

HELOISA HELENA MITHIE DELLA COLLETA



**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FATOR
NECROSANTE CITOTÓXICO DO TIPO 2 (CNF 2)
PRODUZIDO POR *Escherichia coli***

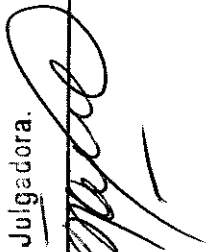
**Tese de Mestrado apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de
Mestre em Ciências Biológicas, na Área de
Microbiologia.**

**CAMPINAS, SP
1997**

HELOISA HELENA MITHIE DELLA COLLETA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO FATOR
NECROSANTE CITOTÓXICO DO TIPO 2 (CNF 2)**

PRODUZIDO POR *Escherichia coli*

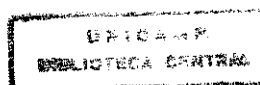
Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato a	Helouisa Helena Mithie Della Colleta
e aprovada pela Comissão Julgadora.	

2410197

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Tomomasa Yano

**CAMPINAS, SP
1997**



9812.667

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/Unicamp
	D38p
V. Ex.	
TOMBO BC/	34009
PROG.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	28/05/98
N.º CPD	

CM-00111368-0

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

D38p Della Colleta, Heloisa Helena Mithie
 Purificação e caracterização do fator necrosante citotóxico do tipo 2
 (CNF 2) produzido por *Escherichia coli* / Heloisa Helena Mithie Della
 Colleta. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
 103f. illus.

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

1. *Escherichia coli*. 2. Toxina. I. Yano, Tomomasa. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 24 de outubro de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Tomomasa Yano (orientador)



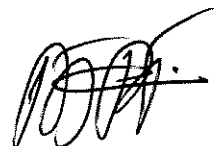
assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



assinatura

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira



assinatura

SUPLENTE:

Profª. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura


assinatura

Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas e contou com o auxílio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao meu pai, Paulo, por todas as
oportunidades que me ofereceu e pelos
inestimáveis ensinamentos de vida.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela orientação e amizade, por todos os ensinamentos e por sempre ter buscado e oferecido oportunidades para que este trabalho fosse concluído.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela participação na banca examinadora, pelas sugestões que sempre fez no decorrer do trabalho e por ter me ensinado os primeiros passos na Microbiologia, ainda como estagiária na graduação.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantini Ferreira, por participar da banca examinadora.

À Profa. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura, pelas valiosas sugestões na banca examinadora, pela amizade e por sempre estar disposta a auxiliar na soluções de algumas dificuldades.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho, pelas importantes e cuidadosas sugestões na banca examinadora, pela disposição em me auxiliar no final deste trabalho e principalmente pela oportunidade de nos tornarmos amigos.

À Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti, pela amizade, pela participação constante neste trabalho, pelo interesse e ensinamentos sempre oportunos, que em muito auxiliaram na minha formação.

À Profa. Dra. Wirla Tamashiro, por prestar auxílio e ceder seu espaço físico em algumas fases deste trabalho.

À Profª. Dra. Lucila Costallat Ricci, coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, pelo esforço dispendido na formação e realização deste curso.

Aos professores e colegas do Departamento de Microbiologia, pelo apoio e convivência durante esses anos.

À secretária do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Lúcia, pelo auxílio e cooperação e à secretária do Curso de Pós-Graduação, Lurdes, pela disposição na confecção cuidadosa de todos os ofícios necessários.

Aos amigos do laboratório do Prof. Domingos, Eliana, Luciana, