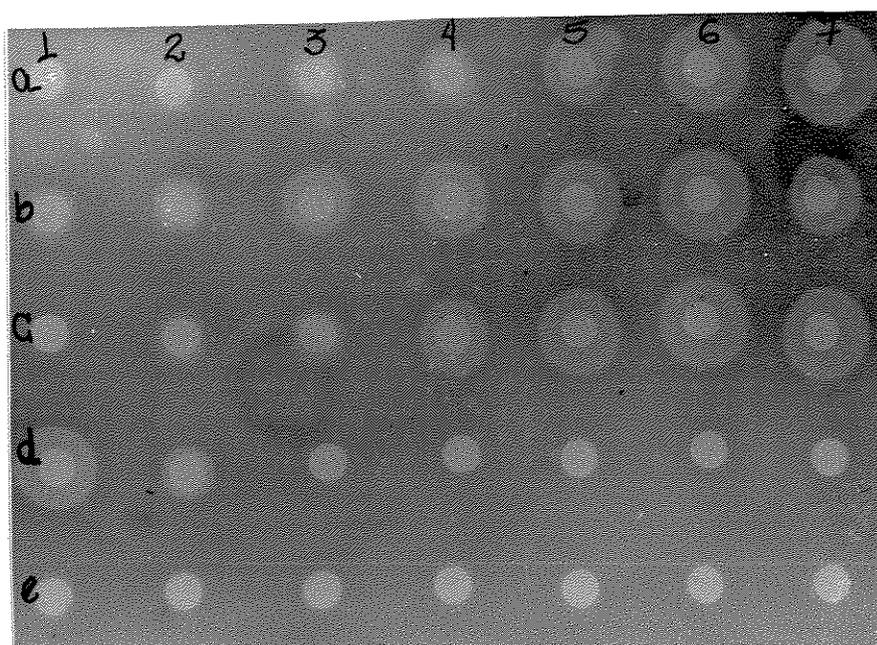
Nas fileiras A, B e C, LTh pré-incubada a respectivamente, diferentes diluições das frações gangliosídicas de carneiro, cobaia e boi. Na primeira coluna, a concentração das frações gangliosídicas foi de aproximadamente $3 \mu\text{g}$ de ácido siálico/ml e nas colunas subsequentes, diluições destas soluções, obtidas em razão de 2.

Na fileira D, coluna 1, controle da LTh.

Na fileira E, controles negativos, representados nas colunas 1 e 2, por sobrenadantes de cultura de amostras não enterotoxigênicas (K12 e 104) e nas colunas 3, 4 e 5, respectivamente pelas maiores concentrações das frações gangliosídicas utilizadas, obtidas de carneiro, cobaia e boi.

Fileira D, colunas 2, 3 e 4, reações não relacionadas ao experimento em questão.

Figura 6. Placa de IHR, mostrando inibição na detecção de TC, pela pré-incubação da toxina com diferentes diluições das frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, cobaia e boi



Nas fileiras A, B e C, TC (solução a 0,08 $\mu\text{g/ml}$), pré-incubada a respectivamente, diferentes concentrações das frações gangliosídicas de carneiro, cobaia e boi. Na primeira coluna, a concentração das frações gangliosídicas foi de aproximadamente 3 μg de ácido siálico/ml e nas colunas subsequentes, diluições destas soluções, obtidas em razão de 2.

Na fileira D, coluna 1, controle da toxina. Na fileira E, controles negativos, representados nas colunas 1 e 2, por sobrenadantes de cultura de amostras não enterotoxigênicas (K12 e 104) e nas colunas 3, 4 e 5, respectivamente pelas maiores concentrações das frações gangliosídicas utilizadas, obtidas de carneiro, cobaia e boi.

Fileira D, coluna 2, reação não relacionada ao experimento.

3.9. Inibição pelas Frações Gangliosídicas Obtidas a Partir das Hemácias de Carneiro, Cobaia e Boi, do Efeito Citotônico Causado em Células VERO, pelas Enterotoxinas LTh, LTp e TC

As frações gangliosídicas obtidas a partir das hemácias de carneiro, cobaia e boi, na concentração de aproximadamente 7,5 µg de ácido siálico/ml, foram misturadas em tubos eppendorfs, a 4UEC das enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Podemos observar pela Tabela 19, que as frações gangliosídicas das hemácias de carneiro, boi e cobaia, foram capazes de inibir o efeito citotônico em células VERO, provocado pelas enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Tabela 19. Inibição pelas frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, cobaia e boi, do efeito citotônico em células VERO, causado pelas enterotoxinas LTh^a, LTp^b e TC^c

Toxinas	Título da Toxina (IUEC) ^e	Diluições analisadas (4UEC)	Origem da fração gangliosídica ^d		
			Carneiro	Cobaia	Boi
LTh	1/8192	1/2048	+ ^f	+	+
LTp	1/128	1/32	+	+	+
TC	1/65.456	1/16.364	+	+	+

- a) Preparado de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 40T, de origem humana.
- b) Preparado de enterotoxina LT de E. coli, da amostra 0149/6, de origem suína.
- c) Toxina colérica em solução contendo 10 µg/ml.
- d) Frações gangliosídicas utilizadas na concentração de aproximadamente 7,5 µg de ácido siálico/ml.
- e) Ver Material e Métodos, item 2.14.
- f) Inibição total do efeito citotônico.

4. DISCUSSÃO

A importância do estudo dos receptores para as enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e da TC, reside na sua participação na diarréia osmótica, característica principal das doenças clínicas com as quais estão associadas.

Para que um determinado componente estrutural de superfície das células dos animais superiores seja biologicamente considerado como receptor para uma determinada toxina, é necessário demonstrar-se experimentalmente seu envolvimento no processo mediado pela mesma.

No caso da TC, embora as células alvo sejam normalmente os enterócitos, tem sido demonstrado que esta toxina ativa a adenil-ciclase em células de uma grande variedade de tecidos (35).

Essas observações sugerem que o receptor para a TC deva ser um componente comum às membranas celulares de várias células (18).

Na verdade, Van Heyningen et al (52), já em 1971, haviam sugerido que o receptor para a TC deveria ser um gangliosídeo, uma vez que o efeito desta toxina em células gordurosas isoladas ou na alça intestinal de coelhos, era bloqueado pela pré-incubação com uma mistura de gangliosídeos.

Utilizando gangliosídeos purificados, tem sido demonstrado, em diferentes sistemas, que o gangliosídeo

G_{M1} e em bem menos intensidade o G_{M2} e o G_{D1a}, bloqueiam competitivamente a ligação da TC marcada com ¹²⁵I a várias membranas (52), inibindo inclusive os efeitos induzidos nos timócitos de camundongos (130) e o acúmulo de líquido na alça ligada de coelho (56,57,96).

A interação da TC e do próprio coleragenóide com o G_{M1}, tem sido demonstrada "in vitro", por uma variedade de técnicas, como por exemplo, imunodifusão dupla em gel (57,60), precipitação com um complexo de G_{M1} adsorvido a cerebrosídeo (53), ligação da toxina em tubos recobertos com G_{M1} (60,62) e outras provas.

A ligação do G_{M1} ocorre entre a toxina e o componente oligossacarídico do gangliosídeo (59), sendo que cada molécula de toxina, com seus fragmentos B, liga-se a cinco ou seis moléculas de oligossacarídeos, presumivelmente pelas suas cadeias B (37).

Além das evidências de ligação da TC ao G_{M1} "in vitro", tem sido demonstrada a interação desta toxina ao G_{M1} presente na superfície de células, uma vez que a pré-incubação da TC com fibroblastos (85) e com células BALB/C 3T3 (17), evita a oxidação do resíduo de galactose terminal do G_{M1}, por enzimas específicas.

Por outro lado, existe uma boa correlação entre a sensibilidade à TC e o conteúdo de G_{M1} em uma variedade de tipos celulares (54,61). Portanto, muitas observações evidenciam a especificidade da ligação da TC ao G_{M1}, tanto "in vitro", como "in vivo" (36,57,66,84).

Entretanto, ainda resta a possibilidade de que possam existir outras moléculas com a capacidade de se ligarem à TC, podendo atuar também como receptores desta toxina. Na verdade, Critchley et al (16) sugeriram após trabalharem com fibroblastos de camundongo, onde solubilizaram os receptores complexados com a TC marcada com ^3H , que a maioria destes, deveria ser o GM1 e em menores quantidades, uma glicoproteína de P.M. aproximado de 80.000 a 90.000 daltons. Os autores sugeriram, então, que esta glicoproteína poderia possuir uma estrutura oligossacarídica similar a do GM1, que permitiria a interação com a TC (15).

Posteriormente, Morita et al (82), trabalhando com intestino delgado de rato e utilizando uma tecnologia semelhante à de Critchley et al (16), também identificaram a TC ligada a glicoproteínas de peso molecular de 69.000, 90.000, 100.000, 114.000 e 132.000 daltons.

Trabalhos subsequentes de Critchley et al (16, 17), nos quais os autores analisaram a TC ligada a componentes das membranas de "brush borders", do intestino de rato e de fibroblastos de camundongo BALB/C 3T3 (17), confirmaram seus resultados anteriores, demonstrando a TC, em imunoprecipitados com GM1 e com uma pequena quantidade de galactoproteínas. Entretanto, esses achados não demonstraram de modo evidente a participação das galactoproteínas como receptores da TC, avertando-se a hipótese destas estarem associadas ao GM1 em micélios.

Apesar da possibilidade de glicoproteínas poderem estar envolvidas como receptores da TC, não há dúvidas pelos experimentos desenvolvidos até hoje, de que o GM1 deva ser o principal receptor para esta toxina nas superfícies celulares.

Quanto às enterotoxinas LTs de E. coli, além das muitas similaridades existentes entre estas e a TC (11,12), diversas evidências tem apontado também o gangliosídeo GM1, como o seu principal receptor.

Desta forma, LT também liga-se "in vitro" a tubos plásticos recobertos com GM1 (56,65), sendo que essa ligação ocorre entre o fragmento B e a porção oligossacarídica do GM1 (88). Ainda, em baixas concentrações, o GM1 bloqueia os efeitos induzidos pelas LTs de E. coli, em timócitos de camundongo (130) e em células Y-1 (26).

Por outro lado, Pierce et al (96) e Holmgren et al (56), descreveram que, quantitativamente, muito mais GM1 era necessário para inibir os efeitos mediados pela LT em alça ligada de intestino de coelho, do que para a TC na mesma prova.

Recentemente, Holmgren et al (65), descreveram que a pré-incubação de baixas concentrações de GM1 (1 nm), com a TC ou com a LT purificada, inibiam completamente a ~~atividade destas toxinas na alça ligada de coelho.~~

Também a incorporação exógena de GM1 em células C6, de glioma de rato deficiente neste gangliosídeo,

aumentou em cerca de 30 vezes, a ligação da LT de E. coli, marcada com ^{125}I a essas células (88). Na linhagem de fibroblasto de camundongo não sensível à LT de E. coli e tampouco à TC, por não sintetizar o GM1, a adição desse gangliosídeo às células, aumentou cerca de 3 vezes o conteúdo do AMP cíclico (86).

Todos esses experimentos demonstraram que as enterotoxinas LTs de E. coli se ligam realmente ao GM1, que deve funcionar como seu receptor nas superfícies celulares, à semelhança da TC.

Entretanto, observações experimentais sugerem que essas duas enterotoxinas diferem em suas características de ligação aos receptores e que o GM1, pode não ser o único a desempenhar a função de receptor para LT.

As evidências mais relevantes seriam:

- 1- As LTs de E. coli se aderem fortemente a suportes contendo galactose (Bio gel A5m) característica esta utilizada por Clements e Finkelstein (13), na metodologia que desenvolveram para purificar esta enterotoxina por cromatografia de afinidade. Em condições similares, a TC não se adere às colunas de agarose, apesar de ficar levemente retardada na cromatografia.
- 2- Uma vez que o GM1 seria o receptor para as LTs de E. coli, a fração B da TC, ou melhor, o coleragenídeo, deveria ser capaz de bloquear a ação destas to-

xinas nas células, o que não foi observado em diversos trabalhos (65).

Quanto a este último item, existem dados conflitantes, uma vez que Nalin e McLaughlin (89) descreveram que o pré-tratamento com coleragenóide bloqueava tanto a TC como a LT de E. coli em alças intestinais de cachorros, enquanto que Donta (26) descreveu que ambas as toxinas e suas subunidades B foram capazes de se inibirem competitivamente, na cultura de células Y-1.

Ao contrário, Pierce (96) e Holmgren (56), descreveram que a pré-incubação com coleragenóide, em alça ligada de intestino de coelho, evitava a resposta à TC, mas não à LT de E. coli.

Tendo em vista todas estas controvérsias a respeito dos receptores para a LT de E. coli, e usando a TC para fins comparativos, escolhemos como modelo de estudo dos receptores destas enterotoxinas, os eritrócitos. Isto porque, pelas provas sorológicas de detecção destas enterotoxinas envolvendo hemácias, verifica-se uma sensibilização natural nas mesmas. Em outras palavras, as enterotoxinas LTs e TC, apesar de serem proteínas, se adsorvem às hemácias de carneiro sem o uso artificial de ligantes, o que só poderia ser explicado pela presença de receptores específicos.

Em trabalhos anteriores, em nenhum momento, os eritrócitos foram utilizados para este fim, ao contrário do que já se faz na pesquisa dos receptores especí-

ficos para fímbrias de aderência de ETEC (24,33,108).

Desta forma, estaríamos não só esclarecendo o mecanismo intrínseco das reações de IHP, IHRS, IHR e HI, como também identificando os receptores encontrados nos eritrócitos para as enterotoxinas LTs, podendo comparar eventuais diferenças com a TC.

A correta caracterização dos receptores para as enterotoxinas LTs das amostras ETEC e da TC, poderia também abrir perspectivas, no sentido de se pesquisar inibidores competitivos destas toxinas, talvez até para serem utilizados com fins terapêuticos, à semelhança dos anti-histamínicos, muito usados no tratamento de reações de hipersensibilidade do tipo imediato.

No desenvolvimento do nosso trabalho, inicialmente nos propusemos a caracterizar em eritrócitos de diferentes origens, quais os que seriam sensibilizados pelas enterotoxinas LTs de amostras ETEC, de origem humana e suína.

Assim, na Tabela 3, podemos verificar que, apesar de existirem diferenças na sensibilização, todos os eritrócitos estudados foram capazes de adsorver as enterotoxinas LTs de origem humana e suína, como verificado nas provas de IHP e/ou IHR e HI.

Pelos resultados obtidos, verificamos que as hemácias bovinas, em todos os testes estudados, tiveram 100% de concordância, quando comparados aos de carneiro. Isto significa, que esses eritrócitos devem possuir re-

ceptores para as LTs, semelhantes aos encontrados nas hemácias de carneiro, normalmente utilizadas nas provas sológicas de detecção destas enterotoxinas.

Temos portanto nas hemácias bovinas, um padrão de sensibilização pelas toxinas LTs de amostras ETEC, de origem humana e suína, igual às das hemácias de carneiro, podendo perfeitamente substituí-las nos testes de detecção de IHP, IHR e HI.

Quanto às hemácias de galinha, coelho e humanas, dependendo do teste estudado, observamos uma concordância parcial de resultados, quando comparados aos obtidos com eritrócitos de carneiro.

Na análise pela prova de IHR, as hemácias humanas mostraram-se sensíveis a muitas das amostras enterotoxigênicas, porém, com reações de pouca intensidade hemolítica (dados não apresentados).

As diferenças encontradas com essas hemácias, frente aos testes estudados, levou-nos a supor desde o início, que seriam devidas a diferenças qualitativas e/ou quantitativas nos receptores para as enterotoxinas LTs nas mesmas. Isto só poderia ser melhor analisado em estudos posteriores, diretos, sobre os receptores das LTs nessas células.

Ainda no caso das hemácias humanas, pudemos observar que apesar das reações terem sido menos intensas, houve muita concordância de resultados na prova de IHR, com os obtidos com hemácias de carneiro, tanto com amos

tras de origem humana, quanto suína. Provavelmente a técnica de difusão em um suporte de agarose, tenha auxiliado a uma maior concentração da toxina em volta do orifício de aplicação, facilitando a ligação das LTs a receptores existentes nesses eritrócitos.

Quanto às hemácias de cobaia, os resultados obtidos na IHP, da mesma forma que com hemácias humanas, foram todos negativos. Por outro lado, no estudo destas hemácias pelas provas de IHR e HI, verificamos que amostras LT positivas, tanto de origem humana, como suínas, foram na maioria negativas na IHR e apresentaram reações fracas na HI.

Estes últimos resultados sugerem que a enterotoxina LT apesar de apresentar pouca afinidade às hemácias de cobaia, é capaz de se ligar a esses eritrócitos, demonstrando portanto, a existência nessas células de receptores para esta toxina.

Analisando-se em conjunto os resultados obtidos, podemos estabelecer extremos entre as hemácias estudadas, sendo as bovinas, tão sensíveis às LTs quanto às hemácias de carneiro e as de cobaia e humana, as menos sensibilizadas com estas enterotoxinas. As demais, ocupariam lugares intermediários.

Sob o ponto de vista prático, a adaptação dos testes de IHP, IHR e HI, na detecção da enterotoxina LT, usando hemácias que não as de carneiro, seria direta no caso de hemácias bovinas. As demais, teriam que ser melhor investigadas, antes de serem utilizadas nos

testes em questão.

Uma vez que nos propusemos a comparar os receptores em hemácias para as LTs de E. coli com as de TC, estendemos nossos estudos de sensibilização de diferentes hemácias a essa última toxina.

Desta forma, podemos observar pela Tabela 4, que apesar de em menor intensidade, as hemácias de cobaia e humanas também são capazes de adsorver a TC. Por outro lado, de maneira semelhante às LTs, a determinação do título de uma solução de TC, obtido nas provas realizadas com hemácias bovinas, foi o mesmo que com as hemácias de carneiro.

Outros autores também procuraram comparar os receptores para a LT de E. coli e TC em outros tipos celulares. Desta forma, Holmgren et al (66), em provas de imunoensaio com toxina marcada com ^{125}I , compararam os resultados obtidos pelo ensaio de GM1-ELISA e concluíram que os enterócitos e preparações de "brush-border" de intestino humano, se ligavam, na mesma extensão, às enterotoxinas LT de origem humana e à TC.

Resultados anteriores obtidos com intestino de coelho (65), demonstraram indiretamente pelo método do GM1-ELISA (117) que a enterotoxina LT de origem humana, ligava-se cerca de 10 vezes mais aos enterócitos e aos "brush-border" desse animal, que a TC. Isto significaria que no intestino de coelho deveria haver um número maior de sítios de ligação para a LT de E. coli.

Pelos nossos resultados preliminares de estudos de sensibilização de diferentes eritrócitos, pudemos apenas verificar que, aparentemente, ambas as toxinas parecem ter padrões de sensibilização semelhantes nessas células.

Na continuidade de nossos estudos, como seria muito difícil conciliarmos um número muito grande de amostras, provas sorológicas e hemácias, optamos por:

1. Trabalharemos com apenas uma das provas hemolíticas, escolhendo a IHR ou a IHRS, por apresentarem maior sensibilidade e facilidade de execução, e como prova não hemolítica, a HI.
2. Trabalharemos com apenas uma amostra LT de origem humana, 40T, cujos preparados brutos denominamos de LTh.
3. Trabalharemos com apenas uma amostra LT de origem suína, 0149/6, cujos preparados brutos denominamos de LTp.
4. Nas provas sorológicas de estudo dos receptores, verificamos principalmente os encontrados nas hemácias de carneiro e apenas quando necessário, estendermos nossos estudos a outros eritrócitos.

