



**ROBERT ALVIN BERNEDO NAVARRO**

**Obtenção de peptídeos com capacidade inibitória da ação citotóxica  
das toxinas Stx de *Escherichia coli* a partir de bibliotecas de Phage Display**

**CAMPINAS**

**2013**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**ROBERT ALVIN BERNEDO NAVARRO**

**“Obtenção de peptídeos com capacidade inibitória da ação citotoxigênica das toxinas Stx de *Escherichia coli* a partir de bibliotecas de Phage Display”**

Este exemplar corresponde à redação final da TESE defendida pelo candidato

*Robert Alvin Bernedo Navarro*

e aprovada pela Comissão Examinadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.



Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

CAMPINAS,  
2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B457o Bernedo-Navarro, Robert Alvin, 1975-  
Obtenção de peptídeos com capacidade inibitória da ação citotóxica das toxinas Stx de *Escherichia coli* a partir de bibliotecas de phage display / Robert Alvin Bernedo Navarro. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Tomomasa Yano.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. *Escherichia coli* produtora de toxinas shiga. 3. Toxinas shiga. 4. Globotriaosilceramida. 5. Biblioteca de peptídeos. I. Yano, Tomomasa, 1941-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Obtention of inhibitory peptides of cytotoxic activity of Stx toxins produced by *Escherichia coli* from phage display libraries

**Palavras-chave em inglês:**

*Escherichia coli*

Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Shiga toxins

Globotriaosylceramide

Peptide library

**Área de concentração:** Bioquímica

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular

**Banca examinadora:**

Tomomasa Yano [Orientador]

Claudio Chrysostomo Werneck

Wanderley Dias da Silveira

Gerson Nakazato

João Ramos Costa Andrade

**Data de defesa:** 30-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 30 de agosto de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)



---

Assinatura

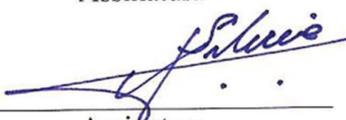
Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck



---

Assinatura

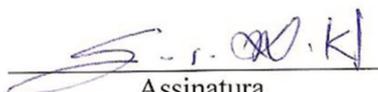
Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira



---

Assinatura

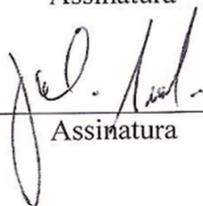
Prof. Dr. Gerson Nakazato



---

Assinatura

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade



---

Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

---

Assinatura

Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

---

Assinatura

Dra. Roxana Maria Fontes Piazza

---

Assinatura



## Resumo

*Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga (STEC) é um grupo de importantes patógenos para humanos. Essas bactérias são relacionadas a várias doenças, como por exemplo, Síndrome Urêmica Hemolítica e produzem potentes toxinas denominadas toxinas de Shiga. Essas toxinas, tanto Stx1 quanto Stx2, compartilham um receptor celular comum, a globotriaosilceramida (Gb3) e exibem a mesma atividade biológica intracelular. O desenvolvimento de novos agentes neutralizantes dos danos induzidos por Stx pode representar uma estratégia promissora para o tratamento das doenças causadas por STEC em humanos. No presente estudo, nós desenvolvemos peptídeos sintéticos que exibem atividade neutralizante contra a citotoxicidade induzida por Stx tanto *in vitro* quanto *in vivo* e, além disso, que se ligam eficientemente ao receptor Gb3. O peptídeo P12-26 compete eficientemente com Stx2 para a ligação ao Gb3 *in vitro*. Além disso, os peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30 inibiram a citotoxicidade de Stx1 e Stx2 em células Vero. Nós observamos que o peptídeo PC7-30 em forma de *loop* e o peptídeo P12-26 que é linear produziram as maiores porcentagens de inibição de Stx1 e Stx2 em células Vero, respectivamente. No entanto, o peptídeo P12-26 não inibiu a letalidade em camundongos, enquanto que o peptídeo PC7-30 inibiu a letalidade causada pela toxina Stx1. Nossos resultados indicam que os peptídeos P12-26 e PC7-30 são candidatos promissores para o desenvolvimento de agentes terapêuticos contra as doenças em seres humanos causadas por STEC.

## Abstract

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains are important pathogens for humans. These bacteria are linked with severe diseases such as hemolytic uremic syndrome and produce potent toxins known as Shiga toxins. These toxins, Stx1 and Stx2, share a common cellular receptor called globotriaosylceramide (Gb3) and exhibit the same intracellular biological activity. The development of new neutralizing agents for Stx-induced damage may represent a promising strategy for the treatment of diseases caused by STEC infections. In this study, we developed synthetic peptides that exhibit neutralizing activity against Stx-induced cytotoxicity both *in vitro* and *in vivo* and that bind efficiently to the Gb3 receptor. The peptide P12-26 competed efficiently with Stx2 for binding to Gb3 *in vitro*. Moreover, the peptides PC7-12, P12-26 and PC7-30 inhibited the cytotoxicity of Stx1 and Stx2 in Vero cells. We observed that the loop-constrained peptide PC7-30 and linear peptide P12-26 produced higher percentages of inhibition of Stx1 and Stx2 in Vero cells, respectively. However, the peptide P12-26 did not inhibit lethality in mice, whereas the loop-constrained peptide PC7-30 inhibited the lethality caused by Stx1. Our results indicate that the peptides P12-26 and PC7-30 are promising candidates for the development of therapeutic agents against diseases caused by STEC in humans.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	vii
<b>ABSTRACT</b>	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	xv
<b>LISTA DE TABELAS:</b>	xvii
<b>ABREVIATURAS</b>	xix
<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
Classificação taxonômica	2
<i>Escherichia coli</i> Patogênica	2
Nomenclatura: Stx, SLT ou VT? STEC, VTEC ou EHEC?	3
STEC	4
STEC na América Latina	6
Fatores de Virulência de STEC	7
Toxinas de Shiga	9
Estrutura das toxinas Stx	10
Globotriaosilceramide (Gb3)	12
Elementos genéticos em STEC	14
Ilha de patogenicidade LEE (Locus of Enterocyte Effacement)	14
Ilhas O de STEC	14
Sequências de profagos	15
Plasmídeos em STEC	15
Estratégias de intervenção para o tratamento das infecções por STEC	16
STEC: Infecção e Colonização	18
Phage Display	22
<b>OBJETIVOS</b>	26
Objetivo geral:	26

Objetivos específicos:	26
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
Bactérias	27
Toxinas Stx e Globotriaosilceramida	27
Ensaio de Phage display	27
Bibliotecas de Phage Display	27
Seleção de peptídeos utilizando Phage Display com Gb3 imobilizado	28
Biopanning das Bibliotecas de Phage Display com Gb3 purificado	28
Titulação dos fagos	30
Extração do DNA fágico	31
Sequenciamento e análise das sequências dos clones fágicos	32
Caracterização dos clones de fagos selecionados	35
ELISA de ligação ao receptor celular Gb3	35
Avaliação dos peptídeos selecionados	35
ELISA de competição para toxinas Stx e peptídeos	35
Determinação da atividade citotóxica das toxinas Stx	36
Preparação das linhagens celulares	36
Ensaio de atividade citotóxica em células Vero	37
Ensaio de neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx	37
Determinação in vivo da capacidade inibitória dos peptídeos obtidos mediante Phage Display	38
Determinação da dose letal 50% (DL <sub>50</sub> ) em camundongos	38
Inibição da letalidade em camundongos	39
<b>RESULTADOS</b>	41
Biopanning Phage Display	41
Sequenciamento dos clones selecionados e análise das sequências	41
Elisa de ligação dos fagos ao receptor celular Gb3	42
ELISA de competição na ligação ao receptor Gb3	43
Neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx em células Vero	45

Determinação da dose letal 50% (DL50)	47
Ensaio de inibição da letalidade em camundongos	47
<b>DISCUSSÃO</b>	51
<b>CONCLUSÕES</b>	57
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58



## **AGRADECIMENTOS**

A minha família por ser sempre maravilhosa.

Ao meu orientador, professor Tomomasa Yano, pelo apoio constante, amizade e ensinamentos.

A professora Silvia Gatti, pelo grande apoio e amizade.

Aos amigos do Instituto de Química Thiago e Rúbia.

Ao professor Lauro Kubota pelo auxílio com o projeto.

Aos professores Hiroshi Aoyama, Cláudio Werneck, Gerson Nakazato, João Ramos Costa Andrade e Wanderley Dias pelas valiosas sugestões para melhorar o presente trabalho.

A Mayara, pela grande ajuda, por compartilhar seu tempo, seu carinho e sua alegria comigo.

A Stella pela amizade, alegria e ajuda constante.

Ao Rogério, pela grande amizade, o apoio contínuo e pelas discussões saudáveis.

Ao professor Domingos e ao pessoal do seu laboratório: Mirtes e Carol.

Aos meus amigos do laboratório: Sandra, Luciano, Anne, Luciana, Cátia, Eduardo, Natália, Melina, Jéssica, Juliana, Claudia, Krizzia e às PICs: Beatriz, Karina e Vanessa.

Aos grandes amigos da SSRF: Thiago, Fernando, Belleza, Ricardo, Luiz, Ancelmo, pela grande ajuda e pela alegria.

Aos amigos do IPK: Rosabel, Taty, Carlos, Osmel e Adalberto.

A Lily, com carinho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao presente trabalho.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Historia natural da progressão da doença produzida por STEC.

Figura 2. (A) Estrutura da holotoxina de Shiga; (B). Representação esquemática da estrutura das toxinas de Shiga.

Figura 3: Estrutura do receptor celular Globotriaosilceramida (Gb3).

Figura 4: Superfície da subunidade StxB mostrando os potenciais sítios de ligação ao receptor Gb3.

Figura 5: Patogênese de STEC.

Figura 6. Processo de Biopanning com Bibliotecas de Phage Display

Figura 7: Bibliotecas de fagos usadas no presente estudo.

Figura 8. Posição do inserto com o peptídeo ligado à proteína pIII do fago.

Figura 9. Detalhes da sequência aminoacídica dos insertos ligados à proteína pIII dos fagos M13 em cada biblioteca de Phage Display utilizada no presente estudo.

Figura 10: Sequências aminoacídicas dos clones fágicos selecionados para o ensaio de ELISA de ligação ao receptor Gb3.

Figura 11: ELISA de ligação dos clones fágicos selecionados ao receptor Gb3.

Figura 12: ELISA de competição pela ligação ao receptor Gb3 entre a toxina Stx1 e os peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30.

Figura 13: ELISA de competição pela ligação ao receptor Gb3 entre a toxina Stx1 e os peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30.

Figura 14. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica causada pelo sobrenadante de *E. coli* O157:H7 (produtor de Stx1 e Stx2) pelos peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30.

Figura 15. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx1 e Stx2 pelo peptídeo PC7-12.

Figura 16. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx1 e Stx2 pelo peptídeo P12-26.

Figura 17. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx usando o peptídeo PC7-30.

Figura 18. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx1 em camundongos injetados com o peptídeo PC7-12.

Figura 19. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx2 em camundongos injetados com o peptídeo PC7-12.

Figura 20. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx1 em camundongos injetados com o peptídeo P12-26.

Figura 21. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx2 em camundongos injetados com o peptídeo P12-26.

Figura 22. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx1 em camundongos injetados com o peptídeo PC7-30.

Figura 23. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx2 em camundongos injetados com o peptídeo PC7-30

## **LISTA DE TABELAS:**

Tabela 1: Fatores de virulência conhecidos ou potenciais de STEC

Tabela 2: Material injetado nos grupos de camundongos para calcular a  $DL_{50}$

Tabela 3: Material injetado nos camundongos para avaliar a inibição da letalidade pelos peptídeos selecionados.

Tabela 4. Peptídeos sintetizados após o ensaio de ELISA de ligação ao receptor Gb3.



## **ABREVIATURAS**

Abs.: Absorbância

AIEC: Adherent-invasive *Escherichia coli* (*E. coli* aderente-invasiva)

Biopanning: Técnica de seleção por afinidade para selecionar peptídeos que se ligam a um alvo específico.

BSA: Albumina de soro bovino

CDEC: Cell-detaching *Escherichia coli* (*E. coli* associada a descolamento celular)

CH: Colite hemorrágica

DAEC: Diffusely adherent *Escherichia coli* (*E. coli* de aderência difusa)

DL<sub>50</sub>: Dose letal 50%

DMEM: Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado de Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DNase: Desoxirribonuclease

EAEC: Enteroaggregative *Escherichia coli* (*E. coli* entero-agregativa)

EHEC: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (*E. coli* entero-hemorrágica)

EIEC: Enteroinvasive *Escherichia coli* (*E. coli* entero-invasiva)

ELISA: Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzimas)

EPEC: Enteropathogenic *Escherichia coli* (*E. coli* entero-patogênica)

ETEC: Enterotoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli* entero-toxigênica)

ExPEC: Extraintestinal *Escherichia coli* (*E. coli* extra-intestinal)

Globotriaosilceramide (Gb3)

HRP: Horseradish peroxidase (Peroxidase de rabanete)

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-tiogalactosideo

LB: Meio Luria-Bertani

LB-Tet: Meio Luria-Bertani com Tetraciclina

LEE: Locus of Enterocyte effacement (Locus de apagamento dos enterócitos)

Lesões A-E: Lesões do tipo *Attaching-Effacing* (“ligação-apagamento”)

LPS: Lipopolissacarídeos

Meio LB/IPTG/Xgal: Meio LB com IPTG

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil- tetrazólio

NMEC: Newborn meningitic *Escherichia coli* (*E. coli* associada a meningite neonatal)

NTEC: Necrotoxicogenic *Escherichia coli* (*E. coli* necrotoxigênica)

OPD: orto-fenilenodiamina

PBS: Tampão fosfato-salina

PBS-T 0,5%: Tampão fosfato-salina com Tween 20 0,5% (v/v)

PEG/NaCl: Solução de polietilenglicol 8000 20% (w/v) e NaCl 21% (w/v)

pfu: plate-forming units (unidades formadoras de placas)

Phage Display: Técnica de biologia molecular na qual se utilizam fagos que expressam (poli)peptídeos ligados às proteínas estruturais dos bacteriófagos utilizados.

RNA: Ácido ribonucléico

Round: Rodada de seleção com o receptor Gb3 imobilizado

r.p.m.: rotações por minuto

SEPEC: Septicemia-associated *Escherichia coli* (*E. coli* associada a sepsse humana)

SFB: Soro fetal bovino

SLT: Shiga-like toxin (Toxina semelhante à toxina de Shiga)

STEC: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (*E. coli* produtora de toxina de Shiga)

Stx: Toxina de Shiga

Stx1: Toxina de Shiga 1

Stx2: Toxina de Shiga 2

StxA: Subunidade catalítica A da toxina Stx

StxB: Subunidade B da toxina Stx

SUH: Síndrome Urêmica Hemolítica

T3SS: Type three secretion system (Sistema de secreção do tipo III)

TBS-T 0,1%: Tampão Tris-salina com 0,1% de Tween 20 (v/v)

TBS-T 0,5%: Tampão Tris-salina com 0,5% de Tween 20 (v/v)

Top Agar: Caldo LB com 0,7% de agarose

tRNA: RNA de transferência

TTBS: Tampão Tris-Salina-Tween 20 0.1%.

UPEC: Uropathogenic *Escherichia coli* (*E. coli* uropatogênica)

Vero: Células de macaco verde africano

VT: Verotoxina

VT1: Verotoxina 1 (Stx1)

VT2: Verotoxina 2 (Stx2)

VTEC: Verotoxigenic *Escherichia coli* (*E. coli* verotoxigênica)

Xgal: 5-Bromo-4-cloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosideo

## INTRODUÇÃO

### *Escherichia coli*

Esta bactéria foi isolada pela primeira vez, no ano 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich a partir de fezes de humanos saudáveis. Recebeu, inicialmente, o nome de *Bacterium coli comunni* e, posteriormente, no ano 1919 foi atualizada a nomenclatura para *Escherichia coli* em honra ao seu descobridor (Lederberg, 2004). A partir da primeira metade do século XX começou o auge das pesquisas sobre *Escherichia coli* (*E. coli*), devido não só a sua importância clínica mas também para o uso de *E. coli* como micro-organismo modelo para investigações metabólicas, genéticas, populacionais, biotecnológicas, entre outros. Atualmente essa bactéria é considerada a espécie de vida livre mais estudada do planeta (Lederberg, 2004).

*E. coli* é uma bactéria Gram-negativa de morfologia bacilar, anaeróbica facultativa que faz parte da microbiota intestinal de mamíferos e pertence à família Enterobacteriaceae. Algumas cepas também podem apresentar cápsula. As cepas móveis se movimentam por meio de flagelos peritricos, mas algumas dessas bactérias podem ser não móveis. *E. coli* é uma bactéria capaz de incorporar material genético exógeno que pode provir de bacteriófagos, plasmídeos ou elementos genéticos móveis, os quais podem codificar produtos importantes para a bactéria, tais como: enzimas que inativam a ação de antibióticos, ativadores metabólicos que podem conferir a capacidade para a utilização de novos nutrientes, assim como a incorporação de fatores de virulência como adesinas ou toxinas (Lewin, 2000).

*E. coli* coloniza o trato gastrointestinal depois de poucas horas do nascimento dos humanos e estabelece com eles, em condições naturais, uma relação de mútuo benefício (Drasar & Hill 1974). *E. coli* é um micro-organismo que ao adquirir uma combinação de elementos genéticos móveis pode se converter em um patógeno altamente adaptado capaz de causar uma ampla gama de doenças, desde gastro-enterites a infecções extra-

intestinais do trato urinário, corrente sanguínea e sistema nervoso central (Croxen & Finlay, 2009).

**Classificação taxonômica** (Garrity et al., 2005),

Reino: Procariotae

Divisão: Bactérias

Filo: Proteobacteria

Classe: Gammaproteobacteria

Ordem: Enterobacteriales

Família: Enterobacteriaceae

Tribo: Escherichiae

Gênero: Escherichia

Espécie: *Escherichia coli*

***Escherichia coli* Patogênica**

Diversas cepas de *E. coli* têm sido associadas com uma vasta gama de doenças que afetam tanto animais quanto humanos no mundo inteiro. As cepas patogênicas de *E. coli* são classificadas em seis patovares ou patótipos, cujos mecanismos de patogenicidade têm sido extensamente estudados. De acordo com os mecanismos de patogenicidade e os locais de infecção em humanos esses patovares podem ser classificados em dois grandes grupos: *E. coli* diarreogênicas e *E. coli* extra-intestinal (ExPEC) (Kaper et al., 2004).

O grupo de *E. coli* diarreogênicas, por sua vez, pode ser dividido em seis patótipos derivados das suas siglas em inglês: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC). O grupo de ExPEC pode ser dividido em três patótipos mais frequentes: *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* associada a meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* associada a sepse (SEPEC) (Croxen &

Finlay, 2010). Outros patótipos têm sido descritos, mas seus mecanismos de patogenicidade não estão bem definidos, esses patótipos são *E. coli* necrotoxigênica (NTEC), *E. coli* que produz descolamento celular (cell-detaching) (CDEC) e *E. coli* aderente invasora (AIEC) (Kaper et al., 2004).

### **Nomenclatura: Stx, SLT ou VT? STEC, VTEC ou EHEC?**

Desde a descoberta de uma citotoxina produzida por *E. coli* com atividade biológica em células Vero em 1977 (Konowalchuk et al., 1977), diversas toxinas de Shiga têm sido caracterizadas. O estudo simultâneo da citotoxina descrita por Konowalchuk et al., (1977) por diferentes grupos de pesquisa ao redor do mundo derivou no uso de duas nomenclaturas diferentes: Vero citotoxinas ou Verotoxinas (VT) e toxinas semelhantes a toxina de Shiga (Shiga-like toxins) (SLT). No ano de 1994, O'Brien et al., (1994) propuseram que as nomenclaturas descritas até esse momento poderiam ser consideradas intercambiáveis. Posteriormente, no ano 1996, Calderwood et al., (1996) sugeriram que a palavra "like" poderia ser omitida da descrição das toxinas e que os nomes dos genes refletiam sua relação com a toxina de Shiga (Stx) produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 que é considerada a toxina protótipo da família de toxinas.

Enquanto a omissão da palavra "like" foi rapidamente aceita pela comunidade científica, argumentos fortes para manter a nomenclatura fenotípica associada às citotoxinas produzidas por *E. coli* foram publicados (Karmali et al., 1996), o que fez com que as duas nomenclaturas ainda sejam utilizadas.

Por outro lado, as cepas de *E. coli* produtoras de toxinas de Shiga são denominadas STEC; esse grupo de bactérias é conhecido alternativamente como *E. coli* verotoxigênica, ou VTEC, devido as toxinas Stx terem atividade citotóxica em células Vero.

No ano 1987 Levine (1987) descreveu que cepas de *E. coli* causadoras de diarreias sanguinolentas como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Atualmente EHEC é considerada um subgrupo de STEC que causa colite hemorrágica (CH) e possui a capacidade de causar lesões de “attaching-effacing” (A-E) no intestino (Melton-Celsa et al., 2012).

## **STEC**

STEC é um grupo de bactérias cujo principal fator de virulência é a produção de potentes citotoxinas Stx, e que produzem pelo menos uma das duas toxinas Stx ou suas variantes (Kaper et al., 2004). As cepas STEC são um grupo de patógenos zoonóticos que causam doenças potencialmente fatais e casos esporádicos ou surtos de infecções transmitidas principalmente por água e alimentos contaminados (Karmali, 1989; Nataro & Kaper, 1998; Karmali, 2004).

As infecções por STEC são importantes na medicina humana porque esses micro-organismos podem causar doenças que vão desde diarreias de curta duração, colite hemorrágica (CH), e algumas vezes doenças sistêmicas tais como a encefalopatia aguda e Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH), que podem ser fatais (Karmali et al., 1983; Riley et al., 1983; Paton e Paton, 1998). A SUH é caracterizada por insuficiência renal aguda, trombocitopenia e anemia hemolítica micro-angiopática, sendo mais frequente em crianças menores de cinco anos e em idosos (Banatvala et al., 2001; Gould et al., 2009). As cepas STEC são capazes de causar infecção em doses infectantes muito baixas (1-100 bactérias), o que favorece sua disseminação por meio de alimentos, água, animais ou de pessoa a pessoa (Kaper et al., 2004). O tempo de manifestação dos sintomas mais graves é breve, de aproximadamente uma semana entre a ingestão da bactéria e a ocorrência da SUH, com exceção de alguns casos que manifestam a enfermidade após as duas primeiras semanas (Tarr et al., 2005). A progressão da doença produzida por STEC mostra-se esquematizada na figura 1.

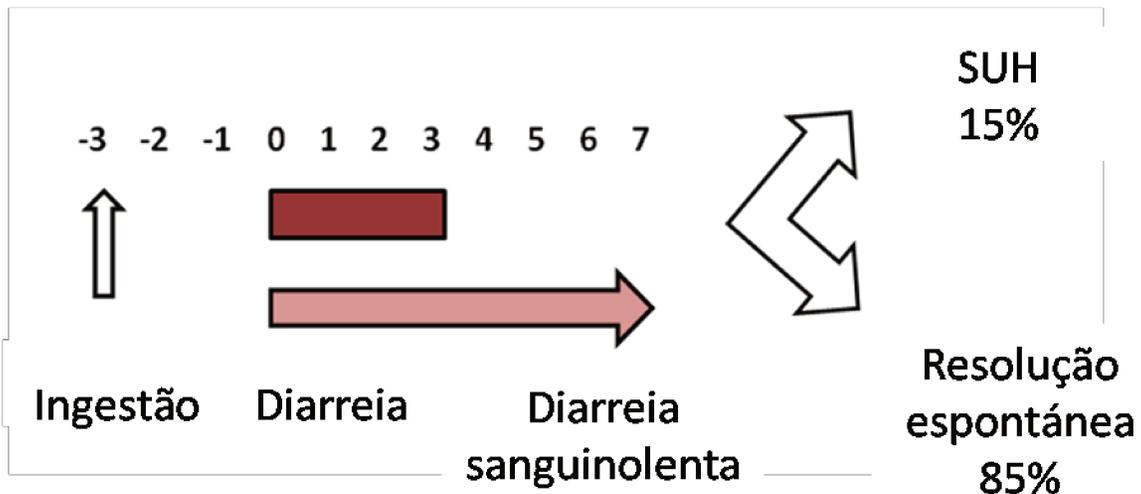


Figura 1: História natural da progressão da doença produzida por STEC

Dentro do grupo patogênico das STEC, o sorotipo mais freqüentemente associado ao desenvolvimento de quadros clínicos mais severos em humanos é STEC O157:H7. Este sorotipo tem sido responsável por grandes surtos no mundo, afetando milhares de pessoas no Japão (Watanabe et al., 1996) e em vários estados da costa Oeste dos Estados Unidos (Barret et al., 1994; Rangel et al., 2005). No entanto, cepas STEC não-O157 têm ocasionado múltiplos surtos, assim como casos esporádicos em países como a Argentina, Chile e África do Sul (Blanco et al., 2004). Além destes casos, na Alemanha, Itália e no Reino Unido estas cepas têm sido responsáveis por até 30% dos casos de SUH (Caprioli et al., 1997). Outros sorotipos tais como O26:H11, O111:H8, O103:H2, O113:H21, O104:H21, dentre outros, também têm sido implicados em surtos de origem alimentar (Doyle et al., 2006). STEC O157:H7 é a cepa mais relacionada com casos de CH; essa bactéria habita o trato gastrointestinal de animais domésticos sem causar efeitos patológicos no hospedeiro. Tem sido descrito que até 15% dos pacientes com CH causada por STEC O157:H7 desenvolvem quadros de SUH (WHO, 2005).

Atualmente, o número de casos clínicos associados a infecções por STEC está estimado em 63.153 pacientes infectados por *E. coli* O157:H7 e 112.752 casos de STEC não-O157 relatados anualmente somente nos Estados Unidos da América (Scallan et al., 2011).

Apesar dos grandes esforços realizados no controle e prevenção das infecções por STEC, os surtos ocasionados por esse patógenos continuam acontecendo em todo o mundo.

O custo por paciente infectado por STEC O157 nos Estados Unidos foi estimado em U.S.\$ 587. Para um indivíduo que não requer atenção médica o valor foi de U.S.\$ 26, incrementando-se para U.S.\$ 1 142 no caso de indivíduos que precisam de atenção médica e que não padeceram de SUH, e de até U.S.\$ 211 084 por paciente que desenvolveu o SUH e que apresentou danos renais em estágio final da doença. O custo aproximado associado a cada paciente que falece de SUH pode atingir os 6,6 milhões de dólares (Frenzen et al., 2005).

### **STEC na América Latina**

Existem diferenças importantes na incidência de infecções por STEC na América Latina. A SUH é endêmica em alguns países da América Latina e a notificação das infecções por STEC é obrigatória somente nos países Argentina, Chile e Paraguai. As maiores incidências de infecções por STEC são registradas em países como Argentina e Chile, onde existem registros de casos esporádicos de SUH em todas as épocas do ano (Prado et al., 2008). Argentina apresenta as maiores incidências de SUH associada a infecções por STEC no mundo e constitui a principal causa de SUH em crianças menores que cinco anos (Cobeñas et al., 2008). O país com maior registro de casos SUH positivos é a Argentina, cuja incidência é de 12,2/100 000 crianças, sendo STEC o principal agente etiológico associado a esta doença (Rivas 2003). A incidência de infecções por STEC na Argentina é aproximadamente cinco vezes maior do que no Chile, no entanto a magnitude desse problema não é conhecida nos outros países (Guth et al. 2010). No Chile mais de 90% dos casos de SUH estão associados a infecções por STEC (Prado et al., 2008).

No Brasil, tem sido isoladas cepas STEC O157:H7 e não O157 a partir de pacientes com diarreia sanguinolenta, anemia hemolítica e SUH, assim como de alimentos e alguns animais. A prevalência de infecções por STEC em crianças com diarreia varia nas diversas regiões analisadas, mas geralmente é relativamente baixa (Guth et al., 2010).

No Brasil, existem poucos relatos sobre a incidência de casos de SUH associada a infecções causadas por STEC. Até o ano 2007 tinham sido relatados somente dois casos de SUH causado por STEC (Scallan et al., 2011). Apesar da escassez de relatos sobre casos de SUH associados a infecções por STEC no Brasil, vários sorotipos de STEC, incluindo os mais frequentes em outros países, têm sido isolados de casos esporádicos de diarreia, particularmente em crianças, em diferentes regiões do Brasil (de Toni et al., 2011).

Nos últimos anos tem-se descrito em algumas regiões geográficas de nosso continente, como no Peru (Huguet et al., 2001), Bolívia (Sánchez et al., 2006) e Cuba (Sánchez et al., 2008), os primeiros relatos de cepas O157:H7 isoladas de humanos, sugerindo uma re-emergência das infecções por STEC na América latina.

### **Fatores de Virulência de STEC**

Os principais fatores de virulência de STEC são mostrados na tabela 1.

Tabela 1: Fatores de virulência conhecidos ou potenciais de STEC (Adaptado de Melton-Celsa et al., 2012)

Tabela 1: Fatores de virulência conhecidos ou potenciais de STEC

<b>Fator de Virulência</b>	<b>Gene</b>	<b>Função proposta</b>	<b>Referência</b>
Stx1	<i>stx1</i>	Toxina	Melton-Celsa et al., 2007
Stx2	<i>stx2</i>	Toxina	
intimina	<i>eae</i>	Adesina	Jerse et al., 1990
Tir	<i>tir</i>	Receptor intimina	Campellone and Leong, 2003; Kenny et al., 1997
EspF	<i>espF</i>	Imuno-modulação	Ritchie et al., 2003
EspG	<i>espG</i>	Interfere na sinalização da célula hospedeira	
EspH	<i>espH</i>		
Map	<i>map</i>		
NleC	<i>nleC</i>	Imuno-modulação	Yen et al., 2010
NleE	<i>nleE</i>		
NleH	<i>nleH</i>	Imuno-modulação e inibição da apoptose	Gao, 2009; Hemrajani et al., 2008; Hemrajani et al., 2010
Iha	<i>iha</i>	Adesina	Tarr et al., 2000; Toma et al., 2004; Yin et al., 2009
Efa1	<i>efa1</i>	Adesina e inibição da resposta immune do hospedeiro	Abu-Median et al., 2006; Deacon et al., 2010; Toma et al., 2004
Saa	<i>saa</i>	Adesina	Paton et al., 2006; Toma et al., 2004
LpfA	<i>lpfA</i>	Adesina fimbrial	Toma et al., 2004; Torres et al., 2005
Sfp	<i>sfp</i>	Adesina	Toma et al., 2004
EspP	<i>espP</i>	Serino protease autotransportadora, formação de biofilme e aderência	Brunder et al., 1999; Fratamico et al., 2011; Puttamreddy, 2010
HCP	<i>hcpA</i>	Pilus tipo IV, adesina, formação de biofilme e indução de citocinas	Ledesma, 2010
ToxB	<i>toxB</i>	Adesina homóloga a Efa1/LifA	Abu-Median et al., 2006; Fratamico et al., 2011
Sab	<i>sab</i>	Autotransportador, promotor de biofilme	Herold et al., 2009
StcE	<i>stcE</i>	Mucinase, formação de lesões, marcador de superfície de neutrófilos	Grys et al., 2005
Subtilase	<i>subA</i>	Serino protease, cliva chaperonas BiP	Paton et al., 2001
Enterohemolisina	<i>hlyA/ehx</i>	Formação de biofilme, aderência	Beutin et al., 1989
Toxina citoletal distensora	<i>cdt</i>	Dano a células endoteliais microvasculares	Bielaszewska et al., 2009; Friedrich et al., 2006; Janka et al., 2003

## Toxinas de Shiga

A família de toxinas de Shiga é um grupo de exotoxinas relacionadas estrutural e funcionalmente. Esta família inclui a toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 e toxinas de Shiga produzidas por cepas STEC (Johannes & Römer, 2010).

A toxina de Shiga 1 produzida por *E. coli* (Stx1) é quase idêntica estruturalmente à toxina de Shiga produzida por *S. dysenteriae* tipo 1, diferindo em um só aminoácido da subunidade catalítica da toxina. As cepas STEC podem produzir variantes de Stx1 (Stx1 e Stx2c), variantes de Stx2 (Stx2, Stx2c, Stx2d, Stx2e e Stx2f) ou variantes das duas toxinas em diferentes combinações (Johannes & Römer, 2010).

Embora Stx1 e Stx2 compartilhem um receptor comum: globotriaosilceramide (Gb3), e possuam o mesmo mecanismo de ação intracelular, elas são imunologicamente diferentes e têm só 56% de homologia na sequência aminoacídica (Jackson et al., 1987). As variantes de Stx2 compartilham aproximadamente 84-99% de homologia nas sequências aminoacídicas (Bergan et al., 2012).

As toxinas Stx de *S. dysenteriae* e das cepas STEC são codificadas por genes localizados em bacteriófagos temperados do tipo lambda (Unkmeir & Schmidt, 2000). Esses fagos são elementos genéticos altamente móveis que desempenham um papel importante na transferência genética e, conseqüentemente, na diversificação genômica (Herold et al., 2004).

Os genes *stx* que codificam para as toxinas de Shiga são altamente expressos quando é ativado o ciclo lítico do bacteriófago. A regulação na produção de Stx é exercida através da ativação de promotores de genes fágicos, do controle da amplificação do número de cópias gênicas e da liberação de toxinas (Neely et al., 1998).

O periplasma das bactérias gram-negativas oferece um ambiente adequado que favorece o dobramento e montagem das subunidades da toxina. Uma vez montada no periplasma, ocorre a secreção da toxina Stx através da lise bacteriana sendo este evento mediado por fagos (Wagner et al., 2002).

Os genes que codificam para Stx1 podem ser regulados pela disponibilidade de ferro e a síntese da toxina é fortemente reprimida na presença de altas concentrações desse metal (Calderwood et al., 1987).

### **Estrutura das toxinas Stx**

Através das técnicas de cristalografia de raios X foi revelado que os membros da família de toxinas de Shiga possuem configuração estrutural do tipo AB<sub>5</sub> (Fraser et al., 1994).

A subunidade monomérica A (StxA) possui atividade enzimática, tem uma massa molecular de 32kDa e está associada não covalentemente com um pentâmero de fragmentos B idênticos com massa molecular de 7,7 kDa que formam a subunidade B (StxB). A subunidade B é a responsável pela ligação da holotoxina ao receptor celular. StxB forma uma estrutura pentamérica em anel com um poro central dentro do qual o extremo carboxílico de StxA se insere (Fraser et al., 1994). StxA e os fragmentos StxB são secretados no periplasma bacteriano onde são montados para formar a holotoxina (Donohue-Rolfe & Keusch, 1983).

A subunidade StxA possui atividade RNA N-Glicosidase altamente específica e atua clivando uma adenina na posição 4324 localizada no domínio VI da subunidade ribossomal 28S dos ribossomos eucarióticos (Endo et al., 1988), inibindo dessa forma a ligação do fator de alongação aminoacil tRNA-dependente e subsequente alongação da cadeia (Hale & Formal, 1980).

Embora as toxinas Stx sejam potentes enzimas modificadoras de ribossomos, devemos destacar que sua ação não se limita à inibição da síntese proteica em células eucarióticas. Outros efeitos biológicos das toxinas Stx incluem a indução da expressão de citocinas pelos macrófagos, o qual pode aumentar a suscetibilidade de algumas células às toxinas (Johannes & Römer, 2010).

A subunidade StxB se liga ao glicoesfingolípido Gb3, presente na superfície das células alvo, com a subsequente internalização da toxina (Jacewicz et al., 1986). Na ausência da subunidade StxA, o pentâmero StxB adota uma estrutura que é funcionalmente equivalente à holotoxina completa na ligação ao receptor Gb3 (Donohue-Rolfe et al., 1989).

A estrutura cristalizada da subunidade Stx1 B complexada com um análogo da porção trissacarídica do receptor Gb3 revelou a existência de três sítios de ligação aos trissacarídeos por cada monômero B da holotoxina (Ling et al, 1998). Todos os quinze sítios de ligação ao Gb3 estão orientados na mesma direção e não interagem entre si.

Os múltiplos sítios de ligação ao Gb3 na subunidade homopentamérica StxB poderia explicar a alta afinidade das toxinas pelas células alvo (com constantes de ligação na ordem de  $10^9\text{M}^{-1}$ ) quando comparado com a baixa afinidade dos sítios de ligação individuais ( $10^3\text{M}^{-1}$ ) (St. Hilaire et al., 1994).

Foi descrito que Stx1 possui uma afinidade dez vezes maior pelo receptor Gb3 em células do que Stx2 (Head et al., 1991 ), mas Stx2 pode ter uma  $DL_{50}$  até 400 vezes menor em camundongos (Tesh et al., 1993).

Na figura 2 é mostrada a estrutura das toxinas de Shiga.

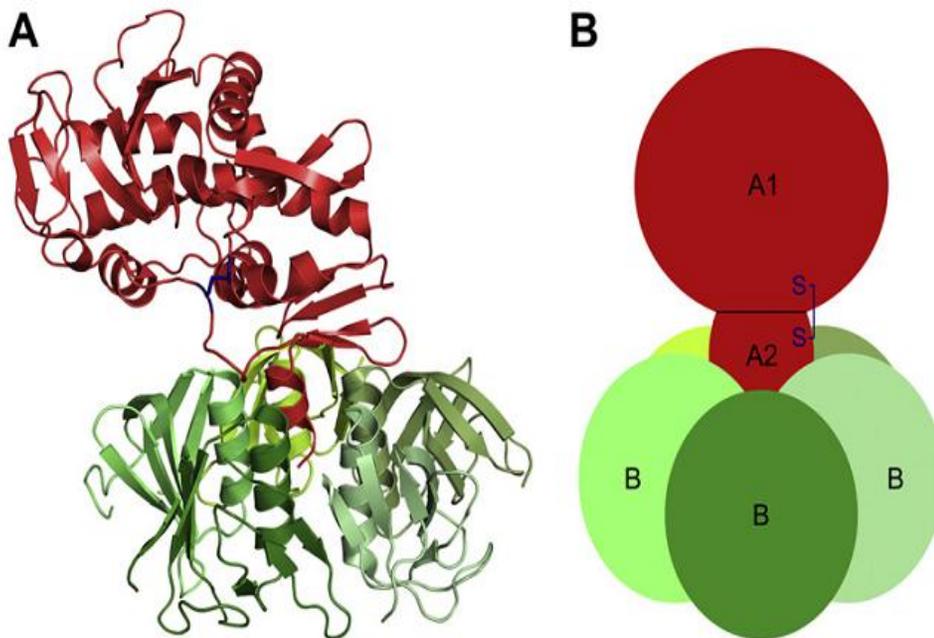


Figura 2. (A) Estrutura da holotoxina de Shiga determinada por cristalografia de raios X (Fraser et al., 1994). A subunidade StxA está identificada em vermelho, o homopentâmero StxB é mostrado na cor verde e as pontes dissulfeto que ligam os fragmentos A1 e A2 da subunidade StxA aparecem em azul. (B). Representação esquemática da estrutura das toxinas de Shiga.

### Globotriaosilceramida (Gb3)

Globotriaosilceramida (Gb3), também conhecido como CD77 ou antígeno de grupo sanguíneo P<sup>k</sup>, é um esfingolípido neutro que contém um trissacarídeo Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc ligado a um esqueleto de ceramida (Figura 3). Gb3 é expresso principalmente no rim, córtex e medula, além de coração, baço, placenta e algumas células do sistema hematopoiético (Boyd & Lingwood, 1989; Mangeney et al, 1991; Kojima et al, 2000) .

Gb3 é também um antígeno de grupo sanguíneo (P<sup>k</sup>) embora seja mais conhecido pela sua função de receptor das toxinas de Shiga produzidas por *Escherichia coli* (Lingwood, 1999). Gb3 tem um papel importante no desenvolvimento de diversas manifestações patológicas

tais como a síndrome urêmica hemolítica e a colite hemorrágica (Karmali, 1989; Lingwood et al, 1987; Lingwood, 1999).

A figura 4 mostra os potenciais sítios de ligação do pentâmero StxB com o receptor Gb3.