Desta forma, no estudo do efeito de diferentes fatores físico-químicos nas ligações das enteroto-

xinas LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro, verificamos que não houve alteração da sensibilização desses eritrócitos nos pHs 5,0, 7,0 e 8,5, uma vez que o título das mesmas não se alterou, como observado pelas provas de IHR e HI (Tabela 5).

Quanto à LTp, o pH 8,5 parece ter favorecido a ligação desta toxina às hemácias de carneiro, uma vez que o título da mesma, ao ser determinado nesse pH, foi superior aos verificados nos pHs 7,0 e 5,0.

Nas provas de adsorção variando o tempo de contato, pudemos constatar que a ligação das enterotoxinas LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro é muito rápida. Quantitativamente, os resultados obtidos nas provas de IHR e HI, mostraram algumas discrepâncias, sendo que, entretanto, pudemos verificar que apenas após dois minutos de contato, pelo menos 25% das enterotoxinas estudadas já haviam se ligado aos eritrócitos, resultando em provas sorológicas positivas.

Aos 15 minutos de contato, verificamos na Tabela 6, que o título das enterotoxinas é o mesmo que o obtido após 30 minutos, o que significa que esse período de tempo já havia sido suficiente para que as enterotoxinas tivessem se adsorvido às hemácias.

Em termos relativos, não verificamos, portanto, diferenças entre as relações das enterotoxinas LTh, LTp e Tc, e seus receptores nas hemácias de carneiro, no que diz respeito a pH e tempo de contato.

Resultados semelhantes já haviam sido observados por Hunn e Kimmich (69), trabalhando na dinâmica de ligação da TC em enterócitos de galinha. Esses autores verificaram que a TC reagia rapidamente com essas células, alcançando o equilíbrio após 5 minutos de contato.

O acompanhamento dessas reações foi realizado com a toxina marcada com ^{125}I e com dosagens do AMP cíclico das células. Desta forma, verificaram, através da toxina marcada radioativamente, que a TC se ligava aos enterócitos de galinha após cerca de 1 minuto de contato, alcançando o máximo após 3 a 7 minutos a 37°C , enquanto o AMP cíclico, nas mesmas células, demorava cerca de 10 a 15 minutos para apresentar qualquer resposta. Naturalmente, a lag fase, representada pela não elevação do AMP cíclico, representaria o tempo necessário para a penetração da subunidade A na célula e subseqüentes eventos intracelulares (69).

Nos nossos resultados não verificamos em relação à TC, um máximo de adsorção da toxina num período de 5 minutos, mas sim, após 15, tanto na prova de IHR, como na HI.

Ainda no estudo da dinâmica da ligação das enterotoxinas LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro, no que diz respeito ao efeito da temperatura, pudemos verificar pela Tabela 7, que não houve variação do título das toxinas na prova de IHR.

Apenas no caso da LTh e LTp, observou-se na prova de HI uma diminuição do título das enterotoxinas,

quando a sensibilização das hemácias de carneiro procedeu-se a 4°C. Este resultado nos leva a supor, que a baixa temperatura poderia não favorecer a ligação desta toxina a seus receptores nessas células.

Hyun e Kimmich (69), verificando o efeito da temperatura na ligação da TC aos enterócitos de galinha, observaram que na temperatura de 15°C havia um retardamento da ligação da TC a essas células. Entretanto, após um período de aproximadamente 35 minutos, a quantidade de toxina adsorvida aos enterócitos incubados a 15°C era a mesma que a 37°C.

Talvez pudéssemos obter diferenças maiores na determinação dos títulos dos LTh, LTp e mesmo da TC, no estudo do efeito da temperatura, se incubássemos as misturas das toxinas com as hemácias de carneiro, em períodos mais curtos de tempo. Nossa incubação de 30 minutos deve ter permitido que a baixas temperaturas, mesmo com prováveis atrasos, mais toxina tenha se adsorvido às células, resultando em provas sorológicas positivas e aumento do título das mesmas.

Nas tentativas de inibirmos a sensibilização das hemácias de carneiro pelas enterotoxinas LTs de origem humana e suína, por diferentes carboidratos e poliálcoois, não verificamos inibição de nenhuma das reações de IHR, tampouco diminuição dos halos hemolíticos.

Portanto, na concentração de 1%, os carboidratos e poliálcoois adicionados ao gel de agarose foram incapazes de inibir a adsorção dessas enterotoxinas aos re-

ceptores das hemácias de carneiro.

No tratamento dessas hemácias por diferentes enzimas, verificamos na Tabela 8, que a neuraminidase, na dependência da concentração em que era usada, alterava as hemácias de carneiro aumentando o título da enterotoxina LTp na prova de HI, realizada com os eritrócitos tratados.

Uma vez que os gangliosídeos GM1 e o GM2 são resistentes a essa enzima, o efeito deveria estar sendo sobre outros gangliosídeos, que seriam neuraminidase-sensíveis, tais como o GT1, GD1a e GD1b (119), transformando-os em monosialogangliosídeos através da remoção de ácido siálico.

Desta forma, gangliosídeos polisiálicos são os que primeiramente são degradados pela neuraminidase até o GM1, sendo que este último é resistente à enzima, pela presença da galactose terminal unida à matriz galactosamina (91), que representa uma barreira só rompida nos gangliosídeos GM1 e GM2 em certas condições, como na presença de sais biliares (125).

Para podermos nos certificar de que realmente a neuraminidase teria algum efeito sobre os receptores em eritrócitos, estendemos nossos estudos à hemácias de cobaia e humanas.

Desta forma, verificamos na Tabela 8, que tanto para hemácias de cobaia, como para as de origem humana, a sensibilização desses eritrócitos pelas enterotoxinas

LTh, LTp e TC, após o tratamento com neuraminidase, aumentou consideravelmente o título destas toxinas, determinado nas provas de IHR e HI.

Em trabalho anterior, verificando qual seria o receptor para a hemolisina do Vibrio parahaemolyticus em hemácias humanas, Takeda et al (120), extraíram a fração gangliosídica desses eritrócitos.

Observaram então que, dentre os gangliosídeos presentes nessas células, estavam o GD1a, o GT1 e, aparentemente, o GM2. O gangliosídeo GM1 não estava presente nas frações cromatografadas em camada delgada, onde também algumas manchas reveladas não foram identificadas.

No caso do aumento da sensibilização das hemácias humanas pelas enterotoxinas LTh, LTp e TC, após o tratamento com neuraminidase, poderíamos explicar as alterações observadas como devidas à ação desta enzima sobre polisialogangliosídeos, principalmente o GD1a e o GT1, identificados no trabalho de Takeda et al (119). Esses gangliosídeos teriam seus resíduos de ácido siálico removidos, adquirindo a função do GM1 com maior afinidade pelas enterotoxinas em questão e aumentando o título das mesmas, determinado nas provas de IHR e HI, realizadas com as hemácias tratadas.

Quanto às hemácias de cobaia, pelos resultados observados na Figura 1, identificamos na fração gangliosídica desses eritrócitos apenas o GM1. Outras manchas reveladas, mas não identificadas, pela indisponibilidade

de gangliosídeos padrão, foram também observadas.

De acordo com os resultados vistos na Tabela 8, onde verificamos um aumento da sensibilização dessas hemácias pelas enterotoxinas LTh, LTp e TC após o tratamento com a neuraminidase, poderíamos supor, como no caso das hemácias humanas, que gangliosídeos neuraminidase-sensíveis estariam presentes e pela ação da enzima, teriam suas afinidades pelas referidas toxinas aumentadas.

Conforme as observações de Takeda et al (119) já mencionadas, a hemolisina do Vibrio parahaemolyticus não só é capaz de lisar as hemácias humanas, como também dentre outras, as de cobaias (102, 13).

Uma vez que estes autores verificaram que na hemácia humana o receptor para esta hemolisina, era principalmente o GT1, seria de se supor no nosso caso, que este estivesse nas hemácias de cobaia por nós analisadas.

Todavia, nossos experimentos de cromatografia em sílica gel não tornaram possível evidenciar nas frações gangliosídicas das hemácias de cobaia, o GT1.

Contudo, esses achados não invalidam, em nossa opinião, a hipótese de que outros gangliosídeos correspondentes às manchas não identificadas (Figura 1), sejam neuraminidase-sensíveis e após o tratamento por esta enzima, tornassem as hemácias de cobaia mais capazes de serem sensibilizadas pelas enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Mas como explicar a tão baixa sensibilidade das hemácias de cobaia a essas enterotoxinas, uma vez que estas possuem GM1? Talvez a disposição desses gangliosídeos esteja de tal forma distribuída na membrana desses eritrócitos que, apesar de provavelmente adsorverem as toxinas, os passos que se sucedem, na ligação dos anticorpos e na fixação do complemento sejam prejudicados, alterando os resultados da HI e da IHR, no caso de algumas amostras ETEC (Tabela 3), e diminuindo o título das TC (Tabela 4), nas mesmas provas.

No que concerne às enzimas proteolíticas, não verificamos nas por nós estudadas nenhum efeito sobre os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC, nas concentrações em que foram utilizadas. Isto implicaria em um não envolvimento de receptores protéicos na adsorção das enterotoxinas em questão às hemácias de carneiro, uma vez que o título das mesmas, não foi alterado quando as provas de IHR e HI foram realizadas com hemácias tratadas pela protease, tripsina ou papaina.

Tampouco após o tratamento das hemácias de carneiro com as enzimas dextranase e ribonuclease, verificamos qualquer efeito sobre os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC, levando-nos a crer que os substratos destas não tem correlação direta ou indireta, com os receptores em questão.

Quanto ao tratamento das hemácias de carneiro por diversas substâncias químicas, redutoras e oxidantes, não caracterizamos nenhuma alteração significativa nos receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC, após os tratamentos.

Os tratamentos das hemácias de carneiro com mercaptoetanol e sulfito de sódio, não tiveram nenhum efeito aparente sobre os receptores, sugerindo que pontes dissulfeto e ligações sulfrídilas não seriam necessárias para a ligação das enterotoxinas aos receptores dessas células.