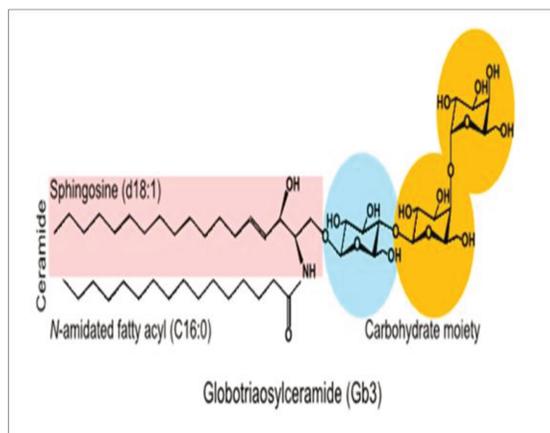


Figura 3: Estrutura do receptor celular Globotriaosilceramida (Gb3) (Bergan et al., 2012)

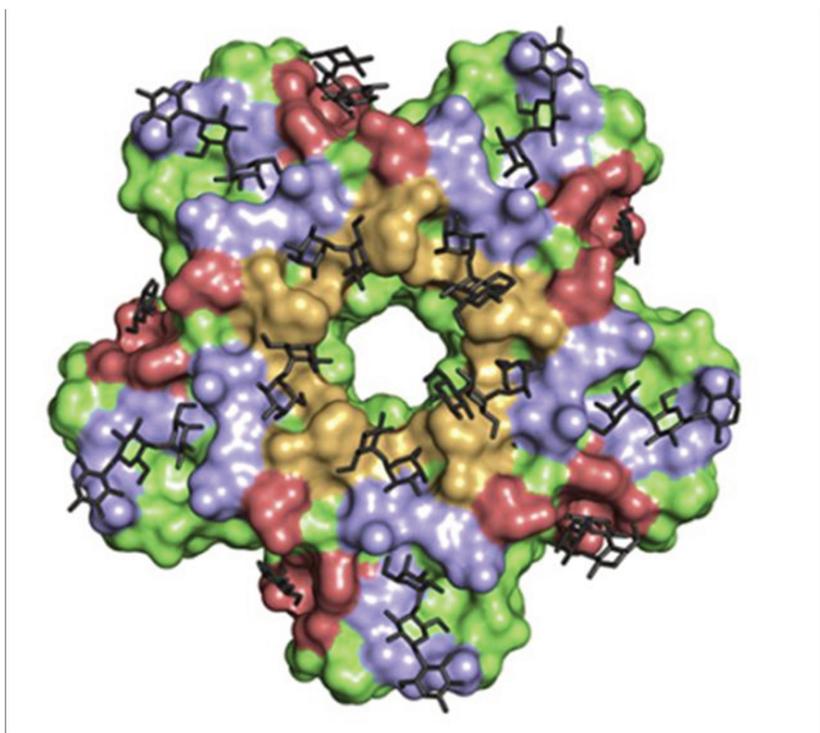


Figura 4: Superfície da subunidade StxB mostrando os potenciais sítios de ligação ao receptor Gb3, baseado na estrutura da toxina Stx1 complexada com um análogo do receptor Gb3 (Ling et al., 1998)

## **Elementos genéticos em STEC**

### **Ilha de patogenicidade LEE (Locus of Enterocyte Effacement)**

O elemento genético mais fortemente associado à patogênese de STEC, principalmente de EHEC, é a ilha de patogenicidade LEE. Esse elemento genético de aproximadamente 42kb de tamanho é encontrado também em cepas EPEC e possui genes que codificam para a adesina intimina, o receptor da intimina Tir, um sistema de secreção de tipo III (T3SS) e quatro efetores (além de Tir) que são secretados através do T3SS diretamente na superfície das células infectadas (Tree et al., 2009).

### **Ilhas O de STEC**

Diversos fragmentos de sequências únicas de DNA, além de LEE, foram identificadas nos genomas de EDL933 e na cepa Sakai quando comparadas com *E. coli* K-12 (Hayashi et al., 2001; Perna et al., 2001), mas a contribuição à patogenicidade desses elementos chamados “ilhas O” é pouco conhecida. No entanto, algumas ilhas O codificam adesinas ou proteínas similares aos fatores de virulência expressos por outros patógenos (Perna et al., 2001).

Poucos grupos de pesquisa têm investigado outras ilhas de patogenicidade diferentes de LEE em cepas STEC. As ilhas O geralmente estão ausentes nas cepas não patogênicas da mesma espécie ou espécies próximas e elas podem servir como potenciais marcadores de virulência para distinguir cepas altamente virulentas de cepas menos virulentas ou não virulentas (Karmali et al., 2003; Gal-Mor & Finlay, 2006). As ilhas de patogenicidade também podem ser usadas para a identificação de bactérias patogênicas emergentes (Ju et al., 2013).

Karmali et al. (2004) propuseram a classificação das cepas de STEC em soropatotipos, de acordo com as frequências de doenças severas (CH e SUH) associadas aos diferentes sorotipos de STEC e à ocorrência de surtos e casos esporádicos causados por essas cepas. Os soropatotipos A e B são os mais envolvidos na ocorrência de surtos associados a doenças severas por carregam a ilha O-122, além disso, codificam para um homólogo de *pagC* (envolvido na sobrevivência de *Salmonella* em macrófagos (Miller et al., 1989), assim como *efa1* (fator de aderência Efa-1 de EHEC) (Karmali et al., 2003). Também foi descrita na ilha OI-57 a presença de sequências que codificam para o fator de aderência *adfO*, o qual é necessário para a aderência eficiente de EDL933 em células HeLa (Ho et al., 2008).

### **Sequências de profagos**

Os genomas descritos de STEC contêm um surpreendente número de sequências de profagos, a maioria dos quais são do tipo lambda. Nas cepas STEC o tamanho e os sítios de integração desses profagos são variáveis, sugerindo, dessa forma, que eles possuem diferentes origens (Asadulghani, 2009; Hayashi et al., 2001). Além de codificar para toxinas Stx, os profagos podem estar envolvidos na virulência, sobrevivência bacteriana ou regulação gênica. Diversos efetores são codificados dentro dos profagos como tRNAs que podem ser utilizados para regular a expressão desses genes que não pertencem originalmente à *E. coli* (Hayashi et al., 2001).

### **Plasmídeos em STEC**

As cepas de STEC podem carrear plasmídeos de diversos tamanhos. A maioria das cepas STEC possui grandes plasmídeos, tais como o plasmídeo pO157 de *E. coli* O157:H7 com tamanho aproximado de 92 kb e contêm diversos elementos móveis (Lim et al., 2010). O plasmídeo pO157 codifica para um sistema de secreção de tipo II, uma metaloprotease, uma adesina e o operon *ecf* que codifica para diversas enzimas.

Embora alguns estudos *in vitro* e *in vivo* sugiram que o plasmídeo pO157 possa ter um papel na patogênese de STEC e na aderência em células epiteliais (Dziva et al., 2007; Sheng et al., 2006; Tatsuno et al., 2001; Toth et al., 1990) outros estudos não conseguiram demonstrar esse papel (Ashkenazi et al., 1992; Fratamico et al., 1993).

Assim, a possível função de pO157 permanece confusa. Por outro lado, alguns estudos também sugeriram que as cepas que expressam altos níveis de produtos codificados pelo plasmídeo estão majoritariamente associadas com epidemias e o desenvolvimento de SUH em relação àquelas que não o carregam (Abu-Ali et al., 2010; Karmali et al., 2003). Outros plasmídeos menores podem carregar genes associados a replicação e mobilidade (Makino et al., 1998), assim como potenciais genes de virulência como *toxB*, *katP*, *espP*, *hly*, genes para pili de tipo IV, sequências que conferem resistência à tetraciclina e sequências associadas a processos de conjugação e replicação (Fratamico et al., 2011).

### **Estratégias de intervenção para o tratamento das infecções por STEC**

As observações clínicas indicam que as terapias antimicrobianas para tratar as infecções por STEC possuem limitações e podem ser contraproducentes em muitos casos, pois a morte das bactérias pode acelerar ou aumentar a liberação das toxinas (Cimolai et al., 1990). As características patogênicas de STEC fazem que exista a necessidade de desenvolver novos agentes terapêuticos. Dentro das alternativas até agora ensaiadas encontra-se o uso de agentes que visam bloquear a ligação das toxinas de Shiga à superfície celular ou de evitar seu transporte intracelular.

Baseados na estrutura cristalográfica de StxB complexado com análogos de Gb3 e com o propósito de mimetizar a ligação simultânea da subunidade StxB as várias moléculas de globotriaosilceramida (Gb3), Kitov et al. (2000) desenvolveram ligantes oligovalentes de globotriose, chamados STARFISH, que expressaram atividade inibitória da citotoxicidade

causada por Stx *in vitro*, no entanto a atividade inibitória dessas moléculas não foi significativa *in vivo*.

Outro estudo mostrou que a porção trissacarídica de Gb3 pode ser acoplada covalentemente a uma matriz derivada de silício, denominada Chromosorb-P, a molécula resultante nomeada Synsorb-Pk152. Os pesquisadores que desenvolveram o estudo descobriram que a co-incubação de células de adenocarcinoma renal humana com Synsorb-Pk e com as toxinas Stx durante uma hora resultou em 50% de proteção das células. No entanto, os ensaios clínicos não mostraram os efeitos protetores esperados em crianças menores de cinco anos com SUH associada à diarreia por STEC (Trachtman et al., 2003). Outros candidatos terapêuticos que mostraram resultados promissores são as moléculas SUPER TWIG que são dendrímeros carreando vários trissacarídeos de Gb3 (Nishikawa et al., 2002) e os polímeros lineares de acrilamida associados a trissacarídeos de Gb3 (polímeros Gb3) (Watanabe et al., 2004). Tanto o SUPER TWIG quanto os polímeros Gb3 mostraram atividade biológica na circulação sanguínea e no intestino e protegeram camundongos contra os efeitos letais de *E. coli* O157:H7.

Outra abordagem utilizada para combater os efeitos patológicos das toxinas Shiga foi o uso de bactérias *E. coli* probióticas recombinantes que expressam um análogo do receptor Gb3 na superfície celular. Essas bactérias probióticas mostraram alta afinidade por StxB, superior à obtida com Synsorb-Pk. A administração oral com as bactérias recombinantes protegeu camundongos contra doses letais das toxinas Stx (Paton et al., 2000).

Não obstante, o uso de anticorpos monoclonais contra Stx1 e Stx2 parece ter sido a alternativa mais atraente para os pesquisadores sendo observado que a administração de anticorpos anti-Stx pode prolongar o tempo de sobrevivência em camundongos expostos a doses letais de toxinas Stx. Efeitos similares foram observados em leitões (Mukherjee et al., 2002).

O uso de pequenas moléculas inibidoras da subunidade catalítica tanto de Stx quanto de ricina também tem sido ensaiado (Miller et al., 2002). Além disso, a identificação de micromoléculas que inibem o transporte retrógrado da toxina tem sido relatada. Alguns exemplos são as moléculas denominadas Exo1 (Feng et al., 2003), Exo2 (Spooner et al., 2008), compostos 75 e 134 (Saenz et al., 2007) e Golgicide A (Saenz et al., 2009). Todos esses inibidores do transporte da toxina modificaram a morfologia do aparato de Golgi, no entanto, o efeito protetor para o organismo hospedeiro não foi claramente estabelecido.

### **STEC: Infecção e Colonização**

O processo de infecção por STEC inicia-se quando o indivíduo ingere água ou alimentos contaminados ou matéria fecal contendo STEC, embora a disseminação pessoa-pessoa tenha sido descrita. Adicionalmente, a transmissão direta de animais a humanos pode acontecer em zoológicos (Centers for Disease Control, Prevention, 1995).

O número de bactérias capazes de estabelecer uma infecção é estimado em menos que 100 micro-organismos (Tilden et al., 1996). No entanto, a análise de diversos surtos sugere que a dose necessária para causar doença poderia depender da cepa particular de STEC, da matriz consumida e da suscetibilidade do hospedeiro (Teunis et al., 2008). Uma vez que as bactérias se localizam no intestino começam a produzir Stx poucas horas após infecção (Mohawk, 2011) e, provavelmente, diversas adesinas.

A função da maioria das adesinas individuais na colonização durante a infecção não tem sido elucidada completamente, com exceção da intimina. Algumas adesinas e o flagelo de algumas STEC (H7, H10 e H21) podem induzir, dentro do intestino, a produção local de citocinas, tais como IL8, TNF-alfa ou CCL20, causando, dessa forma, inflamação localizada (Gobert et al., 2008; Ledesma, 2010). Foi descrito que as cepas STEC causadoras de lesões do tipo A-E induzem a produção de IL22, uma citocina que pode aumentar o dano intestinal (Zheng et al., 2008). No caso da intimina, diversos estudos em modelos animais

indicam que essa adesina é necessária para a colonização de cepas O157:H7 (Cornick et al., 2002; Judge et al., 2004; McKee et al., 1995; Sheng et al., 2006). STEC O157 também pode expressar diferentes adesinas, além da intimina, que podem estar envolvidas na colonização de animais, na aderência nas superfícies de alimentos ou na persistência no meio ambiente.

A intimina interage, primeiramente, com moléculas de nucleolina localizadas na superfície celular (Sinclair & O'Brien, 2002). A nucleolina exposta na superfície celular liga-se à intimina e permite que a bactéria fique em maior contato com a célula hospedeira. Uma vez que a bactéria está localizada na superfície da célula hospedeira o sistema de secreção tipo 3 (T3SS) se insere nessa célula e “injeta” os efetores, tanto os codificados em LEE quanto os codificados fora de LEE, dentro do hospedeiro. Seguidamente, o receptor de intimina (Tir) codificado pela bactéria é injetado dentro da célula hospedeira e o receptor se re-localiza na superfície celular.

A maioria dos efetores codificados dentro de LEE é conhecida como proteínas secretadas por *E. coli* (*E. coli* secreted proteins) ou Esps. O T3SS também permite o transporte de efetores codificados fora do locus LEE. A maioria dos genes que codificam essas moléculas são os genes nle (non-LEE encoded). Pelo menos 20 famílias desses efetores foram achadas nos profagos da cepa Sakai, nas ilhas O, dentro de LEE, ou nos plasmídeos (Tobe et al., 2006). A função desses efetores dentro das células hospedeiras ainda é desconhecida.

Além da capacidade para aderir nas células do intestino, STEC tem mecanismos para suportar o estresse ácido (Foster 2004; King et al., 2010) e as limitações de ferro (Kresse et al., 2007). Mutações nos genes associados à resistência ao estresse ácido induzem mudanças na expressão dos genes envolvidos na resposta ao estresse e na virulência (Dong, 2009). Além disso, *E. coli* O157:H7 possui um sistema de *quorum sensing* que lhe permite detectar mudanças ambientais (Walters & Sperandio, 2006), as quais podem

influir na expressão de alguns genes contidos no locus LEE (Habdas et al., 2010; Kendall et al., 2010; Walters & Sperandio, 2006).

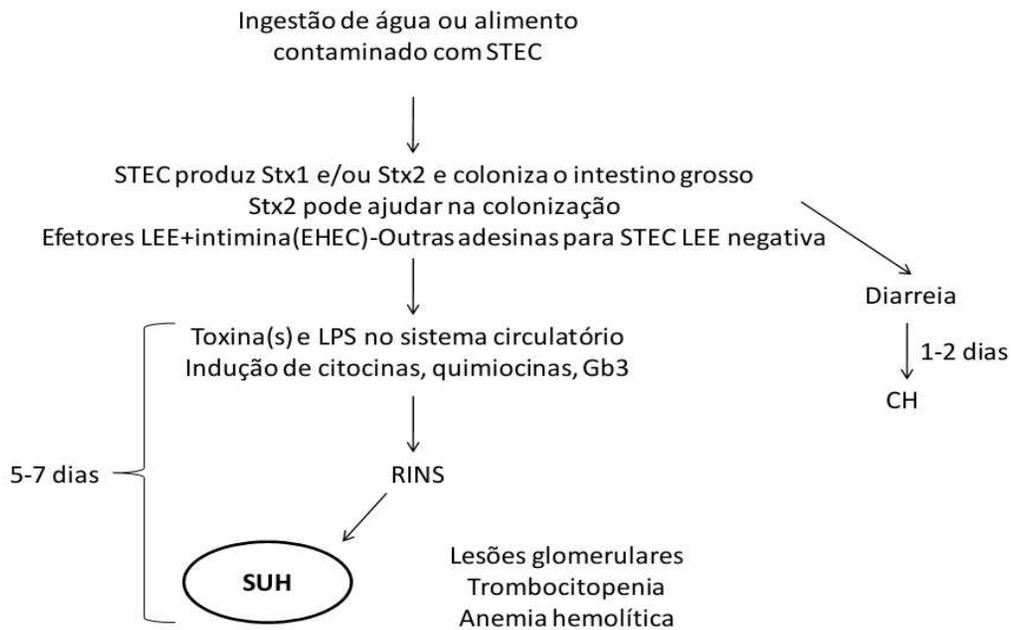


Figura 5: Patogênese de STEC. As cepas STEC são ingeridas através de alimentos ou água contaminados. As bactérias entram no intestino e produzem Stx1 e/ou Stx2 e fatores de colonização, tais como intimina no caso das cepas LEE<sup>+</sup> e outras adesinas nas cepas LEE<sup>-</sup>. As toxinas e o LPS bacteriano entram na corrente sanguínea e induzem um aumento na produção de citocinas e quimiocinas. A toxina causa dano às células endoteliais e os mediadores do sistema imune conduzem a um estado pró-trombótico que pode resultar na SUH. Adaptado de Melton-Celsa et al. (2005). SUH: Síndrome Urêmica Hemolítica; CH: colite hemorrágica

## Phage Display

Uma nova visão no estudo das doenças infecciosas aponta para o desenvolvimento da tecnologia de bibliotecas de peptídeos sobre fagos filamentosos, conhecida como Phage Display.

O termo Phage display descreve a expressão-apresentação de (poli) peptídeos exógenos na superfície de partículas fágicas. As proteínas do capsídeo fágico servem como âncora para a expressão dos peptídeos, dessa forma permite a obtenção de peptídeos ligados ao fago. Uma característica importante dessa técnica é que permite manter a capacidade replicativa dos fagos e a estrutura do peptídeo apresentado (Bratkovic, 2010).

A técnica de Phage Display é uma ferramenta de seleção *in vitro* que possibilita a extração de (poli) peptídeos com propriedades específicas a partir de uma coleção muito grande de peptídeos ou proteínas diferentes. Esta técnica possui muitas vantagens, dentre as quais podemos salientar a que permite manter uma ligação física entre a proteína exposta e a seqüência gênica codificadora (ligação fenótipo-genótipo), e também possui uma grande diversidade de variantes peptídicas e protéicas expostas numa única biblioteca, oferecendo flexibilidade na seleção, a qual pode ser realizada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Mullena et al., 2008)

Desde sua descrição inicial por Smith (1985) esta técnica tem atraído a atenção de muitos pesquisadores devido a sua versatilidade e potência. Dentre os fagos mais utilizados para a expressão de peptídeos ou proteínas por Phage Display encontram-se os fagos filamentosos de *Escherichia coli* de classe Ff, incluindo as cepas M13, fd e f1 (Mullena et al., 2008). Uma das características mais importantes desta técnica é o uso de fagos filamentosos Ff, os quais são estruturalmente estáveis sob uma ampla variedade de condições drásticas usadas nos diferentes ensaios de seleção, tais como pH extremos, altas temperaturas (Brigati & Petrenko, 2005), presença de DNases (Larocca et al., 2002) ou em soluções não aquosas (Olofsson et al., 2001). Mediante a utilização dessa técnica

podem selecionar-se moléculas com propriedades biológicas específicas através da interação dos (poli) peptídeos ligados na superfície dos fagos com os ligantes específicos imobilizados (Figura 6).

Devido à versatilidade da técnica de Phage Display, ela pode ser implantada nas diferentes áreas de investigação. Resultados importantes têm sido obtidos utilizando essa técnica no estudo das doenças infecciosas, no mapeamento de epítomos, na identificação de candidatos vacinais e adesinas bacterianas, entre outros (Ladner et al., 2004).

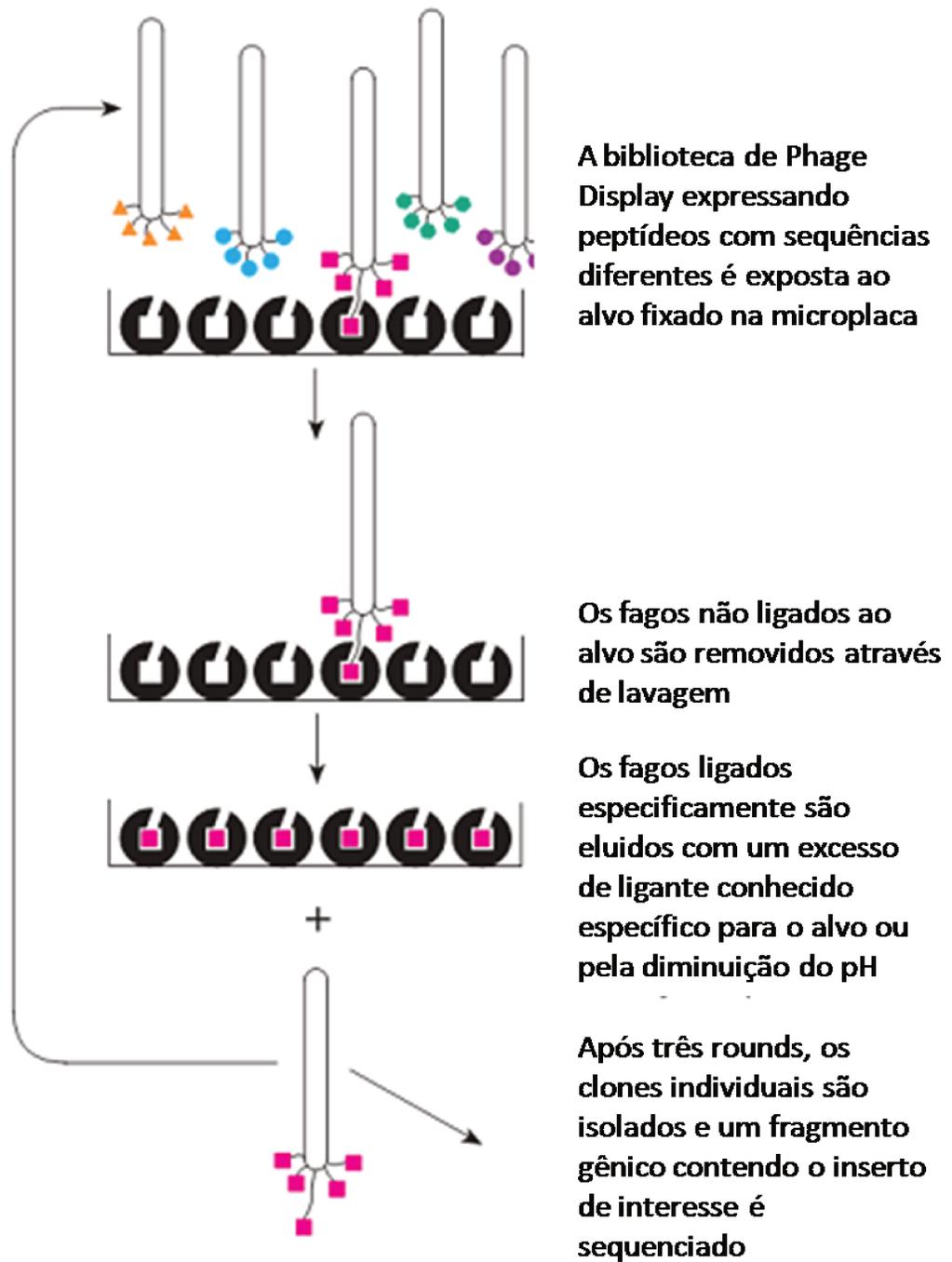


Figura 6. Processo de Biopanning com Bibliotecas de Phage Display

Considerando as informações anteriormente descritas e devido à importância clínico-epidemiológica das infecções por STEC, este projeto teve por objetivo o desenvolvimento de peptídeos sintéticos capazes de ligar no receptor celular Gb3. Os peptídeos desenvolvidos foram testados *in vitro* e *in vivo* para avaliar a sua capacidade de neutralização da atividade citotóxica das toxinas de Shiga produzidas por *Escherichia coli*. Para o desenvolvimento dos peptídeos com potencial neutralizante descritos no presente estudo foi utilizada a técnica de Phage Display.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral:**

Desenvolver peptídeos sintéticos capazes de inibir a atividade citotóxica causada pelas toxinas Stx de *Escherichia coli*.

### **Objetivos específicos:**

1. Selecionar clones fágicos que expressam peptídeos que se ligam ao receptor Gb3 mediante a técnica de phage display.
2. Sequenciar os fragmentos gênicos que contem o inserto de interesse dos clones selecionados nos diferentes rounds de seleção e analisar a presença de sequências consenso dentre as sequências obtidas.
3. Avaliar a ligação ao receptor celular Gb3 dos clones selecionados na etapa anterior.
4. Avaliar a capacidade inibitória da citotoxicidade dos peptídeos sintetizados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Bactérias**

Foram utilizadas as seguintes cepas de referência de *Escherichia coli* pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Fatores de Virulência em Bactérias, Departamento de Genética Evolução e Bioagentes, IB, UNICAMP:

- *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 (produtora de Stx1 e Stx2)
- *Escherichia coli* ER2738 (Phage Display Peptide Library Kit, New England Biolabs, MA, USA).
- *Escherichia coli* C600 K12 como controle negativo para os testes de citotoxicidade.

### **Toxinas Stx e Globotriaosilceramida (Gb3)**

As toxinas Stx1 e Stx2 foram purificadas no Phoenix Lab - Tufts Medical Center (Boston, MA, USA). O receptor Gb3 purificado foi adquirido da empresa Matreya LLC (USA).

### **Ensaio de Phage display**

#### **Bibliotecas de Phage Display**

Para os diferentes ensaios de seleção de peptídeos mediante a técnica de Phage Display foram utilizadas bibliotecas comerciais de fagos filamentosos M13 que apresentam dodecapeptídeos lineares (Ph.D-12) e heptapeptídeos que formam um loop flanqueado por dois resíduos de cisteína (Ph.D-C7C) ligados a proteína fágica pIII. As bibliotecas de Phage Display foram produzidas por New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) (Figura 7).

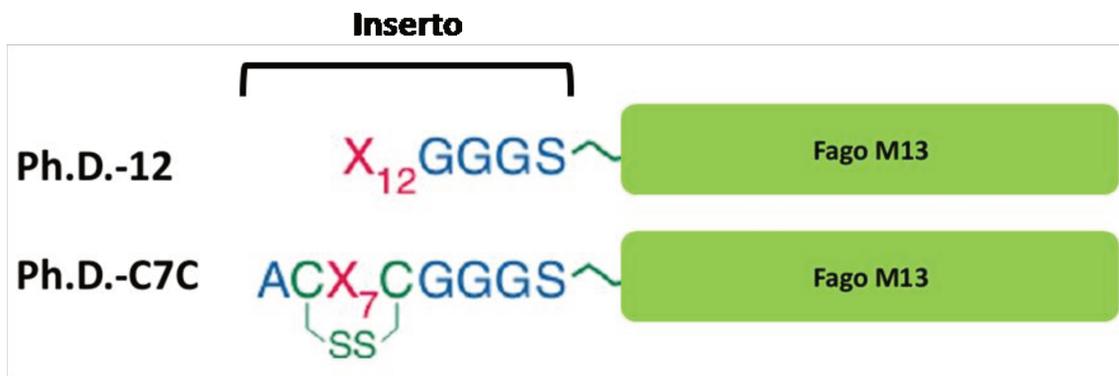


Figura 7: Bibliotecas de fagos usadas no presente estudo. Na figura, a sequência dos peptídeos aleatório está representado pela letra X e o sub-índice indica o número de aminoácidos. As letras GGGGS representadas em azul indicam as sequências aminoacídicas que ligam o peptídeo aleatório com a proteína pIII do fago M13 (sequências “linker”). Também pode observa-se a ponte disulfeto que mantém a estrutura em forma de loop nos peptídeos da biblioteca Ph.D.-C7C.

### **Seleção de peptídeos utilizando Phage Display com Gb3 imobilizado**

Para a seleção de peptídeos com capacidade de se ligar ao receptor celular foi utilizada a técnica de “Direct Target Coating” com o receptor Gb3 imobilizado. Foram feitos três rounds de biopanning utilizando microplacas Polysorp de 96 poços (Nunc, Millipore USA) sensibilizadas com 100µL com Gb3 purificado (Nacalai-Tesque, Tóquio, Japão) em 0,1 M de NaHCO<sub>3</sub> (pH 8,6). O procedimento completo é descrito no item “Biopanning das Bibliotecas de Phage Display com Gb3 purificado”.

### **Biopanning das Bibliotecas de Phage Display com Gb3 purificado**

#### **Primeiro round de seleção**

Primeiro dia

A bactéria *Escherichia coli* ER 2738 foi semeada em meio LB acrescido de tetraciclina e incubada a 37°C durante a noite.

### Segundo dia

A bactéria cultivada no dia anterior foi plaqueada em meio sólido LB-Tet para a obtenção de colônias isoladas.

Os poços da microplaca Polysorp (NUNC, Millipore) foram sensibilizados com o receptor Globotriaosilceramida (50µg), diluído em tampão de sensibilização NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,6 . Foi sensibilizado um poço para cada biblioteca de fagos usada e as placas foram incubadas em câmara úmida a 4 °C, durante a noite.

### Terceiro Dia

Foi descartado o conteúdo dos poços sensibilizados e acrescentados 300µL de Tampão de bloqueio (0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6; 5 µg/mL de albumina de soro fetal bovino) e a placa incubada por uma hora a 4 °C. Posteriormente, os poços foram lavados três vezes com TBS-T 0,1% (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) de Tween 20). Após esta etapa, acrescentaram-se 100 µL da solução da biblioteca de fagos (2x10<sup>11</sup> pfu no caso da biblioteca Ph.D C7C e 1x10<sup>11</sup> pfu para a biblioteca Ph.D 12), diluída 1:10 em TBST 0,1% e incubada durante uma hora a temperatura ambiente.

Uma vez concluída a incubação foi descartada a solução contendo os fagos e realizaram-se 10 lavagens com TBST 0,1%. Depois disso, foi acrescentado 100 µL de tampão Glicina (0,2M glicina pH 2,2) e a placa agitada levemente durante 10 minutos.

Finalmente, foi coletado o conteúdo do poço e neutralizado com 15µL de tampão Tris-HCl (1M Tris pH 9,1). Este material (eluato do primeiro round) foi guardado a 4°C para uma posterior titulação dos fagos e utilização no próximo round de seleção.

### Quarto dia

Realizou-se a amplificação dos fagos, eluidos no dia anterior, em cultivo bacteriano de *E. coli* ER 2738 e procedeu-se a titulação dos mesmos. Foi semeada uma colônia da bactéria *E. coli* ER 2738 em 20mL de meio LB e cultivada até atingir uma absorbância de 0,3 a 600nm de comprimento de onda. Uma vez atingida a absorbância de 0,3 foram

acrescentados 90µL do eluato obtido no dia anterior. A cultura foi incubada a 37°C sob agitação de 250 r.p.m. durante 5 horas. Transcorrido o tempo de incubação a cultura foi centrifugada a 12000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo contendo 3,3 mL de PEG/NaCl (Polietilenoglicol 8000 20% (w/v); NaCl 21%(w/v)) e incubado a 4°C durante a noite.

#### Quinto dia

A amostra acrescida de PEG/NaCl incubada na noite anterior foi centrifugada a 12000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante removido. Após isto, foi suspenso o precipitado em 1mL de TBST 0,1% (50mM Tris-HCl pH 7,5; 150mM NaCl, acrescido de 0,1% de Tween 20) e centrifugado a 14000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido para um microtubo novo, acrescentou-se a sexta parte do volume de PEG/NaCl sendo colocado em banho de gelo durante uma hora.

Terminada a incubação, a suspensão foi centrifugada a 14000 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C e o precipitado ressuspenso em 200µL de TBS e guardado a 4°C até ser utilizado na titulação e no próximo round de seleção.

#### **Titulação dos fagos**

Foi semeada uma colônia de *E. coli* ER 2738 em caldo LB e incubada a 37°C com agitação até atingir uma absorbância aproximada de 0,5 a um comprimento de onda de 600nm. Também, foram dispensados 3mL de Top Agar (LB Agar com 0,7% de agarose) em tubos de cultivo esterilizados (um tubo para cada diluição analisada) e mantidos a 45°C. Paralelamente, foram pré-aquecidas as placas de LB/IPTG/Xgal (uma por cada diluição) a 37°C.

Foram preparadas diluições seriadas dos eluatos contendo fagos em meio LB. Para isto foram aliqüotados 9µL de meio LB acrescido de 1µL do eluato com os fagos no primeiro tubo e após esse passo realizaram-se diluições seriadas 1:10. As faixas de diluição foram

de  $10^{-1}$  até  $10^{-3}$  para eluatos de fagos não amplificados previamente e  $10^{-8}$  até  $10^{-11}$  para os eluatos amplificados.

Quando o cultivo bacteriano atingiu uma absorbância<sub>600nm</sub> de 0,5 foram acrescentados 200µL deste cultivo para os microtubos contendo as diferentes diluições de fagos, os microtubos foram agitados rapidamente em vórtex e incubados à temperatura ambiente por 1-5 minutos para permitir a infecção das bactérias. As bactérias infectadas foram transferidas para tubos com Top Agar a 45°C, agitadas brevemente e dispensadas uniformemente na superfície das placas com meio LB/IPTG/Xgal. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e após este passo procedeu-se à contagem das unidades formadoras de placas (pfu) azuis. O título dos fagos foi expresso em pfu/mL.

### **Segundo e terceiro rounds de seleção**

Nessa etapa de seleção os procedimentos foram realizados sob as mesmas condições, porém, ao invés de utilizar TBST 0,1% foi utilizado TBST 0,5% para realizar as lavagens e para fazer a diluição dos fagos amplificados. Para o segundo e terceiro rounds de seleção foram utilizados fagos amplificados dos rounds anteriores que foram diluídos em TBST 0,5% até uma concentração de  $1 \times 10^{11}$  (biblioteca PhD 12) e  $2 \times 10^{11}$  (biblioteca PhD C7C). Os fagos diluídos foram aplicados nas placas sensibilizadas com o receptor Gb3 purificado. Os fagos eluidos no terceiro round não foram amplificados e foram titulados diretamente em triplicata para a obtenção de placas azuis isoladas.

### **Extração do DNA fágico**

Realizou-se uma diluição 1:100 de cultivo de *E. coli* ER 2738 em meio LB. Placas azuis individuais cultivadas nas placas de titulação foram transferidas para os tubos contendo a suspensão bacteriana. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação, durante 5 horas. Após este procedimento, os cultivos foram transferidos para microtubos e centrifugados a 14 000 r.p.m. durante 30 segundos. Depois de repetir este passo, aproximadamente 80%

do volume do sobrenadante foi transferido para novos tubos e estocado a 4°C. Depois foram transferidos 500µL do sobrenadante contendo o fago para um tubo de micro centrífuga contendo 200µL de PEG/NaCl, mantidos à temperatura ambiente durante 10 minutos e centrifugados durante 10 minutos. O precipitado foi suspenso em 100µL de tampão iodeto (10mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM EDTA; 4M NaI) e foram acrescentados 250µL de etanol absoluto para a precipitação do DNA fágico durante 10 minutos a temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados durante 10 minutos e o sobrenadante descartado, depois se adicionaram 200µL de etanol 70%. Finalmente o precipitado foi suspenso em 30µL de tampão TE e a suspensão de DNA fágico estocada a -20°C.

### **Sequenciamento e análise das sequências dos clones fágicos**

O sequenciamento do DNA dos clones fágicos foi realizado em colaboração com o professor Márcio José da Silva do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas- Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – UNICAMP- São Paulo.

As sequências foram analisadas usando os seguintes programas informáticos:

- CHROMAS Lite Version 2.1 (<http://www.technelysium.com.au/>) para a análise e correção dos cromatogramas com as sequências nucleotídicas.
- MEGA ( <http://www.megasoftware.net> ) para a edição das sequências.
- TRANSLATE ( <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/TRANSLATE/translate.html> ) do HIV Sequence Database: para a tradução das sequências nucleotídicas para sequências amino-ácidas escritas em código de uma letra.
- CLUSTALW ( <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> ) para o alinhamento e busca de sequências consenso.

Todas as sequências dos clones fágicos obtidos, após o terceiro round de cada biopanning, foram alinhadas com as sequências mostradas na figura 9 e 10 para verificar a fidelidade

das sequências analisadas com as sequências descritas pelos fabricantes das bibliotecas de Phage Display.

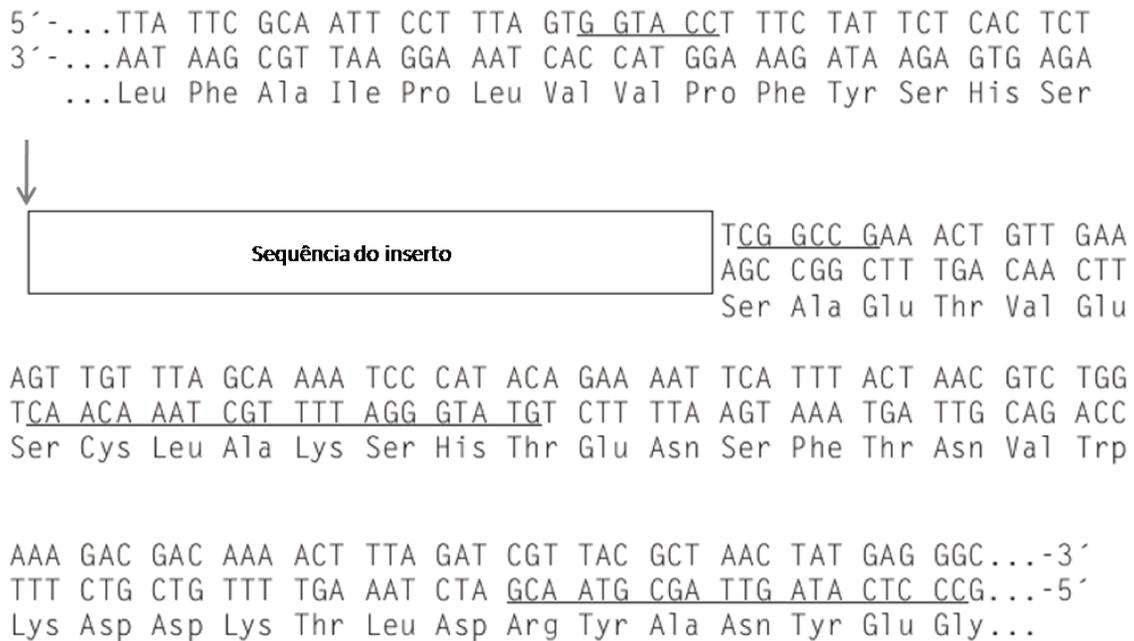


Figura 8. Posição do inserto com o peptídeo ligado à proteína pIII do fago. As sequências que flanqueiam o inserto pertencem ao genoma do fago filamentosso M13. Cada biblioteca é expressa com uma sequência aminoacídica no extremo N-terminal que é clivada na posição indicada pela seta, dessa forma o inserto com o peptídeo aleatório é posicionado diretamente na região N-terminal da proteína pIII madura.

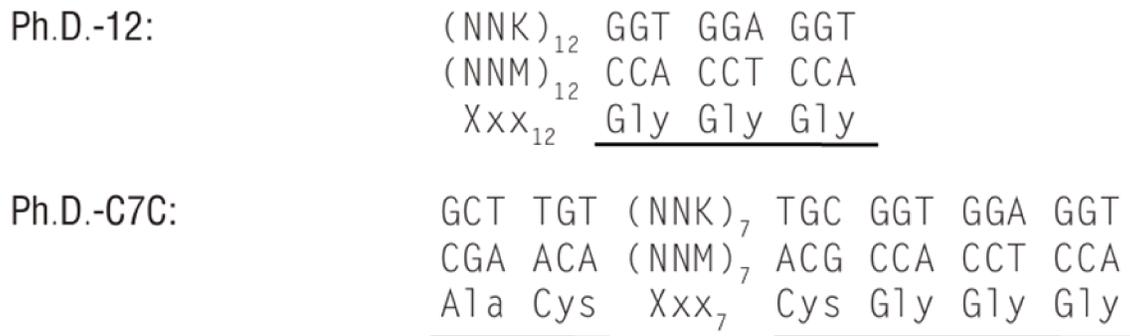


Figura 9. Detalhes da sequência nucleotídica e aminoacídica dos insertos ligados à proteína pIII dos fagos M13 em cada biblioteca de Phage Display utilizada no presente estudo. As sequências “linker” são mostradas sublinhadas no gráfico. A nomenclatura usada na figura é a seguinte: N representa qualquer base nucleotídica (Adenina, Timina, Guanina ou Citosina); K representa uma Guanina ou Timina e M representa uma Adenina ou Citosina.