Por outro lado, os tratamentos dos mesmos eritrócitos com uréia e guanidina-HCl, também não alteraram o título das enterotoxinas determinado com essas hemácias, sugerindo o não envolvimento de pontes de hidrogênio, entre a toxina e os receptores das hemácias de carneiro.

As fracas soluções de periodato de sódio utilizadas, cujas concentrações não lissassem as hemácias e tampouco as aglutinassem, não tiveram qualquer efeito na determinação dos títulos das enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Quanto ao EDTA e desoxicolato de sódio, também não observamos após os tratamentos com essas substâncias, nenhum efeito irreversível sobre os receptores das hemácias de carneiro, para as enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Contudo, no tratamento das hemácias de carneiro, com formol a 8%, verificamos possíveis alterações nos receptores, uma vez que com relação à detecção de amostras ETEC, LT⁺ de origem humana e suína na prova de HI, muitas delas apresentaram resultados negativos. Por outro lado, temos na Tabela 13, que na determinação do título das enterotoxinas LTh, LTp e TC com hemácias frescas e formolizadas, o valor do mesmo diminuiu

Não temos no momento, uma explicação objetiva de como o formol atuaria nas hemácias de carneiro, modificando a sua sensibilização pelas enterotoxinas LTs de E. coli, de origem humana e suína e TC.

Entretanto, levando-se em consideração o que se conhece sobre a ação do formol em macromoléculas, poder-se-ia especular que esta substância, como agente alquilante, introduziria provavelmente em alguns sítios NH₂ presentes por exemplo no N-acetil galactosamina e no ácido N-acetil neuramínico do gangliosídeo GM1, radicais alquilas. Esta modificação alteraria biologicamente a função do mesmo, como receptor, para as enterotoxinas por nós estudadas, diminuindo a sensibilização das hemácias formolizadas.

Com a finalidade de verificarmos se os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC nas hemácias de carneiro, seriam mesma gangliosídeos, tendo em vista os resultados obtidos através das provas enzimáticas, optamos por extrair a fração gangliosídica dessas células.

Paralelamente, como termo de comparação, nos propusemos a extrair também as frações gangliosídicas das hemácias bovinas, que se mostraram tão sensíveis às LTs e à TC quanto as de carneiro e em contrapartida, as de cobaia, que foram as que menos se sensibilizaram com estas enterotoxinas, dentre os eritrócitos estudados.

Nossa finalidade era dupla, sendo que poderíamos: 1º) verificar quais os gangliosídeos que estavam presentes nessas hemácias, comparando os resultados aos padrões de que dispunhamos: GT1, GD1a e GM1; 2º) verificar se, após a extração dessas frações, as membranas delipidadas desses eritrócitos ainda reteriam a capacidade de adsorverem as enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Após a cromatografia das frações gangliosídicas obtidas das hemácias de carneiro e cobaia, verificamos, como já mencionado, que ambas as frações continham o gangliosídeo GM1, como mostra a Figura 1.

Infelizmente, as preparações obtidas a partir das hemácias bovinas ficaram muito diluídas para serem aplicadas na cromatografia, tendo apresentado manchas muito claras. Em vista disto, não dispomos de fotografias nítidas quanto aos gangliosídeos presentes nas preparações destas hemácias, e portanto, tais dados não foram apresentados.

Por outro lado, na verificação de se o processo de delipidação havia removido todos os receptores das hemácias de carneiro e bovinas para estas enterotoxinas, temos, pela Tabela 14, que preparados lisados das mesmas

hemácias são capazes de adsorverem as toxinas, mas os delipidados não.

Desta forma, podemos concluir que o processo de delipidação realmente removeu os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC nessas hemácias e que estes devem estar presentes nas frações gangliosídicas.

Para, mais uma vez, descartarmos a participação de proteínas nesses receptores extraídos das hemácias, dosamos o conteúdo protéico nas mesmas, verificando que apenas na fração gangliosídica extraída dos eritrócitos de cobaia, encontramos 1,2 mg/ml de proteína e nas de carneiro e de boi, apenas traços.

Holmgren et al (65), no estudo dos receptores para a LT de E. coli, verificaram que em enterócitos e "brush-border" do intestino de coelho delipidados para a extração da fração gangliosídica, não haviam mais receptores para a TC. Ao contrário, a enterotoxina LT ainda era capaz de se ligar de maneira considerável à fração delipidada dessas células, principalmente às da mucosa duodenal.

Tratamento do tecido delipidado com periodato, inativava completamente os sítios de ligação para a LT de E. coli, enquanto que o tratamento com pronase ou pelo calor, não reduzia essa adsorção consideravelmente. Entretanto, a digestão era capaz de solubilizar sítios de ligação para a LT, posteriormente identificados em frações cromatografadas em Sephadex G-10. Esses autores propuseram então, que no caso da LT embora ela se ligasse

intensamente ao GM1 no intestino de coelho, também se ligava a um receptor glicoprotéico.

Posteriormente, Holmgren et al (66), trabalhando com as mesmas preparações, oriundas no entanto de intestino humano, verificaram de maneira semelhante à observada em coelhos, que a extração dos lipídeos removia completamente os sítios receptores para a TC, mas os extratos ainda retiam significativa capacidade de adsorver LT.

Entretanto, quantitativamente os receptores protéicos em coelho e em humanos, eram diferentes. Enquanto no intestino de coelho, o receptor para LT, era cerca de dez vezes mais numeroso que os sítios gangliosídicos, no intestino humano representavam apenas cerca de 50% dos receptores.

Portanto, nossos resultados obtidos com hemácias de carneiro e bovinas, não coincidem com os obtidos em enterócitos e "brush-border" de coelho e humanos. Isto porque, as hemácias delipidadas não foram mais capazes de adsorverem as LTs estudadas e tampouco a TC, não nos levando a supor a presença de receptores protéicos nessas células.

Para verificarmos a afinidade das enterotoxinas LTh, LTp e TC a gangliosídeos isolados, verificamos a possibilidade dos gangliosídeos GM1, GT1 e GD1a, inibirem as reações sorológicas de IHR e HI, pela pré-incubação com as toxinas.

Pela Tabela 15 pudemos constatar, que na dependência da concentração em que são usados, todos os três gangliosídeos, isoladamente, são capazes de inibir as reações não só das enterotoxinas LTh, LTp e TC, como também de soluções puras das LTs, de origem humana e suína.

Na verificação da eficiência desta inibição por estes gangliosídeos, temos na Tabela 16, que o GM1 é o que em menores concentrações é capaz de inibir a adsorção das enterotoxinas LTh, LTp e TC às hemácias de carneiro. No caso das LTs, o GT1 é um pouco mais eficiente que o GD1a nessa inibição; entretanto, em concentrações respectivamente 160 e 310 vezes maiores que o GM1, na prova de IHR.

Com relação à TC, a inibição pelo GT1 e GD1a é ainda mais discrepante em relação ao GM1 do que no caso das LTs, sendo que ambos conseguem inibir a reação de IHR, em valores respectivamente 78 e 2.500 vezes superiores ao do GM1.

Nas provas de HI, apesar de com valores diferentes, os resultados em termos de inibição da reação com os gangliosídeos GM1, GT1 e GD1a, foram semelhantes aos verificados na IHR.

Holmgren et al (66), trabalhando em ensaios que associavam a técnica de cromatografia em camada delgada com autorradiografia, verificaram também que a ligação da TC e da LT de origem humana, é muito mais intensa em relação ao GM1 que aos demais gangliosídeos. Entre

tanto, encontraram a TC e a LT associadas nas revelações de autorradiografia, não só ao GM1, mas também a um outro monosialogangliosídeo, não identificado, e ao GD1b.

Nenhuma associação foi encontrada entre a TC e o GT1, e tampouco ao GD1a, como conseguimos demonstrar em nossos experimentos de inibição das reações sorológicas de IHR e HI.

Objetivando verificarmos também a inibição das reações de IHR e HI, pelas frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, cobaia e boi, pudemos observar que, na dependência da concentração de ácido siálico em que foram utilizadas, estas frações, foram capazes de inibir completamente os halos hemolíticos, na IHR e a aglutinação na HI, na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC, como demonstra a Tabela 17.

Posteriormente, num estudo comparativo entre as frações, verificamos pela Tabela 18, que de maneira geral, as frações gangliosídicas obtidas das hemácias de carneiro e de boi, foram as que em menores concentrações conseguiram inibir as reações de IHR e HI, na detecção destas enterotoxinas.

Para realmente correlacionarmos os receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC, com a fração gangliosídica das hemácias estudadas, restava-nos a tentativa de inibirmos uma atividade biológica.

Para isso, escolhemos o ensaio em células VERO, verificando então, pela Tabela 19, que a pré-incubação

destas enterotoxinas, com as frações gangliosídicas obtidas a partir das hemácias de carneiro, cobaia e boi, foram capazes de inibir o efeito de alongamento das células, causado por estas toxinas.

Desta forma, não só reações sorológicas "in vitro", como também a atividade biológica em cultura de células VERO, causada pelas enterotoxinas LTh, LTp e TC, puderam ser inibidas pela pré-incubação com as frações gangliosídicas. Isto nos leva a crer, que realmente os receptores específicos para as enterotoxinas em questão, estejam presentes nestas frações.

No caso especial das hemácias de carneiro e de cobaia, tendo em vista os resultados encontrados na cromatografia em camada delgada, o mais provável é que dentre os gangliosídeos, o GM1, seja realmente o receptor funcional para as enterotoxinas LTh, LTp e TC.

Infelizmente, uma conclusão absoluta do envolvimento exclusivo do GM1, como o receptor destas enterotoxinas nas hemácias de carneiro e cobaia, só seria possível se bloqueássemos nessas células, este gangliosídeo com um anticorpo específico.