## **Caracterização dos clones de fagos selecionados**

### **ELISA de ligação ao receptor celular Gb3**

Foi confirmada a ligação dos clones de fagos selecionados ao receptor celular Gb3 mediante ELISA. Para isto, previamente foram alinhadas as sequências aminoacídicas dos clones fágicos sendo selecionados os clones que compartilhavam pelo menos três aminoácidos na mesma posição. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços sensibilizados com 100µL do receptor Gb3 (100µg/mL em 0,1M NaHCO<sub>3</sub> pH 8,6) e incubadas a 4°C durante a noite. Posteriormente, o receptor Gb3 foi removido e adicionaram-se 250µL de solução de bloqueio e a placa incubada 37°C durante 2 horas. Depois, os poços foram lavados seis vezes com PBS-T 0,5% (PBS-Tween 0,5%) e os clones de fagos diluídos seriadamente foram adicionados aos poços (10<sup>10</sup> pfu até 2x10<sup>5</sup>). Após este passo, a placa foi incubada durante uma hora e os poços lavados seis vezes com PBS-T 0,5% e adicionaram-se 200µl do anticorpo anti-M13 conjugado com peroxidase de rabanete a 37°C durante uma hora. A reação foi revelada com orto-fenilenodiamina (OPD) em tampão citrato de sódio. A leitura da absorbância foi realizada a um comprimento de onda de 420nm.

### **Avaliação dos peptídeos selecionados**

Foram sintetizados três peptídeos, baseados na sequência do inserto expresso por cada clone selecionado após o ensaio de ELISA de ligação ao receptor celular Gb3, que foram usados nos ensaios posteriores. Os peptídeos foram sintetizados pela empresa Life-Technologies (Brazil)

### **ELISA de competição para toxinas Stx e peptídeos**

Os poços das microplacas foram sensibilizados com 100µL do receptor Gb3 (100µg/ml). Depois de três lavagens com PBS-T 0,5% os poços foram bloqueados com albumina de

soro bovino (BSA) diluída em PBS-T a 2% (w/v). Após este passo, foram adicionados 100 µL dos peptídeos nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/poço e as placas incubadas durante uma hora a 37°C. Finalizada a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,5% e adicionaram-se 100µL de toxina Stx (500pg/poço) e as placas incubadas durante 1 hora a 37°C. As placas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,5% e foram adicionados 200µL de anticorpo monoclonal murino anti Stx específico para cada uma das toxinas testadas (anti Stx1 ou anti Stx2) e as placas incubadas durante 2 horas a 37°C. Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T 0,5% e finalizadas as lavagens foram adicionados 100µL de anticorpo anti IgG-murino conjugado com peroxidase de rabanete (HRP) e as placas incubadas durante 1 hora a 37°C. A união do anticorpo anti-anti Stx conjugado foi revelada pela adição de uma solução de orto-fenilenodiamina (OPD) [ácido cítrico 0,1M; Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% e OPD]. A leitura da absorbância foi realizada a 420nm. A percentagem de inibição foi calculada pela seguinte fórmula:  $[1 - (\text{Absorbância}_{420\text{nm}} \text{ poço avaliado} / \text{Absorbância}_{420\text{nm}} \text{ poço controle})] \times 100$ . Os resultados que foram maiores do que 75% foram considerados como "inibição competitiva" enquanto que os resultados com uma inibição entre 75% e 25% foram considerados "inibição competitiva relativa", e menos de 25% como "não competitivo" (Xu et al., 2006).

Em ensaios prévios de padronização do ensaio foi observado que uma concentração de toxina Stx (Stx1 e Stx2) de 500pg/poço produziu maiores valores de absorbância no ensaio de ELISA quando testado com anticorpos anti-Stx.

### **Determinação da atividade citotóxica das toxinas Stx**

#### **Preparação das linhagens celulares**

As células Vero foram descongeladas a 37°C e transferidas para uma garrafa de cultura de células contendo Meio Mínimo Essencial de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibióticos contendo

penicilina (1000U/mL) e estreptomicina (250µg/mL). Os frascos de cultura foram incubados em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 48 horas, até a formação da monocamada celular. Após este período o meio foi descartado sendo adicionada à cultura celular uma solução de tripsina para descolamento da monocamada. As células foram ressuspendidas em meio DMEM acrescido de 10% de SFB e 1 % de antibióticos, para um número estimado de  $2,5 \times 10^5$  células/mL. A suspensão de células foi dispensada nos poços da microplaca e esta foi incubada a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, durante 24 horas.

### **Ensaio de atividade citotóxica em células Vero**

O efeito citotóxico causado pelas toxinas Stx foi determinado segundo a metodologia descrita por Borenfreund & Puerner (1984). O meio de cultura celular foi removido e 100µL de DMEM com 50µL gentamicina (80µg/mL) foram adicionados. Diluições seriadas de Stx1 e Stx2 (1:2) em PBS foram adicionadas na monocamada celular. As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e a leitura foi feita após 48 horas de incubação com auxílio de um microscópio óptico invertido. Finalmente, o meio foi substituído por 200µL de solução de Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (2mg/mL) e a microplaca incubada a 37°C durante três horas. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS e a formazana produzida solubilizada com uma solução de álcool isopropílico e HCl 1N (24:1). As placas foram mantidas em agitação durante 10 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 540nm.

### **Ensaio de neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx**

Os poços das microplacas contendo células Vero foram inoculados com 100, 50, 25 e 12,5µg dos peptídeos selecionados diluídos em meio DMEM. As placas foram incubadas a 37°C, durante duas horas, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse passo, foram adicionados 100µL de Stx1 ou Stx2 (500pg/mL) em meio DMEM. As placas foram incubadas a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, até atingir 45 horas de incubação. Em seguida, foram adicionados 200µL de MTT

(2µg/mL) por poço. As microplacas foram lavadas duas vezes com PBS e acrescentaram-se 200µL de uma solução de álcool isopropílico e HCl 1N (24:1). As placas foram mantidas em agitação durante 10 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 540nm.

O ensaio foi realizado em duplicata e a porcentagem de inibição calculada como:

$$\% \text{ inibição} = (A_{\text{peptídeo}} - A_{\text{Stx}} / A_{\text{PBS}} - A_{\text{Stx}}) \times 100.$$

Onde  $A_{\text{peptídeo}}$ =Absorbância do peptídeo;  $A_{\text{Stx}}$ =Absorbância da toxina;  $A_{\text{PBS}}$ =Absorbância do PBS. (Schmitt et al., 1991).

### **Determinação in vivo da capacidade inibitória dos peptídeos obtidos mediante Phage Display**

#### **Determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) em camundongos**

Foi determinada a DL<sub>50</sub> em camundongos Swiss tanto para Stx1 quanto para Stx2. Brevemente, vinte camundongos machos com pesos de 25-35g foram separados em quatro grupos por cada toxina ensaiada. O material injetado por via intraperitoneal em todos os camundongos pertencentes ao mesmo grupo é detalhado na tabela 2:

Tabela 2: Material injetado nos grupos de camundongos para calcular a DL<sub>50</sub>

Toxina injetada*		Número de camundongos
Toxina	ng/200 µL	
Controle sem toxina	-	5
Stx1	12,5	5
Stx1	125	5
Stx1	1250	5
Controle sem toxina	-	5
Stx2	1	5
Stx2	10	5
Stx2	100	5

\* As toxinas foram diluídas em PBS e um volume final de 200µL foi injetado em cada camundongo

A sobrevivência dos camundongos foi monitorada durante sete dias e no oitavo dia os animais sobreviventes foram eutanasiados. A DL<sub>50</sub> foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\log DL_{50} = \log (\text{Maior dose testada}) + (\log D)[(1/2) - (\Sigma R/N)]$$

onde D é o fator de diluição entre doses sucessivas,  $\Sigma R$  é o número total de camundongos mortos (Rahal et al., 2011).

### **Inibição da letalidade em camundongos**

Esse ensaio foi realizado em camundongos machos Swiss com peso de 25-35g. Os camundongos foram separados em grupos contendo cinco animais. Todos os

camundongos pertencentes ao mesmo grupo experimental foram injetados por via intraperitoneal com uma solução contendo toxina Stx diluída em PBS ( $2DL_{50}$ ) e posteriormente foram inoculados com  $200\mu\text{L}$  de uma solução contendo  $200\mu\text{g}$  de cada peptídeo ensaiado. Os grupos controle foram inoculados somente com a toxina (controle toxina), somente com o peptídeo analisado (controle peptídeo) e com PBS (controle sobrevivência). O ensaio foi realizado seguindo o esquema descrito na tabela 3:

Tabela 3: Material injetado nos camundongos para avaliar a inibição da letalidade pelos peptídeos selecionados.

Descrição	Material Injetado		N° de camundogos
	Toxina	Peptídeo ( $200\mu\text{g}$ )	
<b>Controle sobrevivência</b>	-	-	5
<b>Controle toxina Stx1</b>	2 $DL_{50}$ Stx1	-	5
<b>Controle toxina Stx2</b>	2 $DL_{50}$ Stx2	-	5
<b>Controle Peptídeo PC7-12</b>	-	PC7-12	5
<b>Controle Peptídeo P12-26</b>	-	P12-26	5
<b>Controle Peptídeo PC7-30</b>	-	PC7-30	5
<b>Stx1 + Peptídeos</b>	2 $DL_{50}$ Stx1	PC7-12	5
		P12-26	5
		PC7-30	5
<b>Stx2 + Peptídeos</b>	2 $DL_{50}$ Stx2	PC7-12	5
		P12-26	5
		PC7-30	5

A sobrevivência dos camundongos foi monitorada durante sete dias e no oitavo dia os camundongos sobreviventes foram eutanasiados.

## RESULTADOS

### Biopanning Phage Display

Foram realizados três ensaios de biopanning com o receptor Gb3 imobilizado, sendo que cada um deles incluiu três rounds de seleção com cada uma das duas bibliotecas de fagos (PhD-12 e PhD-C7C). Finalizado o terceiro round de cada etapa de biopanning foram selecionados 384 clones de fagos para a posterior etapa de seqüenciamento.

### Sequenciamento dos clones selecionados e análise das sequências

Após a edição das sequências nucleotídicas dos clones selecionados, as mesmas foram analisadas e traduzidas *in silico* para verificar a presença de sequências consenso ou o compartilhamento de pelo menos três aminoácidos na mesma posição. Na etapa final de análise das sequências dos clones fágicos foram selecionados seis clones que portaram 3-4 aminoácidos consenso (Figura 8). Esses clones foram analisados posteriormente através do ensaio de ELISA para determinar sua capacidade de ligação ao receptor Gb3. Os aminoácidos correspondentes as sequências “linker” específicas para cada biblioteca de fagos está indicada na cor vermelha.

P.h.D.C7C-12 **A**C**P**NN**T**IS**L**CGGGS  
P.h.D.C7C-30 **A**C**P**LT**T**KT**L**CGGGS

P.h.D.12-19 **D**G**Y**Y**R**SNNAGT**P**GGGS  
P.h.D.12-28 **D**N**Y**T**R**YDYMDI**P**GGGS

P.h.D.12-26 **S**APR**H**N**V**P**D**NPRGGGS  
P.h.D.12-38 **S**SQP**H**T**V**F**D**PSKGGGS

Figura 10: Sequências aminoacídicas dos clones fágicos selecionados para o ensaio de ELISA de ligação ao receptor Gb3. Na figura observam-se os aminoácidos consenso marcados em negrito.

### Elisa de ligação dos fagos ao receptor celular Gb3

Na figura 10 observam-se os resultados obtidos no ensaio de ligação dos fagos selecionados ao receptor celular Gb3 purificado. Dentre os seis clones de fagos analisados, os fagos denominados P.h.D.C7C-12, P.h.D.C7C-30 e P.h.D.12-26 mostraram os maiores valores de absorvância nesse ensaio, confirmando dessa forma a sua capacidade de ligação ao receptor Gb3. Os resultados dos seis clones ensaiados são mostrados na Figura 11:

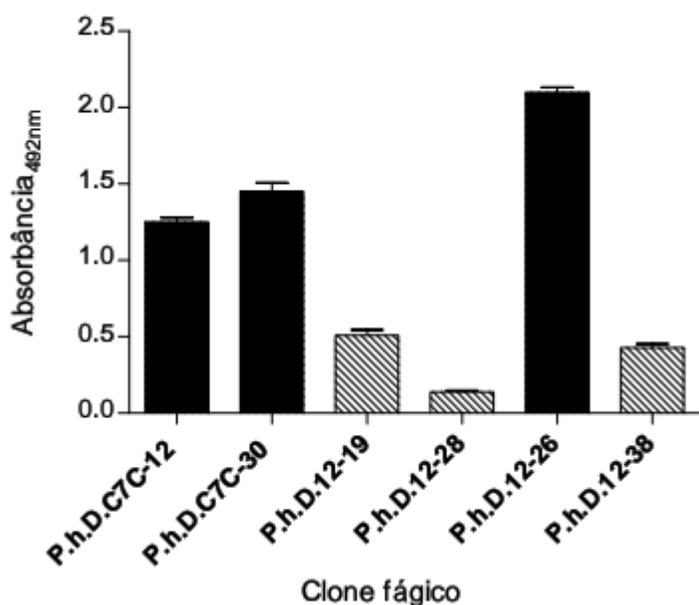


Figura 11: ELISA de ligação dos clones fágicos selecionados ao receptor Gb3. As barras de cor preta representam os maiores valores de absorvância observados, os quais se correspondem com uma maior capacidade de ligação desses clones ao receptor Gb3.

As sequências dos insertos ligados a proteína pIII dos fagos P.h.D.C7C-12, P.h.D.12-26 e P.h.D.C7C-30 foram utilizadas para a síntese dos peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30, respectivamente. A tabela 4 mostra as sequências amino-ácidas dos peptídeos sintetizado para os ensaios posteriores.

Tabela 4. Sequência aminoacídica dos peptídeos sintetizados após o ensaio de ELISA de ligação ao receptor Gb3.

Peptídeo	Resíduos	Sequência * Aminoacídica	Massa molecular (Da)
PC7-12	14	<u>ACP</u> <b>NNTISL</b> <u>CGGGS</u>	1292.48
P12-26	16	<b>SAPRHNV</b> <u>PDNPR</u> <u>G</u> <b>GGS</b>	1617.69
PC7-30	14	<u>ACPL</u> <b>TTKTL</b> <u>CGGGS</u>	1308.52

\*Os aminoácidos que estão sublinhados correspondem às sequências “linker” específicas para cada biblioteca de fagos. Em negrito aparecem os aminoácidos que se localizam na região variável do inserto ligado à proteína pIII dos fagos.

#### **ELISA de competição na ligação ao receptor Gb3**

Nas figuras 12 e 13 são mostrados os resultados do ensaio de ELISA de competição para avaliar a capacidade dos peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30 de competir com as toxinas Stx1 e Stx2 pela ligação ao receptor celular Gb3. A concentração das toxinas Stx utilizada nesse ensaio foi de 500pg/poço.

Foi observado que o peptídeo PC7-30 apresentou os maiores valores de competição pela ligação ao receptor Gb3 quando ensaiado junto com Stx1, enquanto que o peptídeo P12-26 mostrou maiores porcentagens de competição quando ensaiado com Stx2. Também, observou-se que os peptídeos PC7-12 e PC7-30 apresentaram valores de competição similares aos obtidos com P12-26 no ensaio com a toxina Stx2. Os resultados do ensaio de competição com as diferentes concentrações de peptídeos analisadas são mostrados nas figuras 12 e 13:

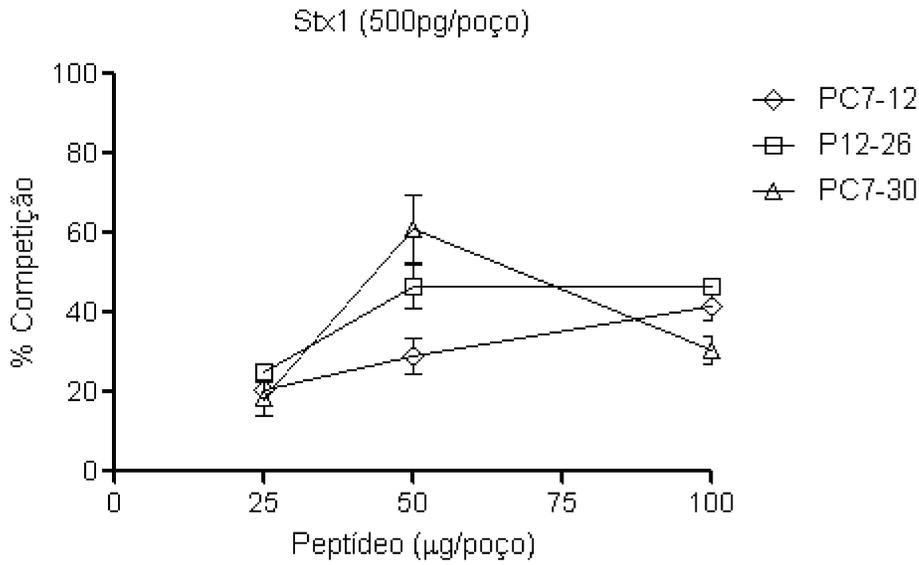


Figura 12: ELISA de competição pela ligação ao receptor Gb3 entre a toxina Stx1 e os peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30. Observa-se que com 50µg/poço do peptídeo PC7-30 houve maior porcentagem de competição pela ligação ao receptor Gb3.

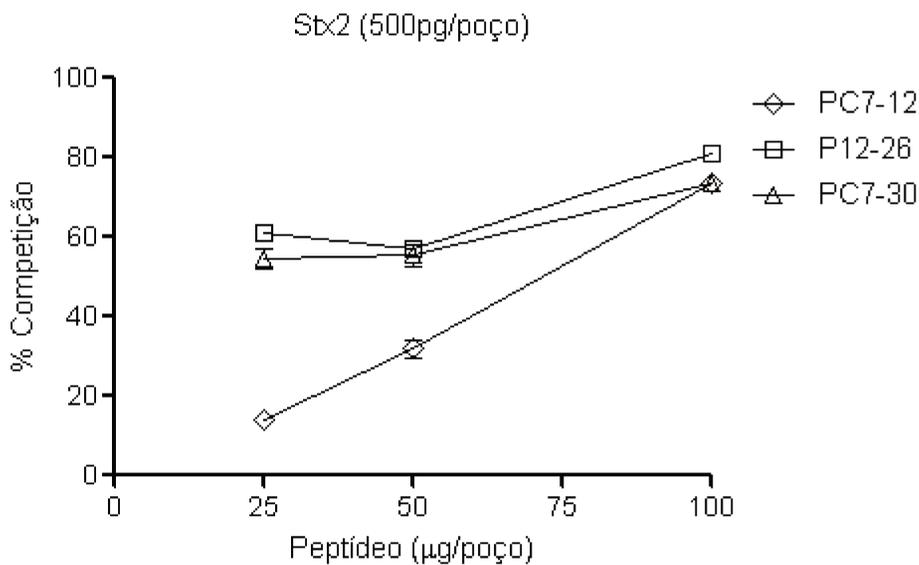


Figura 13: ELISA de competição pela ligação ao receptor Gb3 entre a toxina Stx1 e os peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30. Observa-se que com 100µg/poço do peptídeo P12-26 houve maior porcentagem de competição pela ligação ao receptor Gb3.

### Neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx em células Vero

Os resultados do ensaio de neutralização da atividade citotóxica do sobrenadante do cultivo bacteriano de *E. coli* O157:H7 é mostrado na figura 14. Foi observado que o peptídeo P12-26, na concentração de 50µg/poço, apresentou maiores valores de neutralização da atividade citotóxica do sobrenadante em células Vero.

Quando o ensaio de neutralização da atividade citotóxica foi realizado com as toxinas Stx purificadas foram observados maiores valores de neutralização da atividade citotóxica de Stx2 quando comparado com Stx1 (Figuras 15, 16 e 17).