Entretanto, em contato que mantivemos com os grupos do Prof. Lars Svernerholm, do Departamento de Neurochemistry, Psychiatric Research Center, da Universidade de Gotenborg Suécia, e do Prof. Toshio Miwatani, do Departamento de Bacteriology and Sorology, Research Institute for Microbiological Diseases, da Universidade de Osaka, Japão (comunicações pessoais), isto só seria possível

através de anticorpos monoclonais exclusivos dos determinantes antigênicos do GM1, uma vez que existe uma reação cruzada entre os diferentes gangliosídeos. Sendo que o peso molecular médio dos gangliosídeos é de cerca de 2.000 daltons (118), estes são pouco imunogênicos e devem ser acoplado a proteínas carreadoras, o que dificulta ainda mais a obtenção desses anticorpos monoclonais, não conseguidos por nenhum grupo, até o momento.

Maiores esclarecimentos quanto a sensibilização das demais hemácias estudadas, ou sejam, as de coelho e as de galinha, pelas enterotoxinas LTs, carecem de experimentos complementares.

Podemos supor que as variações encontradas inicialmente nas provas de sensibilização das diferentes hemácias investigadas pelas enterotoxinas LTs de origem humana e suína, além da TC, devam ser reflexo da variação qualitativa e quantitativa dos diferentes gangliosídeos nessas células.

Por outro lado, não conseguimos, infelizmente, obter resultados nas provas de HI realizadas com o objetivo de verificarmos a inibição da adsorção das LTs às hemácias de carneiro, pela TC. Isto deveu-se ao fato destas toxinas possuírem muitos epítomos em comum, o que acarreta reações cruzadas que não conseguimos evitar, mesmo em se trabalhando com soros preparados com as enterotoxinas purificadas.

A fim de conseguirmos verificar, através de provas sorológicas envolvendo hemácias, a inibição da

adsorção de uma enterotoxina pela outra, nessas células, precisaríamos dispor de anticorpos monoclonais exclusivos para uma e para outra, com os quais não contávamos.

Contudo, analisando os resultados em conjunto, não verificamos diferenças entre os obtidos com as LTs e a TC, no que tange a seus receptores nas hemácias estudadas.

Esperamos pelo que foi exposto, ter esclarecido o mecanismo intrínseco das reações sorológicas envolvendo hemácias, usadas na detecção das enterotoxinas LTs de E. coli de origem humana e suína e TC, evidenciando que mais uma vez, o GM1 deva ser nessas células, o receptor natural destas toxinas.

Por outro lado, nossos resultados obtidos quanto à inibição por outros gangliosídeos, que não o GM1, além da demonstração da sensibilidade de hemácias, que não o contêm, pelas enterotoxinas estudadas, amplia o número possível de receptores funcionais para estas toxinas em membranas celulares, apesar de terem com relação às mesmas, menores afinidades.

5. RESUMOS E CONCLUSÕES

Nas reações sorológicas de imuno-hemólise passiva (IHP), imuno-hemólise radial (IHR) e hemaglutinação indireta (IH), usadas na detecção das enterotoxinas LTs de Escherichia coli, de origem humana e suína e toxina colérica, estas se adsorvem naturalmente às hemácias de carneiro, sem a necessidade de qualquer agente ligante. Esta ligação só poderia ser explicada, pela presença de receptores específicos para estas enterotoxinas nessas células, que até o momento, não haviam sido identificados e caracterizados.

Com o propósito de esclarecermos a natureza desses receptores, nos propusemos, no presente trabalho, a estudar os seguintes itens:

- a) Verificar a sensibilização de eritrócitos de galinha, cobaia, boi e do homem, pelas enterotoxinas LTs, de origem humana e suína e TC, a fim de obtermos subsídios para podermos comparar eventuais diferenças nos receptores para estas toxinas em hemácias, além de uma provável adaptação das técnicas sorológicas de IHP, IHR e HI, à essas células.
- b) No estudo das relações existentes entre as LTs de origem humana e suína e TC a seus receptores em eritrócitos, verificar o efeito dos seguintes fatores físico-químicos: pH, temperatura e tempo de adsorção.

- c) Tentar inibir a adsorção das enterotoxinas LTs de origem humana e suína aos eritrócitos de carneiro, por diversos carboidratos e poliálcoois.
- d) Estudar a natureza química dos receptores para as LTs e TC, através do tratamento das hemácias de carneiro, e eventualmente de outras, por enzimas que atuassem em diferentes substratos.
- e) Verificar o efeito de diferentes substâncias químicas, sobre os receptores das hemácias de carneiro, para as enterotoxinas LTs e TC.
- f) Cromatografar em sílica gel as frações gangliosídicas extraídas de hemácias, com a finalidade de identificarmos os gangliosídeos presentes nas mesmas.
- g) Verificar a capacidade de hemácias delipidadas após a extração de suas frações gangliosídicas, de adsorverem as enterotoxinas LTs e TC.
- h) Tentar inibir pela pré-incubação com os gangliosídeos GM1, GT1 e GD1a, as reações sorológicas de IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LTs e TC.
- i) Tentar inibir pela pré-incubação com as frações gangliosídicas extraídas dos eritrócitos, as reações sorológicas de IHR e HI, realizadas com hemácias

de carneiro na detecção das enterotoxinas LTs e TC.

- j) Tentar inibir o efeito citotônico, causado pelas enterotoxinas LTs e TC, em células VERO, pela pré-incubação das toxinas com as frações gangliosídicas extraídas dos eritrócitos.

Os principais resultados e conclusões decorrentes desses procedimentos, podem ser assim resumidos:

- 1- Hemácias bovinas são tão sensíveis às LTs, de origem humana e suína, quanto as de carneiro, podendo substituí-las perfeitamente nas provas sorológicas de IHP, IHR e HI.
- 2- Dentre as hemácias estudadas, as de cobaia e humanas foram as que aparentemente menos se sensibilizaram com as enterotoxinas LTs de origem humana e suína, quando verificado pelas provas de IHP, IHR e HI.
- 3- A TC demonstrou um padrão de sensibilização às hemácias bovinas, de carneiro e humanas, igual aos da LTs, nas provas de IHR e HI.
- 4- Nos pHs estudados de 8,5, 7,2, e 5,0, não observamos variações significativas quanto à adsorção destas enterotoxinas às hemácias de carneiro, como verificado pela pequena variação do título das toxinas.

nas LTh, LTp e TC, determinado nas provas de IHR e HI. Contudo, em relação à LTp, o pH 8,5, parece ser o mais adequado para que haja adsorção.

- 5- A adsorção das enterotoxinas LTs e TC às hemácias de carneiro, a 37°C, é muito rápida, sendo que após 2 minutos de contato, pelo menos 25% das toxinas estudadas já haviam se adsorvido aos eritrócitos de carneiro. Após 15 minutos de contato, os títulos das enterotoxinas já haviam alcançado os seus valores máximos determinados pelas provas de IHR e HI.
- 6- Os seguintes açúcares e poliálcoois: maltose, lactose, rafinose, D-manose, dulcitol, glicose, metil D-glicosídeo, D-galactose, sorbitol, arabinose, inositol e celobiose, foram incapazes, na concentração de 1%, de inibir a adsorção das enterotoxinas LTs de origem humana e suína, aos receptores destas células, como verificado pela prova de IHR.
- 7- A ação da neuraminidase sobre hemácias que se sensibilizaram pouco, como as de origem humana e as de cobaia, aumentou a sensibilidade das mesmas em adsorverem as enterotoxinas LTh, LTp e TC após o tratamento, como verificado pelo aumento do título das toxinas nas provas de IHR e HI.
- 8- Não se verificou alteração dos receptores para as enterotoxinas LTh, LTp e TC, após o tratamento das

hemácias de carneiro pelas enzimas proteolíticas protease, tripsina e papaina, não indicando portanto, qualquer envolvimento protéico nos receptores para estas toxinas.

- 9- Tampouco tiveram qualquer efeito sobre os receptores para as LT_s e TC, nas hemácias de carneiro, as enzimas dextranase e ribonuclease, sugerindo o não envolvimento direto ou indireto de polímeros de carboidratos e tampouco de RNA, nesses receptores.
- 10- O tratamento das hemácias de carneiro por mercaptoetanol e sulfito de sódio, em diversas concentrações, não alteraram os receptores para as enterotoxinas LTh LTp e TC nas hemácias de carneiro, como verificado pela não alteração dos títulos destas enterotoxinas nas provas de IHR e HI, realizadas com as hemácias tratadas. A ausência de alterações, pressupõe o não envolvimento de ligações sulfidrilicas nesses receptores.
- 11- Tampouco os tratamentos das mesmas hemácias de carneiro com uréia e guanidina, não alteraram o título das enterotoxinas estudadas, sugerindo o não envolvimento de pontes de H⁺ nos receptores para estas toxinas, nessas células.
- 12- As frações gangliosídicas obtidas a partir das hemácias de carneiro e de cobaia, apresentaram em cro-

matografia em camada delgada de sílica gel, manchas com padrão de migração semelhante ao do gangliosídeo GM1, evidenciando nessas frações a presença do mesmo.

- 13- As hemácias delipidadas de carneiro e de boi, perderam a capacidade de adsorverem as enterotoxinas LTh LTp e TC, após o tratamento de extração dos lipídeos, indicando que este deve ter removido os receptores para estas toxinas.
- 14- Em concentrações de 100 µg/ml, os gangliosídeos GM1, GT1 e GD1a, inibiram completamente as reações de IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LTh LTp e TC (solução contendo 0,08 µg/ml).
- 15- Num estudo comparativo, o gangliosídeo GM1 se mostrou muito mais eficiente que o GT1 e o GD1a, na capacidade de se ligar às enterotoxinas LTh LTp e TC, uma vez que em menores concentrações, inibe as reações sorológicas de IHR e HI.
- 16- Em termos relativos, as concentrações mínimas dos gangliosídeos GD1a e GT1, necessárias para inibir as reações de IHR e HI na detecção da TC, são várias vezes superiores às exigidas para inibir as enterotoxinas LTh e LTp.

- 17- As frações gangliosídicas das hemácias de carneiro, cobaia e boi, foram capazes de inibir em concentrações de aproximadamente 15 µg de ácido siálico/ml, as reações de IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LTh, LTp e TC (0,08 µg/ml), pela pré-incubação com as mesmas.
- 18- Em termos relativos às frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro e bovinas, inibiram as reações sorológicas de IHR e HI, em concentrações inferiores às de cobaia, na detecção das enterotoxinas LTh LTp e TC.
- 19- Em culturas de células VERO, as frações gangliosídicas extraídas das hemácias de carneiro, cobaia e boi, inibiram o efeito citotônico de alongamento, causado pelas enterotoxinas LTh LTp e TC, pela pré-incubação com as mesmas.
- 20- Tendo em vista os resultados obtidos quanto às hemácias de carneiro, podemos concluir que os receptores nestas células, envolvidos na sensibilização natural verificada nas provas de IHP, IHRS, IHR e HI, na detecção das enterotoxinas LT de E. coli e TC, são gangliosídeos, principalmente o GM1.
- 21- Comparando-se os resultados obtidos em nossos experimentos, com relação às enterotoxinas LTs de E. coli e TC, não verificamos diferenças quanto aos

receptores para estas enterotoxinas nos eritrócitos estudados.

- 22- A baixa sensibilidade às enterotoxinas LTs de E. coli e TC, verificada pelas provas de IHR e HI realizadas com hemácias humanas, poderia ser explicada pela presença nessas células, de outros gangliosídeos, como o GT1 e GD1a, com menores afinidades pelas mesmas, além de ausência do GM1 nas mesmas.
- 23- Quanto às hemácias de cobaia, a caracterização do GM1 na fração gangliosídica extraída das mesmas, aliados à baixa sensibilidade verificada nas provas do IHP, IHR e HI realizadas com esses eritrócitos na detecção das enterotoxinas LTs e TC, nos levam a crer que a distribuição desses gangliosídeos, na superfície celular, deva dificultar o mecanismo das provas sorológicas estudadas. Isso explicaria o grande número de resultados sorológicos falso-negativos, obtidos na realização dessas provas com hemácias de cobaia.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALDERETE J. F. & ROBERTSON, D. C. - Purification and chemical characterization of the heat-labile enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli. Infect. Immun. 19:1021-1030, 1978.
2. AIMOTO, S.; TAKAO, T.; SAIMONISHI, Y.; HARA, S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. - Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic Escherichia coli. Eur. J. Biochem. 129: 257-263, 1982.
3. BACK, E.; SVENNERHOLM, A. M.; HOLMGREN, J. & MÖLLBY, R. - Evaluation of a ganglioside immunosorbent assay for detection of Escherichia coli heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 10:791-795, 1979.
4. BANWELL, J. G.; GORBACH, S. L.; PIERCE, N. F.; LITRA, R. & MONDAL, A. - An indifferiated human diarrhoea in the tropic. II Alterations in intestinal fluid and electrolyte movement. J. Clin. Invest., 50:890, 1971.
5. BARTH, R. F.; MERCHANT, B. - Adaptation of the hemolytic plaque technique for enumeration of immune cells responding to heterologous immunoglobulin antigens. Proc. Soc, Exp. Biol. Med., 125:307-309, 1967.

6. BARTUS, H.; ACTOR, P.; SNIPES, E.; SEPLOCK, D. & ZAJAC, I. - Indications that the erythrocyte receptors involved in enterotoxigenic Escherichia coli attachment is a sialoglyco-conjugate. J. Clin. Microbiol. 21:951-954, 1985.
7. BERNHEIMER, A. W. editor - Perspectives in toxinology. New York University Medical Center Copyright by John Willy & Son, Inc., 1977.
8. BURGESS, M. N.; BYWATER, R. J.; COWLEY, C. M.; MULLAN, N. A. & NEWSOME, P. M. - Biological evaluation of a methanol-soluble heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. Infect. Immun., 21:526-531, 1978.
9. CARPENTER, C. C. J.; CURLIN, G. T. & GREENOUGH, W. B. - Response of canine Thiry-Vella jejunal loops to cholera exotoxin and its modification by ethacrynic acid. J. Infect. Dis., 120:332, 1969.
10. CASTRO, A. F. P. de; SERAFIM, M. B.; GOMES, J. A. & GATTI, M. S. V. - Improvements in the passive immune haemolysis test for assaying enterotoxigenic Escherichia coli. J. Clin. Microbiol., 12:714-717, 1980.
11. CLEMENTS, J. D. & FINKELSTEIN, R. A. - Immunological cross-reactivity between a heat-labile enterotoxin (s) of Escherichia coli and subunits of Vibro cholerae enterotoxin. Infect. Immun., 21: 1036-1039, 1978.

12. CLEMENTS, J. D. & FINKELSTEIN, R. A. - Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxins from Vibrio cholerae and Escherichia coli. Infect. Immun., 22:760-769, 1978.
13. CLEMENTS, J. D. & FINKELSTEIN, R. A. - Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from Escherichia coli cultures. Infect. Immun., 24: 706-769, 1979.
14. CLEMENTS, J. D.; YANCEY, R. J. & FINKELSTEIN, R. A. - Properties of homogeneous heat-labile enterotoxin from Escherichia coli. Infect. Immun., 29:91-97, 1980.
15. CRITCHLEY, D. R.; ANSELL, S.; PERKINS, R.; DIKS, S. & INGRAM, J. - Isolation of cholera toxin receptors from a mouse fibroblast and lymphoid cell line by immune precipitation. J. Supramol. Struct., 12: 273-291, 1979.
16. CRITCHLEY, D. R.; MAGNANI, J. L. & FISHMAN, P. H. - Interaction of cholera toxin with rat intestinal brush border membranes. Relative roles of gangliosides and galactoproteins as toxin receptors. J. Biol. Chem., 256:8724-8731, 1981.
17. CRITCHLEY, D. R.; STREVLII, C. H.; KELLIE, S.; ANSELL, S. & PATEL, B. - Characterization of the cholera toxin receptor on BALB/C 3T3 cells as a ganglioside similar to, or identical with ganglioside GM1. Biochem. J., 204:209-219, 1982.

18. CUATRECASAS, P. - Interaction of Vibrio cholerae enterotoxin with cell membranes. Biochemistry, 12: 3547-3558, 1973.
19. CUATRECASAS, P. & GREAVES, M. F. edits - Receptors and Recognition. London Chapman and Hall. A Holsted Press Book, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1^o ed., 212 p., 1977.
20. DARFEUILLE, A.; LAFEUILLE, B.; JOLY, B. & CLUZEL, R. - A new colonization factor antigen (CFA/III) produced by enteropathogenic Escherichia coli 0128:B12. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 134 A: 53-64, 1983.
21. DARFEUILLE, A.; MICHAUD, A.; FORESTIER, C.; JOLY, B. & CLUZEL, R. - Identification of a non fimbrial adhesive factor of an enterotoxigenic Escherichia coli strain. Infect. Immun., 52:468-475, 1986.
22. DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. & WOOD, B. W. - Microbiology. Harper & Row Publishers, New York, Evanston and London, 4^o edição, 1.464 p., 1968.
23. DEAN, A. G.; CHING, Y. C.; WILLIAMS, R. G. & HARDEN, R. B. - Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1973.

24. DEAN, E. A. & ISAACSON, R. E. - Purification and characterization of a receptor for the 987P pilus of Escherichia coli. Infect. Immun., 47:98-105, 1985.
25. DONTA, S. T.; MOON, H. W. & WHIPP, S. C. - Detection of heat-labile Escherichia coli enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science, 183:334-336, 1974.
26. DONTA, S. T. - Interaction of choleraenoid and GM1 ganglioside with enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli in cultured adrenal cells. J. Infect. Dis., 133 (Suppl.):S115-S119, 1976.
27. DREYFUS, L. A. & ROBERTSON, D. C. - Solubilization and partial characterization of the intestinal receptor for Escherichia coli heat-stable enterotoxin. Infect. Immun. 46:537-543, 1984.
28. EIDELS, L.; PROIA, R. L. & HART, D. A. - Membrane receptors for bacterial toxins. Microbiol. Rev., 47:596-620, 1983.
29. EVANS, D. J. Jr., EVANS, D. G. - Inhibition of immune haemolysis: Serological assay for the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Clin. Microbiol., 5:100-105, 1977.

30. EVANS, D. J. Jr. & EVANS, D. G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of Escherichia coli, using passive immune haemolysis. *Infect. Immun.*, 16:604-609, 1977.
31. EVANS, D. G.; EVANS, D. J. Jr. & TJOA, W. - Haemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, 18:330-337, 1977.
32. EVANS, D. G. & EVANS, D. J. Jr. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic Escherichia coli of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.*, 21:638-647, 1978.
33. FARIS, A.; LINDAHL, M. & WADSTRÖM, T. - GM2-like glycoconjugate, as possible erythrocyte receptor for the CEA/I and K99 haemagglutinins of enterotoxigenic Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.*, 7:265-269, 1980.
34. FAIRBROTHER, J. M.; LARIVIÈRE, S. & LALLIER, R. - New fimbrial antigen Fl65 from Escherichia coli serogroup 0115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect. Immun.*, 51:10-15, 1986.
35. FINKELSTEIN, R. A. - Cholera. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2:553-623, 1973.

36. FISHMAN, P. H.; MOSS, J. & VAUGHAN, M. - Uptake and metabolism of gangliosides in transformed mouse fibroblast. Relationship of ganglioside structure to cholera response. *J. Biol. Chem.*, 251:4490-4494, 1976.
37. FISHMAN, P. H.; MOSS, J. & OSBORNE, J. C. Jr. - Interaction of cholera toxin with the oligosaccharide of ganglioside GM1: evidence for multiple oligosaccharide binding sites. *Biochemistry*, 17:711-716, 1978.
38. GAASTRA, W. & de GRAAF, F. K. - Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains. *Microbiol. Rev.*, 46:129-161, 1982.
39. GARIÉPY, J. & SCHOOLNIK, G. K. - Design of a photoreactive analogue of the Escherichia coli heat-stable enterotoxin ST1b: Use in identifying its receptor on rat brush border membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 83:483-487, 1986.
40. GEARY, S. J.; MARCHLEWICZ, B. A. & FINKELSTEIN, R.A. - Comparison of heat-labile enterotoxins from porcine and human strains of Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 36:215-220, 1982.
41. GEMMEL, C. G. - Comparative study of the nature and biological activities of bacterial enterotoxins. *J. Med. Microbiol.*, 17:217-235, 1984.