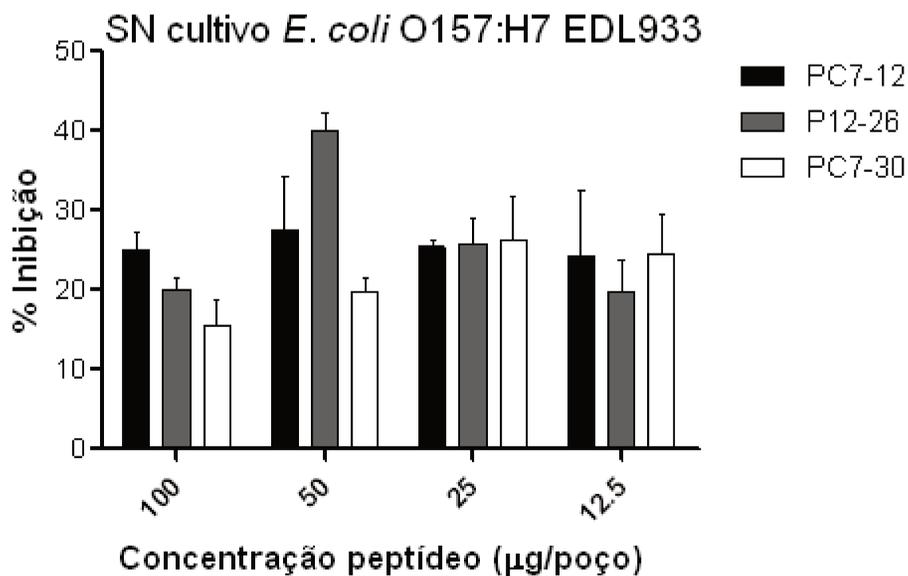


Figura 14. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica causada pelo sobrenadante de *E. coli* O157:H7 EDL933 (produtor de Stx1 e Stx2) pelos peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30. O ensaio foi realizado em células Vero.

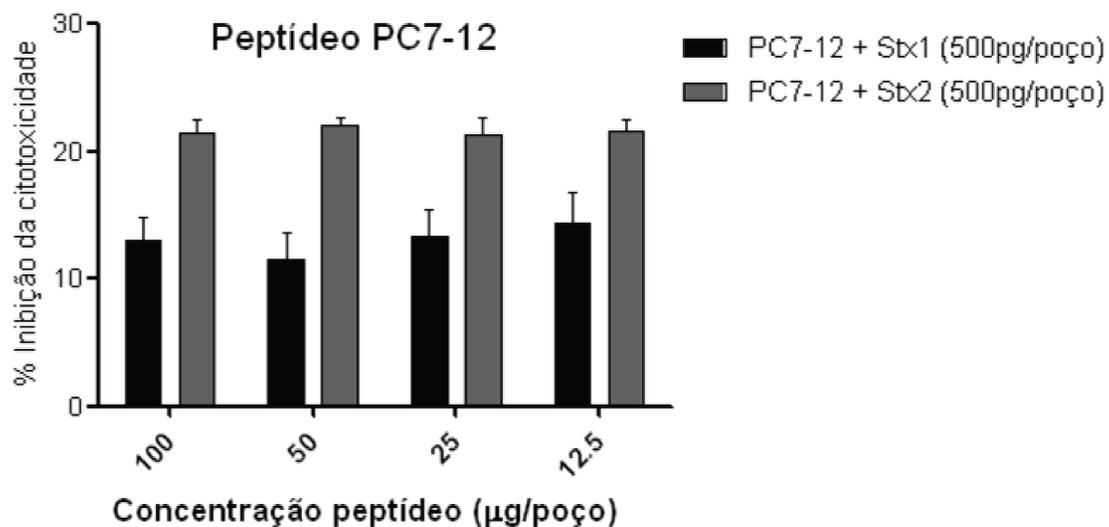


Figura 15. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx1 e Stx2 pelo peptídeo PC7-12. O ensaio foi realizado em células Vero.

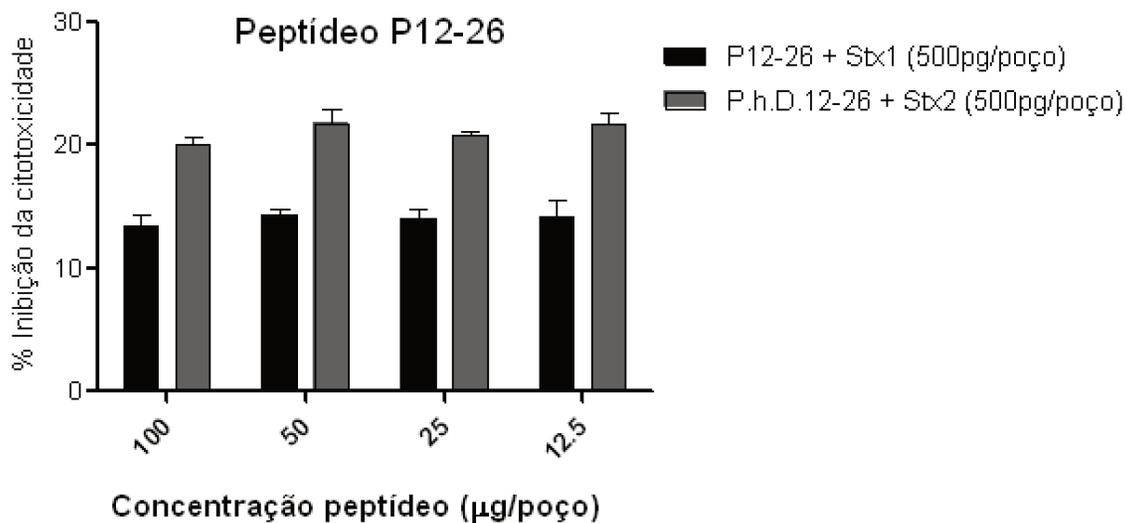


Figura 16. Ensaio de neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx1 e Stx2 pelo peptídeo P12-26. O ensaio foi realizado em células Vero.

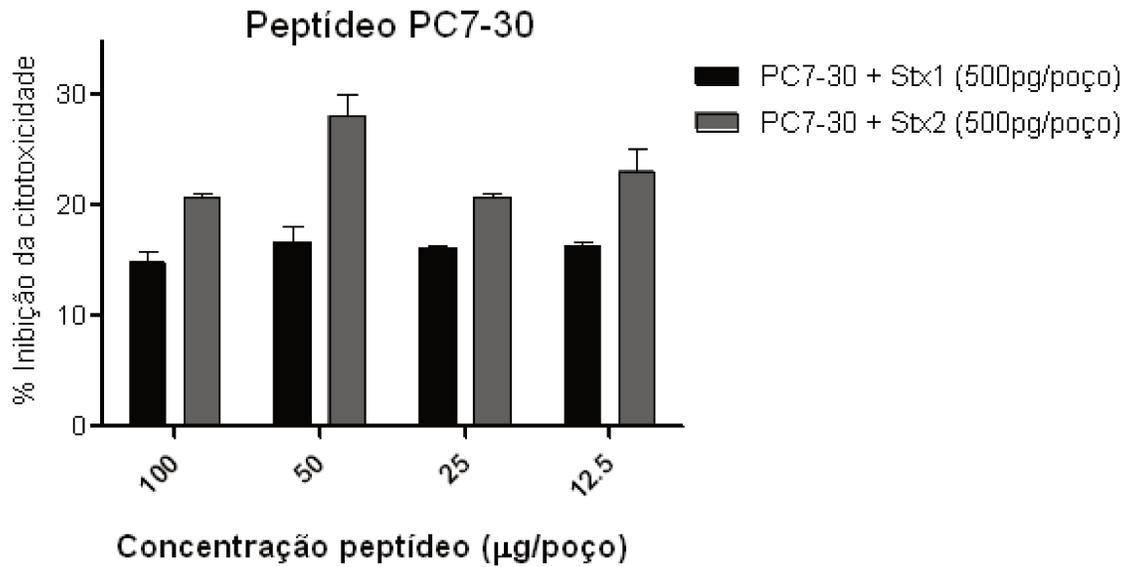


Figura 17. Neutralização da atividade citotóxica das toxinas Stx usando o peptídeo PC7-30. O ensaio foi realizado em células Vero.

#### Determinação da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>)

A DL<sub>50</sub> estimada segundo a metodologia descrita anteriormente foi de 40ng para a toxina Stx1 e de 32ng para a toxina Stx2.

#### Ensaio de inibição da letalidade em camundongos

Os resultados obtidos no ensaio de inibição da letalidade pelos peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30 são mostrados nas figuras 18, 19, 20, 21, 22 e 23.

Foi observado que o peptídeo PC7-12 inibiu parcialmente a letalidade tanto de Stx1 quanto de Stx2. Por outro lado, o peptídeo P12-26 não inibiu a letalidade causada pela toxina Stx2 em camundongos, mas inibiu parcialmente a letalidade causada por Stx1. Além disso, observou-se que o peptídeo PC7-30 inibiu totalmente a letalidade causada pela toxina Stx1, no entanto esse peptídeo não teve efeito inibitório sobre a letalidade da

toxina Stx2 nos camundongos analisados. Também, o ensaio mostrou que todos os peptídeos sintéticos aplicados nos camundongos não causaram letalidade *in vivo*.

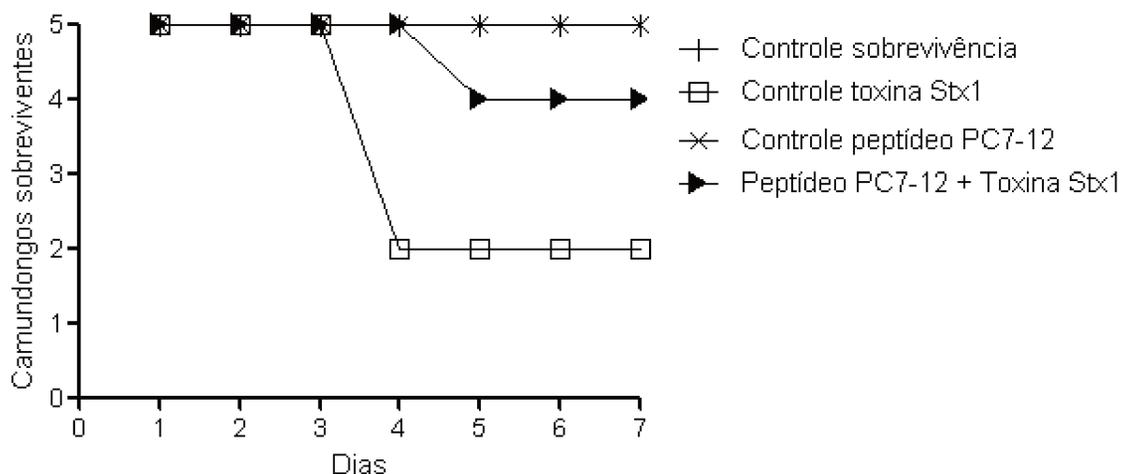


Figura 18. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx1 em camundongos. Foram injetados 200 µg do peptídeo PC7-12 enquanto que a concentração da toxina Stx1 correspondeu a 2DL<sub>50</sub>.

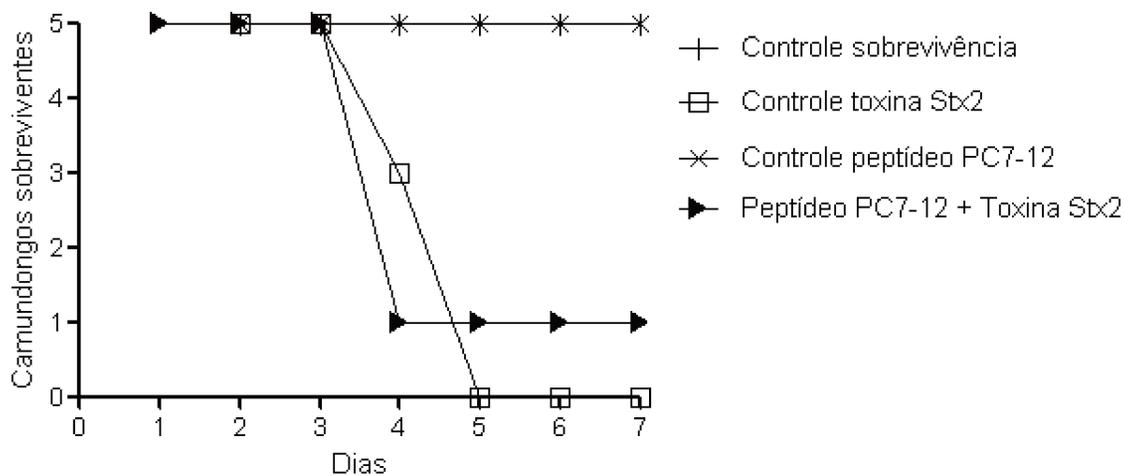


Figura 19. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx2 em camundongos. Foram injetados 200 µg do peptídeo PC7-12 nos camundongos e a concentração da toxina Stx2 correspondeu a 2DL<sub>50</sub>.

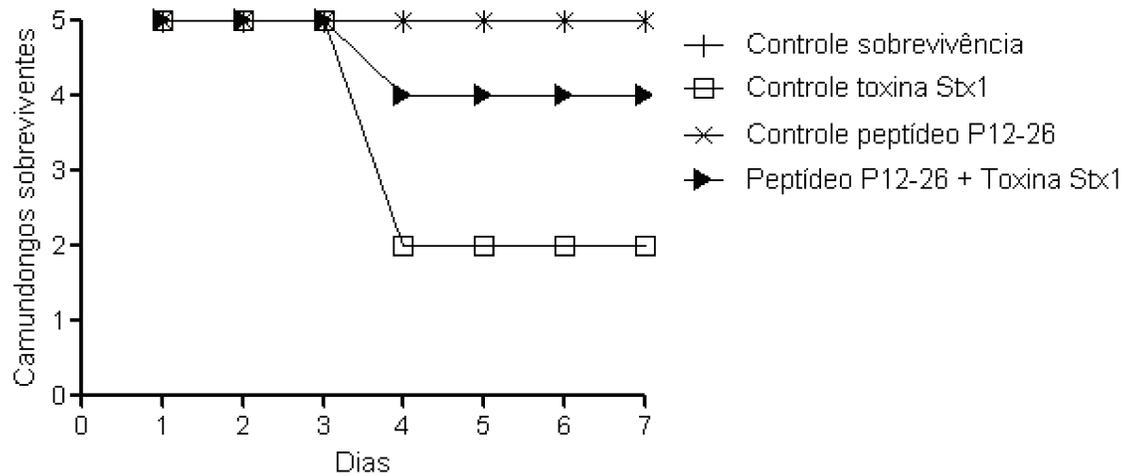


Figura 20. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx1 em camundongos. Foram injetados 200 µg do peptídeo P12-26 nos camundongos e a concentração da toxina Stx1 correspondeu a 2DL<sub>50</sub>.

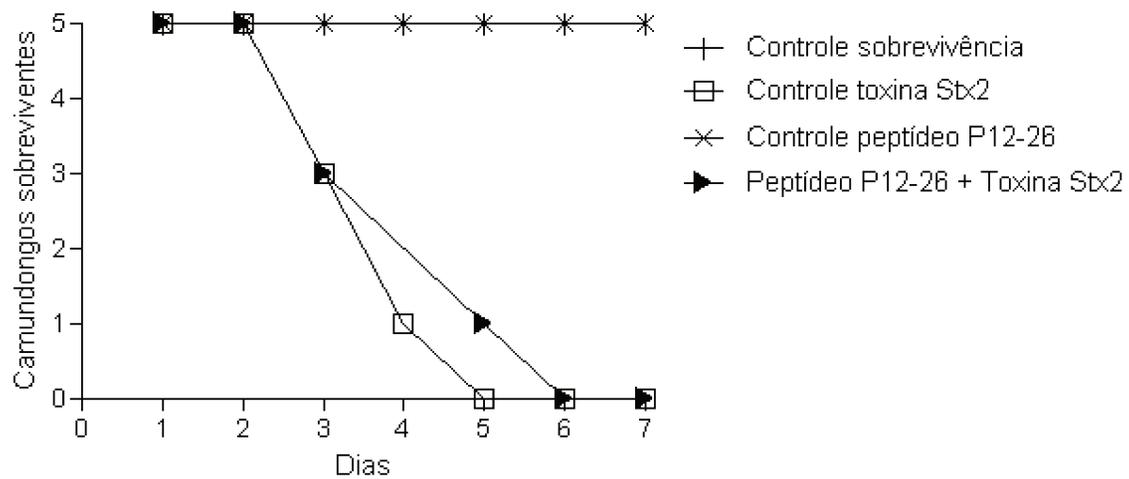


Figura 21. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx2 em camundongos. Foram injetados 200 µg do peptídeo P12-26 e a concentração da toxina Stx2 correspondeu a 2DL<sub>50</sub>.

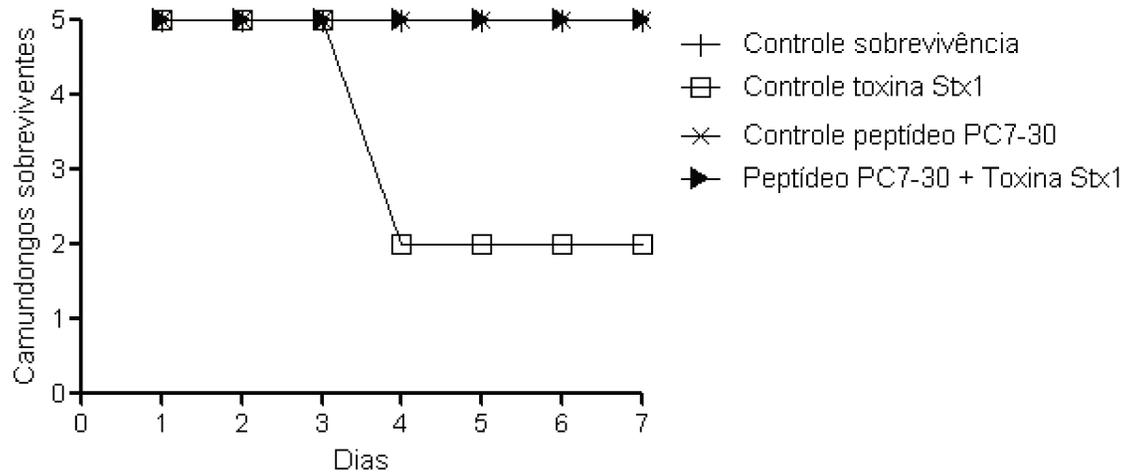


Figura 22. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx1 em camundongos. Foram injetados 200 µg do peptídeo PC7-30 nos camundongos e a concentração da toxina Stx1 correspondeu a 2DL<sub>50</sub>.

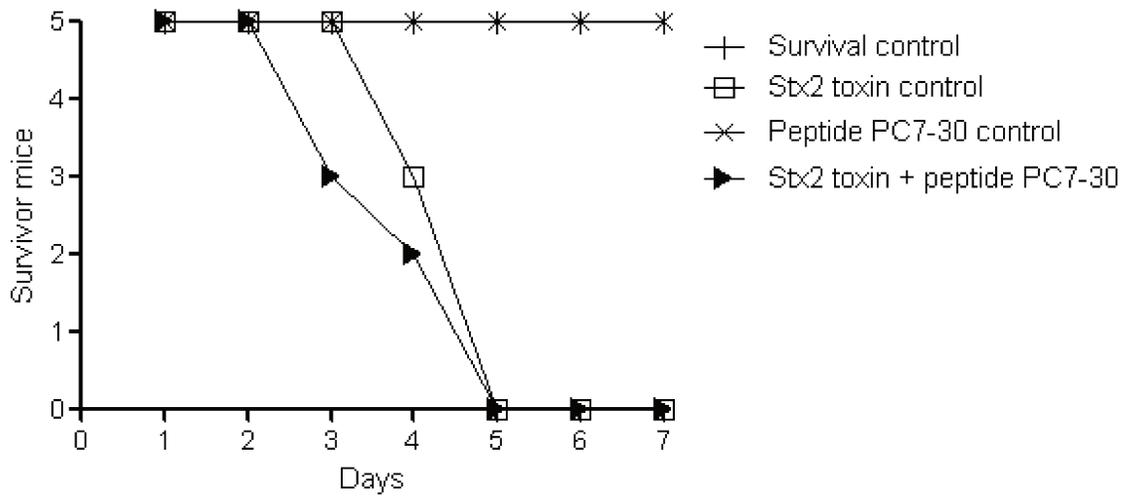


Figura 23. Ensaio de inibição da letalidade causada por Stx2 em camundongos. Foram injetados 200 µg do peptídeo PC7-30 nos camundongos e a concentração da toxina Stx2 correspondeu a 2DL<sub>50</sub>.

## DISCUSSÃO

O uso de peptídeos como agentes terapêuticos é considerado um importante avanço da medicina, pois eles podem mimetizar uma ampla variedade de agentes endógenos e, além disso, mostram alta seletividade para ligar-se a receptores celulares específicos (Mantzourani et al., 2008).

No presente trabalho, nós apresentamos os resultados da inibição dos efeitos citotóxicos provocados pelas toxinas de Shiga produzidas por *Escherichia coli*. As moléculas aqui descritas foram desenvolvidas através de técnicas de Phage display. Os três peptídeos desenvolvidos no presente trabalho: PC7-12, P12-26 e PC7-30 possuem capacidade de ligação ao receptor celular Gb3 e inibem a toxicidade causada pelas toxinas Stx tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

De acordo com Heins e Quack (2010) a seleção eficiente de peptídeos moduladores das funções dos receptores celulares pode aumentar com o uso de bibliotecas de peptídeos expressos randomicamente, devido aos ligantes peptídicos não serem homólogos da estrutura primária do ligante natural. Nossos resultados suportam a hipótese descrita por Heins & Quack, pois quando as sequências amino-ácidas dos peptídeos sintéticos foram analisadas contra as bases de dados (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) não foram observadas homologias com as sequências das toxinas de Shiga.

Uma das primeiras tentativas no uso das bibliotecas de Phage Display para a descoberta de agentes neutralizantes do dano citotóxico causado pelas toxinas Stx foi realizada por Miura et al., (2006), que reportaram que alguns peptídeos mimetizadores do receptor Gb3 expressaram forte neutralização das toxinas Stx *in vitro*, no entanto os autores não mostraram resultados *in vivo*.

Todos os peptídeos descritos no presente trabalho foram relativamente competitivos na ligação ao receptor Gb3 imobilizado quando ensaiados com a toxina Stx1, enquanto que o peptídeo linear P12-26 foi competitivo na ligação ao Gb3 quando comparado com a toxina Stx2. As manifestações patológicas induzidas pelas toxinas Stx *in vivo* são mediadas pela ligação ao receptor Gb3 (Lingwood, 1996). Nesse sentido, nossos resultados são interessantes e sugerem que os peptídeos analisados podem competir com as toxinas *in vivo* pela ligação ao receptor Gb3, essa hipótese é suportada pelo fato de que os peptídeos descritos nesse trabalho inibiram a ligação das toxinas ao Gb3 *in vitro*. Os resultados do ELISA de ligação com os clones fágicos foram confirmados com os resultados do ELISA de competição com os peptídeos sintetizados. Foi observado que o peptídeo PC7-30 mostrou as maiores porcentagens de competição quando ensaiado com Stx1. Além disso, o peptídeo P12-26 mostrou os maiores valores de competição com Stx2, enquanto que o peptídeo PC7-12 mostrou os menores valores de competição frente às duas toxinas. Silberstein et al., (2008) descreveram que a inibição da síntese de Gb3 nas células alvo podia ser realizada com um inibidor da glucosilceramida sintase, sugerindo que o receptor Gb3 poderia ser considerado um alvo importante para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para evitar as graves sequelas das infecções por STEC. Dessa forma, consideramos que nossa abordagem experimental poderia conduzir a novos desafios por que a interação das toxinas de Shiga com seus receptores glicolipídicos é extremamente complexa (Peter & Lingwood, 2000).

Yamada et al., (2006) descreveram que o desenvolvimento de peptídeos antimicrobianos fusionados com peptídeos miméticos de Gb3 mostraram atividade neutralizante dos efeitos citotóxicos de Stx1. Esses autores usaram Stx1 na concentração de 50pg/mL e observaram incrementos na sobrevivência celular de aproximadamente 10%. Por outro lado, nós usamos as toxinas na concentração de 500pg/mL e observamos valores de inibição da citotoxicidade na faixa de 11,49-16,62% para Stx1 e 19,99-28,04% para Stx2.

Os peptídeos descritos protegeram as células Vero da atividade citotóxica das toxinas Stx1 e Stx2. Um dado importante é que o efeito protetor foi maior contra a citotoxicidade causada por Stx2, frequentemente associada com quadros clínicos mais severos e SUH do que a toxina Stx1 (Fuller et al., 2011). Também, em experimentos com primatas foi demonstrado que a administração de Stx2 é capaz de causar os sintomas da SUH enquanto que a administração de Stx1 não possui a capacidade para reproduzir os sintomas mais graves dessa síndrome (Stearns-Kurosawa et al., 2010).

Por outro lado, Smith et al. (2009) relataram que o anticorpo monoclonal MAb 11E10 neutralizava parcialmente a atividade citotóxica de Stx2 e algumas das suas variantes, não obstante a neutralização de Stx1 não tem sido descrita por esses autores. Dessa forma, nossos resultados destacam a importância de desenvolver agentes neutralizantes contra as duas toxinas, pois a ocorrência de surtos em humanos causados por STEC produtora de Stx1 têm sido descrita e a incidência de infecções por essas cepas está aumentando (Hashimoto et al., 1999).

Nós acreditamos que nossa estratégia possa ser considerada uma alternativa ou abordagem complementar à imunização passiva, pois a efetividade do tratamento com anticorpos contra Stx pode diminuir rapidamente quando é administrada após o segundo dia de infecção (Matise et al., 2001; Casadevall, 2002). Além disso, o uso de anticorpos policlonais contra Stx1 ou Stx2 possui a desvantagem de que cada antisoro específico para uma das toxinas não tem reação cruzada com a outra toxina (Strockbine et al., 1986; Wen et al., 2006).

Os peptídeos PC7-12, P12-26 e PC7-30 mostraram efeito protetor contra a citotoxicidade das toxinas Stx1 e Stx2, o mesmo efeito protetor foi confirmado quando o sobrenadante de uma cultura de *E. coli* O157:H7 (produtora de toxinas Stx1 e Stx2) foi aplicado em células Vero. A inibição da citotoxicidade produzida pelo sobrenadante de *E. coli* O157:H7 foi maior do que a inibição associada às toxinas purificadas, demonstrando que os

peptídeos analisados tem efeito protetor contra as duas toxinas *in vitro*. Além disso, o peptídeo P12-26 mostrou os maiores valores de inibição da toxicidade, sugerindo que sua estrutura linear possa ser vantajosa para inibir a interação das toxinas Stx com o receptor Gb3 quando comparado com os outros dois peptídeos que tem uma conformação que forma um loop.

Para determinar se a administração dos peptídeos poderia inibir a letalidade em camundongos causada pelas toxinas Stx, nós injetamos por via intraperitoneal uma dose correspondente a  $2DL_{50}$  de cada toxina juntamente com 200 $\mu$ g de cada peptídeo. Foi observado que o peptídeo PC7-30 suprimiu a letalidade em camundongos que foram injetados com Stx1, mas não em camundongos aos quais se administrou Stx2, esses resultados estão em concordância com o observado no ensaio de competição, em que esse peptídeo mostrou as maiores porcentagens de competição contra a toxina Stx1.

Sauter et al., (2008) relataram anteriormente que a administração do anticorpo anti-Stx2 Ab11E10 poderia evitar a progressão da SUH em camundongos expostos a Stx2 e observaram que a atividade protetora foi dependente do tempo de aplicação. Nossos resultados mostraram que o peptídeo PC7-12 que expressou atividade neutralizante baixa em células Vero foi o único que suprimiu parcialmente a letalidade causada por Stx2 em camundongos, enquanto que os outros peptídeos não protegeram os animais da letalidade causada por Stx2. De acordo com Gallegos et al. (2012) nem sempre os resultados obtidos *in vitro* se correlacionam com a toxicidade observada nos ensaios *in vivo*. Nós acreditamos que as divergências nas atividades biológicas dos peptídeos tanto *in vitro* quanto *in vivo* poderiam estar associadas com suas características estruturais. Nesse sentido, Camacho et al., (2008) sugeriram que os peptídeos lineares são inerentemente instáveis e que alguns peptídeos com interessantes características farmacológicas *in vitro* tem provado ser ineficazes *in vivo*. Outros fatores que podem diminuir ou suprimir a atividade biológica de peptídeos terapêuticos são a rápida eliminação por filtração renal, devido ao seu pequeno tamanho, baixa estabilidade metabólica e biodegradabilidade,

como resultado da degradação enzimática por proteases e peptidases presentes no sangue, fígado e rins (Olmez & Akbulut, 2012).

Levando em consideração os fatores que afetam a resposta contra os efeitos das toxinas Stx *in vivo*, a perda da atividade biológica do peptídeo linear P12-26, que mostrou forte inibição da citotoxicidade causada por Stx2 *in vitro*, mas não mostrou atividade biológica *in vivo* contra essa toxina, poderia ser explicada.

Algumas limitações no uso de peptídeos como agentes terapêuticos podem ser atenuadas introduzindo modificações estruturais nos peptídeos para desenvolver peptídeos análogos com características farmacológicas melhoradas (Lien & Lowman, 2003; Funke & Willbold, 2009). Segundo Molek et al., (2011) os peptídeos que se ligam aos receptores celulares com significativa afinidade e especificidade podem ser considerados bons candidatos terapêuticos quando comparados com o uso de anticorpos antagonistas, além disso os peptídeos terapêuticos podem mostrar alta seletividade por seus receptores alvos e baixa toxicidade sistêmica. Segundo alguns autores (McGregor, 2008; Vlieghe et al., 2010) alguns peptídeos podem ter uma vida média curta (na ordem de minutos) e a atividade biológica dessas moléculas depende diretamente da sua estabilidade no soro. No presente estudo os peptídeos PC7-12 e PC7-30, cujas estruturas formam um loop, mostraram maior atividade biológica *in vivo* do que o peptídeo linear P12-26. Esses dados sugerem que a estrutura em loop poderia ser mais estável *in vivo* do que a conformação linear, aumentando dessa forma a vida média desses peptídeos e permitindo que eles atinjam os órgãos alvo.

Uma alternativa interessante para melhorar a atividade biológica dos peptídeos analisados poderia ser a incorporação de aminoácidos D-enantioméricos nos peptídeos descritos (Ladner et al., 2004; Funke & Willbold, 2009).

A abordagem científica utilizada no presente estudo demonstrou ser útil para o desenvolvimento de potenciais agentes neutralizantes da atividade citotóxica das toxinas Stx tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

## CONCLUSÕES

A técnica de Phage Display pode ser utilizada com sucesso no desenvolvimento de agentes neutralizantes da citotoxicidade causada pelas toxinas Stx. Nossos resultados mostram o desenvolvimento de três peptídeos sintéticos com capacidade de neutralização da atividade biológica das toxinas de Shiga tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A abordagem metodológica utilizada no presente trabalho permitiu a inibição da citotoxicidade através do uso de peptídeos que se ligam diretamente ao receptor celular Gb3, representando, dessa forma, uma alternativa promissória na busca de novos agentes terapêuticos que ajudem a evitar as sequelas associadas à ação das toxinas Stx. Assim, nossos dados poderão contribuir para desenvolver moléculas capazes de neutralizar os efeitos de ambas as toxinas de Shiga e de suas variantes descritas, incluindo Stx2e que se liga preferencialmente ao receptor Gb4 e, por todas essas toxinas se ligarem ao mesmo receptor Gb3 *in vivo* e a interação entre as toxinas e o receptor ser um evento crítico que media o desenvolvimento das manifestações patológicas nos pacientes infectados por STEC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu-Ali, GS, Ouellette LM, Henderson ST, Lacher DW, Riordan JT, Whittam TS, Manning SD. Increased adherence and expression of virulence genes in a lineage of *Escherichia coli* O157:H7 commonly associated with human infections. PLoS ONE. 5:e10167, 2010.
- Abu-Median AB, van Diemen PM, Dziva F, Vlisidou I, Wallis TS, Stevens MP. Functional analysis of lymphostatin homologues in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 258:43–49, 2006.
- Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, Iguchi A, Nakayama K, Hayashi T. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage–prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. PLoS Pathog. 5:e1000408, 2009.
- Banatvala N, Griffin PM, Greene KD, Barrett TJ, Bibb WF, Green JH, Wells JG. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. J Infect Dis. 183:1063–1070, 2001.
- Barret TJ, Lior H, Green JH, Khakhria R, Wells JG, Bell BP, Greene KD, Lewis J, Griffin PM. Laboratory investigation of a multistate food-borne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 by using pulsed-field gel electrophoresis and phage typing. J Clin Microbiol. 32:3013-3017, 1994.
- Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, Skotland T, Sandvig K. Shiga toxins. Toxicon. 60(6), 2012.
- Bielaszewska M, Stoewe F, Fruth A, Zhang W, Prager R, Brockmeyer J, Mellmann A, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxin, cytolethal distending toxin, and hemolysin repertoires in clinical *Escherichia coli* O91 isolates. J Clin Microbiol. 47:2061–2066, 2006.

- Blanco JE, Blanco M, Alonso MP, Mora A, Dahbi G, Coira MA, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)- producing *Escherichia coli* isolates from human patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J Clin Microbiol.* 42: 311-319, 2004.
- Borenfreund E and Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. *J Tissue Cult Methods.* 9:7-9, 1984.
- Boyd B and Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron.* 51, 207-210, 1989.
- Bratkovic T. Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cell Mol Life Sci.* 67:749–767, 2010.
- Brigati JR and Petrenko VA. Thermostability of landscape phage probes. *Anal Bioanal Chem.* 382, 1346–1350, 2005.
- Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology* 145(5): 1005–1014, 1999.
- Calderwood SB and Mekalanos JJ. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the fur locus. *J Bacteriol.* 169, 4759–4764, 1987.
- Calderwood, SB, Acheson DWK, Keusch GT, Barret TJ, Griffin PM, Swaminathan B, Kaper JB, Levine MM, Kaplan BS, Karch H, O’Brien AD, Obrig TG, Tarr PI, Wachsmutt IK. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News.* 62:118–119, 1996.
- Campellone KG and Leong JM. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr Opin Microbiol* 6:82–90, 2003
- Cantarelli V, Nagayama K, Takahashi A, Honda T, Cauduro PF, Dias CAG, Mezzari A, Brodt T. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O91:H21 from a child with diarrhea in Porto Alegre city, RS, Brazil. *Braz J Microbiol.* 31: 266-270, 2000.

- Caprioli A, Tozzi AE, Rizzoni G, Karch H. Non-O157 Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections in Europe. *Emerg Inf Dis.* 3:578-9, 1997.
- Centers for Disease Control, Prevention. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104:H21. 44:501–503, 1995.
- Cimolai N, Carter JE, Morrison BJ, Anderson JD. Risk factors for the progression of *Escherichia coli* O157:H7 enteritis to haemolytic-uraemic syndrome. *J Pediatr.* 116, 589–592, 1990.
- Cobeñas CJ, Alconcher LF, Spizzirri AP, Rahman RC. Long-term follow-up of Argentinean patients with hemolytic uremic syndrome who had not undergone dialysis. *Pediatr Nephrol.* 22, 1343–1347, 2007
- Cornick NA, Booher SL, Moon HW. Intimin facilitates colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in adult ruminants. *Infect Immun.* 70:2704–2707, 2002.
- Croxen MA and Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 8:26 –38, 2010.
- De Toni F, de Souza, EM, Pedrosa FO, Klassen G, Irino K, Un Rigo L, Steffens MB, Fialho OB, Farah SM, Fadel-Picheth C.M. A prospective study on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Paraná State, Brazil. *Lett Appl Microbiol.* 48: 645-647, 2009.
- Deacon V, Dziva F, van Diemen PM, Frankel G, Stevens MP. Efa-1/LifA mediates intestinal colonization of calves by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O26 : H-in a manner independent of glycosyltransferase and cysteine protease motifs or effects on type III secretion. *Microbiology.* 156:2527–2536, 2010.
- Dong T and Schellhorn HE. Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933 *BMC Genomics.* 10:349, 2009.
- Donohue-Rolfe A and Keusch GT. Shigella dysenteriae 1 cytotoxin: periplasmic protein releasable by polymyxin B and osmotic shock. *Infect. Immun.* 39, 270–274, 1983.

- Donohue-Rolfe A, Jacewicz M, Keusch GT. Isolation and characterization of functional Shiga toxin subunits and renatured holotoxin. *Mol Microbiol.* 3, 1231–1236, 1989.
- Doyle ME, Archer J, Kaspar CW, Weiss R. Human illness caused by *E. coli* O157:H7 from food and non-food sources. FRI Briefings CDC. *Escherichia coli* O157:H7; November, 2006.
- Drasar, BS and Hill MJ. Human intestinal flora. Londres: Academic Press Ltd. 36-43, 1974.
- Endo Y, Tsurugi K, Yutsudo T, Takeda Y, Ogasawara T, Igarashi K. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur J Biochem.* 171, 45–50, 1988.
- Feng Y, Yu S, Lasell TK, Jadhav AP, Macia E, Chardin P, Melancon P, Roth M, Mitchison T, Kirchhausen T. Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 6469–6474, 2003.
- Feng, Y, Jadhav AP, Rodighiero C, Fujinaga Y, Kirchhausen T, Lencer WI. Retrograde transport of cholera toxin from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum requires the trans-Golgi network but not the Golgi apparatus in Exo2-treated cells. *EMBO Rep.* 5, 596–601, 2004.
- Foster JW. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol.* 2:898–907, 2004.
- Franzolin MR, Alves RC, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100: 359-363, 2005.
- Fraser ME, Chernaia MM, Kozlov YV, James MN. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nature Struct Biol.* 1, 59–64, 1994.

- Fratamico PM, Yan X, Caprioli A, Esposito G, Needleman DS, Pepe T, Tozzoli R, Cortesi ML, Morabito S. The complete DNA sequence and analysis of the virulence plasmid and of five additional plasmids carried by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26:H11 strain H30. *Int J Med Microbiol.* 301:192–203, 2011.
- Frenzen PD, Drake A, Angulo FJ. The Emerging Infections Program Foodnet Working Group. Economic Cost of Illness Due to *Escherichia coli* O157 Infections in the United States. *J Food Prot.* 68(12):2623-2630, 2005.
- Friedrich AW, Lu S, Bielaszewska M, Prager R, Bruns P, Xu JG, Tschäpe H, Karch H. Cytotoxic distending toxin in *Escherichia coli* O157:H7: spectrum of conservation, structure, and endothelial toxicity. *J Clin Microbiol.* 44:1844–1846, 2006.
- Gal-Mor O, Finlay BB. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cell. Microbiol.* 8:1707-1719, 2006.
- Gao X, Wan F, Mateo K, Callegari E, Wang D, Deng W, Puente J, Li F, Chaussee MS, Finlay BB, Leonardo MJ, Hardwidge PR. Bacterial effector binding to ribosomal protein S3 subverts NF- $\kappa$ B function. *PLoS Pathog* 5:e1000708, 2009.
- Garrity GB, Don J, Krieg NR, Staley JT. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Proteobacteria.* New York, NY: Springer; 2. 2005.
- Gobert AP, Coste A, Guzman CA, Vareille M, Hindré T, de Sablet T, Girardeau JP, Martin C. Modulation of chemokine gene expression by Shiga-toxin producing *Escherichia coli* belonging to various origins and serotypes. *Microbes Infect.* 10:159–165, 2008.
- Gould LH, Demma L, Jones TF, Hurd S, Vugia DJ, Smith K, Shiferaw B, Segler S, Palmer A, Zansky S, Griffin PM. Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157:H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000-2006. *Clin Infect Dis.* 49(10):1480-1485, 2009.
- Grys TE, Siegel MB, Lathem WW, Welch RA. The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* 73:1295–1303, 2005.

- Guth BEC, Lopes de Souza R, Vaz TM, Irino K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 8: 535, 2002.
- Guth BEC, Ramos SR, Cerqueira AM, Andrade JR, Gomes TA. Phenotypic and genotypic characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from children in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97: 1085-1089, 2002.
- Guth BEC, Vaz TM, Gomes TA, Chinarelli SH, Rocha MM, de Castro AF, Irino K. Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. *J Med Microbiol.* 54: 805-806, 2005.
- Guth, BEC, Prado V, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: Alfredo G Torres (ed). *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Bentham Science Publishers : p65-83, 2010
- Habdas BJ, Smart J, Kaper JB, Sperandio V. The LysR-type transcriptional regulator QseD alters type three secretion in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and motility in K-12 *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 192:3699–3712, 2010.
- Hale TL and Formal SB. Cytotoxicity of *Shigella dysenteriae* 1 for cultured mammalian cells. *Am J Clin Nutr.* 33, 2485-2490, 1980.
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 8:11–22, 2001.
- Head SC, Karmali MA, Lingwood CA. Preparation of VT1 and VT2 hybrid toxins from their purified dissociated subunits. Evidence for B subunit modulation of a subunit function. *J Biol Chem.* 266, 3617-3621, 1991.
- Hemrajani C, Berger CN, Robinson KS, Marchès O, Mousnier A, Frankel G. NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during

enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Proc Natl Acad Sci USA 107:3129–3134, 2010.