42. GILL, D. M.; CLEMENTS, J. D.; ROBERTSON, D. C. & FIN-
KELSTEIN, R. A. - Subunit number and arrangement
in Escherichia coli heat-labile enterotoxin. *Infect.*
Immun., 33:677-682, 1981.
43. de GRAAF, F. K. & ROORDA, I. - Production, purifi-
cation and characterization of the fimbrial adhesive
antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic
Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 36:751-758, 1982.
44. GREEN, B. A.; NEIL, R. J.; RUYECHAN, W. T. & HOLMES,
R. K. - Evidence that a new enterotoxin of
Escherichia coli which activities adenylate cyclase
in eucaryotic target cells is not plasmid mediated.
Infect. Immun., 41:383-390, 1983.
45. GUERRANT, R. L.; CHEN, L. C. & SHARP, G. W. G. -
Intestinal adenylcyclase activity in canine cholera:
correlation with fluid accumulation. *J. Infect.*
Dis., 125:377, 1972.
46. GUERRANT, R. L.; PIERCE, N. F.; GANGULY, V.; GREENOUGH,
W. B. & WALLACE, L. K. - Mechanism of action of
an Escherichia coli enterotoxin. *J. Clin. Invest.*,
51:39a, 1972.
47. GUIH, B. E. C.; PICKETT, C. L.; TWIDDY, E. M.; HOLMES, R. K.;
GOMES, T. A. T.; LIMA, A. A. M.; GUERRANT, R. L.; FRANCO, B.
D. G. M. & TRABULSI, L. R. - Production of type II heat-
labile enterotoxin by Escherichia coli isolated from food and
human feces. *Infect. Immun.*, 54:587-589, 1986.

48. GUTH, B. E. C.; TWIDDY, E. M.; TRABULSI, L. R. & HOLMES, R. K. - Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 54:526-536, 1986.
49. GYLES, C. L. - Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from Escherichia coli enteropathogenic for pigs. *Ann. N. Y. Acad. Sci., U.S.A.*, 176:314-322, 1971.
50. HAKOMORI, S. - Glycosfingolipids, *Scientific American*, May: 32-41, 1986.
51. HARTREE, E. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analyt. Biochem.*, 48:442, 1972.
52. van HEYNINGEN, W. E.; CARPENTER, C. C. J.; PIERCE, N. F. & GREENOUGH, W. B. - Deactivation of cholera toxin by gangliosides. *J. Infect. Dis.*, 124:415-418, 1971.
53. van HEYNINGEN, S. - Cholera toxin: interaction of subunits with ganglioside G_{M1}. *Science*, 183:656-657, 1974.
54. HOLLENBERG, M. D.; FISHMAN, P. H.; BENNETT, V. & CUATRECASAS, P. - Cholera toxin and cell growth: role of membrane gangliosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 71:4224-4228, 1974.

55. HOLMES, R. K.; TWIDDY, E. M. & PICKETT, C. L. - Purification and characterization of Type II heat-labile enterotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun., 53:464,473, 1986.
56. HOLMGREN, J. - Comparison of the tissue receptors for Vibrio cholerae and Escherichia coli enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxoid. Infect. Immun., 8:851-859, 1971.
57. HOLMGREN, J.; LÖNNROT, I. & SVENNERHOLM, L. - Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 gangliosides and related glycolipids. Infect. Immun., 8:208-214, 1973.
58. HOLMGREN, J. - Immunological and receptor-binding properties of cholera toxin and its subunits. In: Proceedings of the 9th Joint Conference on cholera, U.S. Japan Cooperative Medical Science Program. Publ. 8762 U.S. Department of State, Washington, D.C., 196-213, 1974.
59. HOLMGREN, J.; MANSSON, J. E. & SVENNERHOLM, L. - Tissue receptor for cholera exotoxin: structure requirements of GM1 gangliosides in toxin binding and inactivation. Med. Biol., 52:229-233, 1974.
60. HOLMGREN, J. & LÖNNROTH, I. - Oligomeric structure of cholera toxin: characteristics of the H and L subunits. J. Gen. Microbiol., 86:49-65, 1975.

61. HOLMGREN, J.; LÖNNROTH, I.; MANSSON, J. E. & SVENNERHOLM, L. - Interaction of cholera toxin and membrane GM1 ganglioside in small intestine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 72:2520-2524, 1975.
62. HOLMGREN, J. & LÖNNROTH, I. - Cholera toxin and the adenylate cyclase activating signal. J. Infect. Dis., 133 (Suppl.):564-574, 1976.
63. HOLMGREN, J. & LÖNNROTH, I. - Structure and function of enterotoxins and their receptors. - In: "Ö. Ouchterlony and J. Holmgren (eds), 43rd Nobel Symposium Stockholm. Cholera and related diarrheas. S. Karger, Basel, p. 88-103, 1978.
64. HOLMGREN, J.; ELWING, H.; FREDMAN, P.; STRANNEGARD, Ö. & SVENNERHOLM, L. - Gangliosides as receptors for bacterial toxins and Sendai virus. Adv. Exp. Med., 125:453-470, 1979.
65. HOLMGREN, J.; FREDMAN, P.; LINDBLAD, M.; SVENNERHOLM, A. M. & SVENNERHOLM, L. - Rabbit intestinal glycoprotein receptor for Escherichia coli heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. Infect. Immun., 38:424-433, 1982.
66. HOLMGREN, J.; LINDBLAD, M.; FREDMAN, P.; SVENNERHOLM, L. & MYRVOLD, H. - Comparison of receptors for cholera and Escherichia coli enterotoxins in human intestine. Gastroenterology, 89:27-35, 1985.

67. HONDA, T.; TSUJI, T.; TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. - Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 34:337-340, 1981.
68. HONDA, T.; ARITA, M. & MIWATANI, T. - Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic Escherichia coli: a possible new colonization factor. *Infect. Immun.*, 43:959-965, 1984.
69. HYUN, C. S.; KIMMICH, G. A. - Interactions of cholera toxin and Escherichia coli enterotoxin with isolated intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, 247 (Gastrointest. Liver Physiol. 10): G623-G631, 1984.
70. ISAACSON, R. E.; NAGY, B. & MOON, H. W. - Colonization of porcine small intestine by Escherichia coli colonization and adhesion factors of pig enteropathogens which lack K88. *J. Infect. Dis.*, 135: 531, 1977.
71. JACOB, C. O.; ARNON, R. & FINKELSTEIN, R. A. - Immunity to heat-labile enterotoxins of porcine and human Escherichia coli strains achieved with synthetic cholera toxin peptides. *Infect. Immun.*, 52:562-567, 1986.
72. JONES, G. W. & RUTTER, J. M. - Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by Escherichia coli in piglets. *Infect. Immun.*, 6:918-927, 1972.

73. JONES, G. W. & RUTTER, J. M. - The association of K88 antigen with haemagglutinating activity of porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 84:135-144, 1974.
74. KARCH, H.; HEESEMANN, J. LAUFS, R.; O'BRIEN, A. D.; TACKET, C. O. & LEVINE, M. M. - A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect. Immun.*, 55:455-461, 1987.
75. KATELEY, J. R. & FRIEDMAN, H. - Use of erythrocytes sensitized with purified enterotoxin from *Vibrio cholerae* for the assay of antibody and antibody-forming cells. *J. of Infect. Dis.*, 131:144-148, 1975.
76. KENNEDY, D. J.; GREENBERG, R. N.; DUNN, J. A.; ABERNATHY, R.; RYERSE, J. S. & GUERRANT, R. L. - Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins StB on intestines of mice, rats, rabbits and piglets. *Infect. Immun.*, 46:639-643, 1984.
77. KNUTTON, S.; LLOYD, D. R. & McNEISH, A. S. - Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype 0148:H28 which adherest human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor. *Infect. Immun.*, 55:86-92, 1987.

78. LENINGHER, A. L. - Princípios de Bioquímica. Traduzido por W. R. LODI & A. A. SIMÕES, Sarvier, São Paulo, 725 p., 1986.
79. LIMA, A. O. & SILVA, W. D. - Imunologia Imunopatologia Alergia. Ed. Guanabara Koogan, R. J., 1a. ed., 673 p., 1970.
80. MAAS, R.; SILVA, R. M.; GOMES, T. A. T.; TRABULSI, L. R. & MAAS, W. K. - Detection of genes for heat-stable enterotoxin I in Escherichia coli strains isolated in Brazil. Infect. Immun., 49:46-51, 1985.
81. MILLER, J. F. A. P.; WARNER, N. L. - The immune response of normal, irradiated and thymectomized mice to immunoglobulin G as detected by a hemolytic plaque technique. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 40:59-71, 1971.
82. MORITA, A.; TSAO, D. & KIM, Y. S. - Identification of cholera toxin binding glycoprotein in rat intestinal microvillus membranes. J. Biol. Chem., 255:2549-2553, 1981.
83. MORRIS, J. A.; STEVENS, A. & SOJKA, W. J. - Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from Escherichia coli B41. J. Gen. Microbiol., 99:353-357, 1977.

84. MOSS, J.; FISHMAN, P. H.; MANGANIELLO, V. C.; VAUGHAN, M. & BRADY, R. O. - Functional incorporation of ganglioside into intact cells: induction of cholera toxin responsiveness. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 73:1034-1037, 1976.
85. MOSS, J.; MANGANIELLO, V. C. & FISHMAN, P. H. - Enzymatic and chemical oxidation of gangliosides in cultured cells: effect of cholera toxin. Biochemistry, 16:1876-1881, 1977.
86. MOSS, J.; GARRISON, S.; FISHMAN, P. H. & RICHARDSON, S. H. - Ganglioside sensitizes unresponsive fibroblasts to Escherichia coli heat-labile enterotoxin. J. Clin. Invest., 64:381-384, 1979.
87. MOSS, J. & VAUGHAN, M. - Activation of adenylate cyclase by cholera toxin. Am. Rev. Biochem., 48:581-600, 1979.
88. MOSS, J.; OSBORNE Jr., J. C.; FISHMAN, P. H.; NAKAYA, S. & ROBERTSON, D. C. - Escherichia coli heat-labile enterotoxin ganglioside specificity and ADP-ribosyl transferase activity. J. Biol. Chem., 256:12861-12865, 1981.
89. NALIN, D. R. & McLAUGHLIN, J. C. - Effects of cholera toxin and glucose on the response of dog intestine to Escherichia coli enterotoxins. J. Med. Microbiol., 11:177-196, 1978.

90. NATARO, J. P.; SCALETSKY, I. C. A.; KAPER, J. B.;
LEVINE, M. M. & TRABULSI, L. R. - Plasmid
mediated factors conferring diffuse and localizes
adherence of enteropathogenic Escherichia coli.
Infect. Immun., 48:378-383, 1985.
91. OHMAN, R.; ROSENBERG, A. & SVENNERHOLM, L. - Human
brains sialidase. Biochemistry, 9:3774, 1970.
92. ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F.; SMITH, H. W. & SOJKA, W. S.
- The establishment of K99, a thermolabile transmissi-
sible Escherichia coli K antigen, previously called
"Kco" possessed by calf and lamb enteropathogenic
strains. Acts. Pathol. Microbiol. Scand. Sec. B,
83:31-36, 1975.
93. PENICK, R. J.; MEISLER, M. H. & CLUER, R. H. - Thin
layer chromatographic studies of human brain gan-
gliosides. Biochem. Biophys. Act, 116:279-287,
1966.
94. PICKEN, R. N.; MAZAITIS, A. J.; MAAS, W. K.; REY, M.
& HEYNEKER, H. - Nucleotide sequence of the genes
for heat-stable enterotoxin II of Escherichia coli.
Infect. Immun., 42:269-275, 1983.
95. PICKETT, C. L.; TWIDDY, E. M.; BELISLE, B. W. & HOLMES,
R. K. - Cloning of genes that encode a new heat-
labile enterotoxin of Escherichia coli. J. Bacteriol.,
165:348-352, 1986.

96. PIERCE, N. F. - Differential inhibitory effects of cholera toxoids and ganglioside on the enterotoxins of Vibrio cholerae and Escherichia coli. J. Exp. Med., 137:1009-1023, 1973.
97. RICCI, L. C. & CASTRO, A. F. P. de - Indirect haemagglutination test for the detection of thermo-labile (LT) enterotoxin from Escherichia coli. Med. Microbiol. Immunol., 175:251-260, 1986.
98. RUTTER, J. M.; BURROWS, M. R.; SELLWOOD, R. & GIBBONS, R. A. - A genetic basis for resistance to enteric disease caused by Escherichia coli. Nature (London), 257:135-136, 1975.
99. SACK, R. B. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic Escherichia coli. Ann. Rev. Microbiol., 29:333-353, 1975.
100. SACK, R. B. - Enterotoxigenic Escherichia coli. Identification and characterization. J. Infect. Dis., 142:279-286, 1980.
101. SACK, D. A.; HUDA, S.; NEOGI, P. K. B.; DANIEL, R. B. & SPIRA, W. M. - Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for vibrio and Escherichia coli heat-labile enterotoxins and antitoxin. J. Clin. Microbiol., 11:35-40, 1980.

102. SAKURAI, J.; BAHAVAR, A.; JINGUJI, Y. & MIWATANI,
- Interaction of thermostable direct hemolysis of
Vibrio parahaemolyticus with human erythrocytes
Biken. J., 18: 187-192, 1975.
103. SELLWOOD, R.; GIBBONS, R. A.; JONES, G. W. & RUTTER,
J. M. - Adhesion of enteropathogenic Escherichia
coli to pig intestinal brush borders: the
existence of two pig phenotypes. J. Med. Micro-
biol., 8:405-411, 1975.
104. SERAFIM, M. B.; CASTRO, A. F. P. de; REIS, M. H. L.;
& TRABULSI, L. R. - Passive immune haemolysis
for detection of heat-labile enterotoxin produced
by Escherichia coli isolated from different
sources. Infect. Immun., 24:606-610, 1979.
105. SERAFIM, M. B.; CASTRO, A. F. P. de; LEONARDO, M. B.;
MONTEIRO, A. R. - A single radial immune haemolysis
(SRHI) test for the detection of thermolabile (LT)
enterotoxins of Escherichia coli. J. Clin. Micro-
biol., 14:473-478, 1981.
106. SIVASWAMY, G. & GYLES, C. L. - The prevalence of
enterotoxigenic Escherichia coli in feces of calves
with diarrhea. Can. J. Comp. Med., 40:241-246,
1976.

107. SMITH, H. W. & HALLS, G. - Observation by the ligated intestinal segment and oral inoculation method on Escherichia coli infection in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Path. Bact., 93: 495-529, 1967.
108. SMITH, H.; GAASTRA, W.; KAMERLING, J. P.; VLIEGENTHART, J. G. & GRAAF, F. K. - Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic Escherichia coli K99 fimbrial adhesin. Infect. Immun., 46:578-584, 1984.
109. SO, M. & MCCARTHY, B. J. - Nucleotide sequence of the bacterial transposon TN 1681 encoding a heat-stable toxin and its identification in enterotoxigenic Escherichia coli strains. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77:4011-4015, 1980.
110. SOJKA, W. J. - Escherichia coli in domestic animal and poultry. Review series n^o 7 - Commonwealth Agricultural Bureaux of animal Health, Weybridge, England, 1965.
111. SPEIRS, J. F.; STAVRIC, S. & KONOWALCHUN, J. - Assay of Escherichia coli heat-labile enterotoxin with VERO cells. Infect. Immun., 16:617-622, 1977.
112. SPRINGER, G. F. & DEASAI, P. R. - The human blood group MN antigens and precursor specificities. Carbohydr. Res., 40:183-192, 1975.

113. STAPLES, S. J.; ASHER, S. E. & GIANNELLA, R. A. - Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of Escherichia coli pathogenic for man. *J. Biol. Chem.*, 225:4716-4721, 1980.
114. SUZUKI, K. - A simple and accurate micromethod for quantitative determination of ganglioside patterns. *Life Sci.*, 3:1227-1233, 1964.
115. SVENNERHOLM, L. - Quantitative estimation of sialic acids II a colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochem. Biophys. Acta*, 24:604-611, 1957.
116. SVENNERHOLM, L. - Chromatographic separation of human brain gangliosides. *J. Neurochem.*, 10:613, 1963.
117. SVENNERHOLM, A. M. & HOLMGREN, S. - Identification of Escherichia coli heat-labile enterotoxin by means of ganglioside immunosorbent assay (GMI-ELISA) procedure. *Curr. Microbiol.*, 1:19-23, 1978.
118. TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; HONDA, T.; SAKURAI, J.; OHTOMO, N. & MIWATANI, T. - Inhibition of hemolytic activity of the thermostable direct haemolysis of Vibrio parahaemolyticus by ganglioside. *Infect. Immun.*, 12:931-933, 1975.

119. TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; HONDA, T. & MIWATANI, T. - Inactivation of the biological activities of the thermostable direct haemolysin of Vibrio parahaemolyticus by gangliocide GT1. *Infect. Immun.*, 14:1-5, 1976.
120. TAKEDA, Y.; TAKEDA, T.; YANO, T.; YAMANO, K. & MIWATANI, T. - Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 25:978-987, 1979.
121. THOMAS, L. V.; GRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S. M.; & ROWE, B. - New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic Escherichia coli in human. *Infect. Immun.*, 35:1119-1124, 1982.
122. THOMPSON, M. R. & GIANNELLA, R. A. - Revised amino acid sequences for a heat-stable enterotoxin produced by an Escherichia coli strain (18D) that is pathogenic for humans. *Infect. Immun.*, 47:834-836, 1985.
123. TSUJI, T.; TAGA, S.; HONDA, T.; TAKEDA, Y. & MIWATANI, T. - Molecular heterogeneity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.*, 38:444-448, 1982.

124. WARREN, L. - The thioborbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.*, 234:1971, 1959.
125. WENGER, D. A.; WARDELL, S. - Action of neuraminidase (EC 3.2.1.18) from Clostridium perfringens on brain gangliosides, in the presence of bile salts. *J. Neurochem.*, 20:607, 1973.
126. WORTHINGTON Enzyme Manual, Worthington Biochemical Corporation. Treehold, New Jersey, U.S.A., 1st ed. 216 p., 1972.
127. YANO, T.; OLIVEIRA, M. S.; FONTES, C. F.; ALMEIDA, A. C. P. de & CASTRO, A. F. P. de - Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli by the radial immune haemolysis test: a modification for clinical use. *Med. Microbiol. Immunol.*, 171:171-178, 1982.
128. YANO, T.; LEITE, D. S.; CAMARGO, I. J. B. & CASTRO, A. F. P. de - A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs. *Microbiol. Immunol.*, 30:495-508, 1986.
129. YOSHIMURA, S.; IKEMURA, H.; WANATABE, H.; AIMOTO, S.; SHIMONISHI, Y.; SABURO, H.; TAKEDA, T.; MIWATANI, T. & TAKEDA, Y. - Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic Escherichia coli. *FEBS Lett*, 181:138-142, 1985.

130. ZENSER, T. V. & METZGER, J. F. - Comparison of the action of Escherichia coli enterotoxin on the thymocyte adenylate cyclase-cyclic adenosine monophosphate system to that of cholera toxin and prostaglandin El. *Infect. Immun.*, 10:503-509, 1974.
131. ZEN-YOJI, H.; HITOKOTO, H.; MOROZUMI, S. & Le CLAIR, R. A. - Purification and characterization of a haemolysin produced by Vibrio parahaemolyticus. *J. Infect. Dis.*, 123:665-667, 1971.