- Hemrajani C, Marches O, Wiles S, Girard F, Dennis A, Dziva F, Best A, Phillips AD, Berger CN, Mousnier A, Crepin VF, Kruidenier L, Woodward MJ, Stevens MP, La Ragione RM, MacDonald TT, Frankel G. Role of NleH, a type III secreted effector from attaching and effacing pathogens, in colonization of the bovine, ovine, and murine gut. Infect Immun 76:4804–4813, 2008.
- Herold S Paton JC, Paton AW. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic *Escherichia coli* O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. Infect Immun. 77:3234–3243, 2009.
- Herold S, Karch H, Schmidt H. Shiga toxin-encoding bacteriophages – genomes in motion. Int J Med Microbiol. 294, 115–121, 2004.
- Heymann DL. Control of Communicable Diseases Manual, Diarrhea caused by *Escherichia coli*, 18th Edition, 160-162, 2004.
- Ho TD, Davis BM, Ritchie JM, Waldor MK. Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. Infect Immun. 76:1858–1865, 2008.
- Huguet J, Huapaya B, Salazar, E. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* Enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. Rev Peru Med Exp. 19(2):63-67, 2002.
- Irino K, Vaz TM, Kato MA, Naves ZV, Lara RR, Marco ME, Rocha MM, Moreira TP, Gomes TA, Guth BE. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. Emerg Infect Dis. 8: 446-447, 2002.
- Irino K, Vaz TM, Medeiros MI, Kato MA, Gomes TA, Vieira MA, Guth BE. Serotype diversity as a drawback in the surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Brazil. J Med Microbiol. 56: 565-567, 2007.

- Jacewicz, M, Clausen H, Nudelman E, Donohue-Rolfe A, Keusch GT. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea. XI. Isolation of a *Shigella* toxin-binding glycolipid from rabbit jejunum and HeLa cells and its identification as globotriaosylceramide. *J Exp Med.* 163, 1391–1404, 1986.
- Jackson MP, Newland JW, Holmes RK, O'Brien AD. Nucleotide sequence analysis of the structural genes for Shiga-like toxin I encoded by bacteriophage 933J from *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 2, 147-153, 1987.
- Janka A, Bielaszewska M, Dobrindt U, Greune L, Schmidt MA, Karch H. Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H- and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun.* 71:3634-3638, 2003.
- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:7839-7843, 1990.
- Johannes L and Römer W. Shiga toxins from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology.* 8(2): 105-116, 2010.
- Ju W, Shen J, Toro M, Zhao S, Meng J. Distribution of pathogenicity islands OI-122, OI-43/48, and OI-57 and a high-pathogenicity island in Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 79(11):3406-3412, 2013.
- Judge NA, Mason HS, O'Brien AD. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. *Infect Immun.* 72:168–175, 2004.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev Microbiol.* 2, 123-140, 2004.
- Karmali MA, Lingwood CA, Petric M, Brunton J, Gyles C. Maintaining the existing phenotype nomenclatures for *E. coli* cytotoxins. *ASM News.* 62:167-169, 1996.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. Association of genomic O island 122 of

*Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol. 41:4930-4940, 2003.

- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol. 41:4930-4940, 2003
- Karmali MA, Steele BT, Petric M, Lim, C. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. Lancet. 1:619-620, 1983.
- Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol. 2:15-38, 1989.
- Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 2, 15-38, 1989.
- Karmali MA. Prospects for Preventing Serious Systemic Toxic Complications of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections Using Shiga Toxin Receptor Analogues. J Infect Dis. 189(3):355-9, 2004.
- Kendall MM, Rasko DA, Sperandio V. The LysR-type regulator QseA regulates both characterized and putative virulence genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Mol Microbiol. 76:1306–1321, 2010.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. Cell. 91:511–520, 1997.
- King T, Lucchini S, Hinton JC, Gobius K. Transcriptomic analysis of *Escherichia coli* O157:H7 and K-12 cultures exposed to inorganic and organic acids in stationary phase reveals acidulant-and strain-specific acid tolerance responses. Appl Environ Microbiol. 76:6514–6528, 2010.

- Kitov PI, Sadowska JM, Mulvey G, Armstrong GD, Ling H, Pannu NS, Read RJ, Bundle DR. Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature*. 403(6770): 669-672, 2000.
- Kojima Y, Fukumoto S, Furukawa K, Okajima T, Wiels J, Yokoyama K, Suzuki Y, Urano T, Ohta M, Furukawa K. Molecular cloning of globotriaosylceramide/CD77 synthase, a glycosyltransferase that initiates the synthesis of globo series glycosphingolipids. *J Biol Chem*. 275, 15152-15156, 2000.
- Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 18:775–779, 1977.
- Kresse AU, Rienäcker I, Valle AM, Steinrück H, Claus H, Payne SM, Tschäpe H, Williams PH, Reissbrodt R. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 and non-O157 serovars differ in their mechanisms for iron supply. *Int J Med Microbiol*. 297:9–15, 2007.
- Ladner RC, Sato AK, Gorzelany J, de Souza M. Phage display-derived peptides as therapeutic alternatives to antibodies. *Drug Discov Today*. 9(12):525-529, 2004.
- Larocca D, Burg MA, Jensen-Pergakes K, Ravey EP, Gonzalez AM, Baird A. Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery. *Curr Pharm Biotechnol*. 3, 45–57, 2002.
- Lederberg J. *E. coli* K-12. *Microbiology Today*. 34:118, 2004.
- Ledesma MA, Ochoa SA, Cruz A, Rocha-Ramirez LM, Mas-Oliva J, Eslava CA, Girón JA, Xicohtencatl-Cortes J. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *PLoS ONE*. 5:12127, 2010.
- Levine, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis*. 155:377-389, 1987.
- Lewin, B. *Genes VII*. Oxford: Oxford University Press. 2000.

- Lindberg AA, Brown JE, Strömberg N, Westling-Ryd M, Schultz JE, Karlsson KA. Identification of the carbohydrate receptor for Shiga toxin produced by *Shigella dysenteriae* type 1. *J Biol Chem.* 262, 1779-1785, 1987.
- Ling H, Boodhoo A, Hazes B, Cummings MD, Armstrong GD, Brunton JL, Read RJ. Structure of the shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry.* 37, 1777-1788, 1998.
- Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, De Grandis S, Karmali M. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin in vitro. *J Biol Chem.* 262, 8834-8839, 1987.
- Lingwood CA. Glycolipid receptors for verotoxin and *Helicobacter pylori*: role in pathology. *Biochim Biophys Acta* 1455, 375-386, 1999.
- Makino K, Ishii K, Yasunaga T, Hattori M, Yokoyama K, Yutsudo CH, Kubota Y, Yamaichi Y, Iida T, Yamamoto K, Honda T, Han CG, Ohtsubo E, Kasamatsu M, Hayashi T, Kuhara S, Shinagawa H. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. *DNA Res.* 5:1-9, 1998.
- Mangeney M, Richard Y, Coulaud D, Tursz T, Wiels J. CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol.* 21, 1131-114, 1991.
- McKee ML, Melton-Celsa AR, Moxley RA, Francis DH, O'Brien AD. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEP-2 cells. *Infect Immun.* 63:3739-3744, 1995.
- Melton-Celsa A, Mohawk K, Teel L, O'Brien A. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 357:67-103, 2012.
- Melton-Celsa AR, Robinson CM, Smith MJ, O'Brien AD. Shiga toxins (Stxs): multifaceted pathogenicity determinants. In: Brogden KA, Minion FC, Cornick N, Stanton TB, Zhang Q, Nolan LK, Wannemuehler MJ (eds) *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 4th edn. ASM Press, Washington, DC, 239–251, 2007.

- Melton-Celsa AR, Smith MJ, O'Brien AD. Shiga toxins: potent poisons, pathogenicity determinants, and pharmacological agents. In: Curtiss III R (ed) *EcoSal-Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology (Online), 2nd edn. ASM Press, Washington, D.C, 2005.
- Miller DJ, Ravikumar K, Shen H, Suh JK, Kerwin SM, Robertus JD. Structure-based design and characterization of novel platforms for ricin and Shiga toxin inhibition. *J Med Chem.* 45, 90–98, 2002.
- Miller SI, Kukral AM, Mekalanos JJ. A two-component regulatory system (phoP phoQ) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc Nat Acad Sci USA.* 86:5054–5058, 1989.
- Mohawk KL and O'Brien AD. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and Shiga toxin injection. *J Biomed Biotechnol.* 2011: 2581-2085, 2011.
- Mukherjee J, Chios K, Fishwild D, Hudson D, O'Donnell S, Rich SM, Donohue-Rolfe A, Tzipori, S. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun.* 70, 612-619, 2002.
- Mukherjee J, Chios K., Fishwild D, Hudson D, O'Donnell S, Rich SM, Donohue-Rolfe A, Tzipori, S. Production and characterization of protective human antibodies against Shiga toxin 1. *Infect Immun.* 70, 5896–5899, 2002.
- Mullen LM, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Henderson B. Phage display in the study of infectious diseases. *Trends Microbiol.* 14(3):141-7, 2008.
- Mulvey GL, Marcato P, Kitov PI, Sadowska J, Bundle DR, Armstrong GD. Assessment in mice of the therapeutic potential of tailored, multivalent Shiga toxin carbohydrate ligands. *J Infect Dis.* 187, 640-649, 2003.
- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11:142-201, 1998.

- Neely MN and Friedman DI. Functional and genetic analysis of regulatory regions of coliphage H-19B: location of shiga-like toxin and lysis genes suggest a role for phage functions in toxin release. *Mol Microbiol.* 28, 1255-1267, 1998.
- Neidhardt FC. *Escherichiacoli and Salmonella: cellular and molecular Biology.* 2da ed. Washington D.C.: ASM Press; 1999.
- Nishikawa K, Matsuoka K, Kita E, Okabe N, Mizuguchi M, Hino K, Miyazawa S, Yamasaki C, Aoki J, Takashima S, Yamakawa Y, Nishijima M, Terunuma D, Kuzuhara H, Natori YA. Therapeutic agent with oriented carbohydrates for treatment of infections by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 7669-7674, 2002.
- O'Brien AD, Karmali MA, Scotland SM. A proposal for rationalization of the *Escherichia coli* cytotoxins. In *Recent advances in verocytotoxin-producing Escherichia coli infections*, Elsevier Science, B. V., Amsterdam, Netherlands, 147–149, 1994.
- Olofsson L, Ankarloo J, Andersson PO, Nicholls IA. Filamentous bacteriophage stability in non-aqueous media. *Chem Biol.* 8,661-671, 2001.
- Orlandi PP, Magalhães GF, Matos NB, Silva T, Penatti M, Nogueira PA, Silva LH. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Braz J Med Biol Res.* 39: 507-17, 2006.
- Paton AW, Bddoe T, Thorpe CM, Whisstock JC, Wilce MCJ, Rossjohn J, Talbot UM, Paton JC. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature.* 443:548-552, 2006.
- Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nature Med.* 6, 265-270, 2000.
- Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative

Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun 69:6999-7009, 2001.

- Paton JC and Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev. 11:450-479, 1998.
- Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Pósfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature. 409:529-533, 2001.
- Pinyon, RA, Paton JC, Paton AW, Botten JA, Morona R. Refinement of a therapeutic Shiga toxin-binding probiotic for human trials. Infect Dis. 189, 1547–1555, 2004.
- Prado JV, Cavagnaro SMF, Grupo de Estudio de Infecciones por STEC. Hemolytic uremic syndrome associated to shigatoxin producing *Escherichia coli* in Chilean children: clinical and epidemiological aspects. Rev Chilena Infectol. 25(6):435-444, 2008.
- Prado JV, Cavagnaro SMF, Grupo de Estudio de Infecciones por STEC. Síndrome hemolítico urémico asociado a infección intestinal por *Escherichia coli* productora de shigatoxina (STEC) en pacientes chilenos: aspectos clínicos y epidemiológicos. Rev Chil Infect. 25 (6): 435-444, 2008.
- Puttamreddy SN, Cornick A, Minion FC. Genome-wide transposon mutagenesis reveals a role for pO157 genes in biofilm development in *Escherichia coli* O157:H7 EDL933. Infect Immun. 78(6):2377-2384, 2010.
- Rahal EA, Kazzi N, Kanbar A, Abdelnoor AM, Matar GM. Role of rifampicin in limiting *Escherichia coli* O157:H7 Shiga-like toxin expression and enhancement of survival of infected BALB/c mice. Int J Antimicrob Agents. 37(2): 135-139, 2011.

- Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis.* 11(4):603-9, 2005.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med.* 308:681-685, 1983.
- Ritchie JM, Thorpe CM, Rogers AB, Waldor MK. Critical roles for stx2, eae, and tir in enterohemorrhagic *Escherichia coli* induced diarrhea and intestinal inflammation in infant rabbits. *Infect Immun* 71:7129–7139, 2003.
- Rivas M, Miliwebsky ES, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Síndrome urémico hemolítico: asociación con la infección por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Medicina.* 66 (III): 27–32, 2006.
- Rivas, M. Simpósio: Síndrome Urémico Hemolítico. 2° Congreso Argentino de Nefrología Pediátrica. Sociedad Argentina de Pediatría, Buenos Aires, Argentina, 2003.
- Saenz JB, Doggett TA, Haslam DB. Identification and characterization of small molecules that inhibit intracellular toxin transport. *Infect Immun.* 75, 4552-4561, 2007.
- Saenz JB, Sun WJ, Chang JW, Li J, Bursulaya B, Gray NS, Haslam DB. Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. *Nature Chem Biol.* 5, 157–165, 2009.
- Sánchez AA, Navarro RB, Márquez RF, Quintana MF, Pérez LS, Guilarte OD, Martínez HB, Bello LM. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates from children in Cuba. *Pediatr Infect Dis J.* 27(12): 1122-1123, 2008.
- Sánchez S, Romecín P, Guachalla LM, Iñiguez V. Caracterización geno-fenotípica de aislados de *Escherichia coli* (AEEC) de pacientes pediátricos con procesos diarreicos infecciosos en la ciudad de La Paz: Implicancias para el diagnóstico y epidemiología de las enfermedades diarreicas agudas. *Rev Chil Pediatr.* 77(4): 412-427, 2006.

- Saxena SK, O'Brien AD, Ackerman EJ. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28 S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 264, 596-601, 1989.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 17:7-15, 2011.
- Schmitt CK, McKee ML, O'Brien AD. Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. *Infect Immun.* 59: 1065-1073, 1991.
- Sheng H, Lim JY, Knecht HJ, Li J, Hovde CJ. Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infect Immun.* 74:4685-4693, 2006.
- Sinclair JF and O'Brien A.D. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem.* 277:2876-2885, 2002.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 228, 1315-1317, 1985.
- Souza RL, Carvalhaes JTA, Nishimura LS, de Andrade MC, Guth CBE. Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. *Open Microbiology Journal.* 5(1): 76-82, 2011.
- Souza RL, Nishimura LS, Guth BEC. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil – Case Report. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 59: 223-5, 2007.
- Spooner RA, Watson P, Smith DC, Boal F, Amessou M, Johannes L, Clarkson GJ, Lord JM, Stephens DJ, Roberts LM. The secretion inhibitor Exo2 perturbs trafficking of Shiga toxin between endosomes and the trans-Golgi network. *Biochem J.* 414, 471-484, 2008.

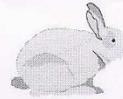
- St. Hilaire PM, Boyd MK, Toone EJ. Interaction of the Shiga-like toxin type 1 B-subunit with its carbohydrate receptor. *Biochemistry*. 33, 14452-14463, 1994.
- Stein PE, Boodhoo A, Tyrrell GJ, Brunton JL, Read RJ. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. *Nature*. 355, 748-750, 1992.
- Tarr PI, Bilge SS, Vary JC Jr, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun*. 68:1400-1407, 2000.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet*. 365, 1073–1086, 2005.
- Tesh VL, Burris JA, Owens JW, Gordon VM, Wadolkowski EA, O'Brien AD, Samuel JE. Comparison of the relative toxicities of Shiga-like toxins type I and type II for mice. *Infect Immun*. 61, 3392-3402, 1993.
- Teunis P, Ogden FID, Strachan NJ. Hierarchical dose response of *E. coli* O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. *Epidemiol Infect*. 136:761-770, 2008.
- Tilden JJ, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, Majkowski J, Vugia D, Werner SB, Hollingsworth J, Morris JG. Jr. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health*. 86:1142-1145, 1996.
- Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:14941-14946, 2006.
- Toma C, Martinez EE, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 42:4937-4946, 2004.

- Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73:18-29, 2005.
- Trachtman H, Cnaan A, Christen E, Gibbs K, Zhao S, Acheson DW, Weiss R, Kaskel FJ, Spitzer A, Hirschman GH. Investigators of the HUS-SYNSORB Pk Multicenter Clinical Trial. Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated haemolytic uraemic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA*. 290, 1337–1344, 2003.
- Tree JJ, Wolfson EB, Wang D, Roe AJ, Gally DL. Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 17:361-370, 2009.
- Tyler JS, Mills MJ, Friedman DI. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. *J Bacteriol*. 186, 7670–7679, 2004.
- Unkmeir A and Schmidt H. Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect Immun*. 68, 4856-4864, 2000.
- Vaz TMI, Irino K, Kato MA, Dias AM, Gomes TA, Medeiros MI, Rocha MM, Guth BE. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol*. 42:903-905, 2004.
- Waddell T, Cohen A, Lingwood CA. Induction of verotoxin sensitivity in receptor-deficient cell lines using the receptor glycolipid globotriosylceramide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87, 7898-7901, 1990.
- Wagner PL, Livny J, Neely MN, Acheson DW, Friedman DI, Waldor MK. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol*. 44, 957–970, 2002.
- Walters M and Sperandio V. Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol*. 296:125-131, 2006.

- Walterspiel JN, Ashkenazi S, Morrow AL, Cleary TG. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on extracellular Shiga-like toxin I. *Infection*. 20, 25-29, 1992.
- Watanabe H, Wada A, Inagaki Y, Itoh K, Tamura K. Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan. *Lancet*. 348:381-2, 1996.
- Watanabe M, Matsuoka K, Kita E, Igai K, Higashi N, Miyagawa A, Watanabe T, Yanoshita R, Samejima Y, Terunuma D, Natori Y, Nishikawa K. Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. *J Infect Dis*. 189, 360–368, 2004.
- WHO. Factsheet on Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/print.html> accessed on 22 January, 2008.
- Yen H, Ooka T, Iguchi A, Hayashi T, Sugimoto N, Tobe T. NleC, a type III secretion protease, compromises NF- $\kappa$ B activation by targeting p65/RelA. *PLoS Pathog* 6:e1001231, 2010.
- Yin X, Chambers JR, Wheatcroft R, Johnson RP, Zhu J, Liu B, Gyles CL. Adherence of *Escherichia coli* O157:H7 mutants in vitro and in ligated pig intestines. *Appl Environ Microbiol* 75:4975-4983, 2009.
- Zansky S and Griffin PM. Hemolytic uremic syndrome and death in persons with *Escherichia coli* O157:H7 infection, foodborne diseases active surveillance network sites, 2000-2006. *Clin Infect Dis*. 49:1480-1485, 2009.
- Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, Hu Y, Sa SM, Gong Q, Abbas AR, Modrusan Z, Ghilardi N, de Sauvage FJ, Ouyang W. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med*. 14:282-289, 2008.



UNICAMP



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

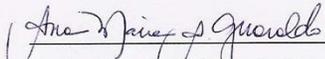
**CERTIFICADO**

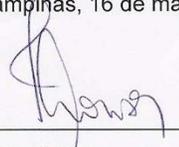
Certificamos que o Protocolo nº **1780-1**, sobre "**Obtenção de peptídeos com capacidade inibitória da ação citotóxica das toxinas Stx de Escherichia coli a partir de bibliotecas de PhageW Display**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Tomomasa Yano / Robert Alvin Bernedo Navarro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **16 de março de 2009**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1780-1**, entitled "**\_\_\_\_\_**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **March 16, 2009**.

Campinas, 16 de março de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva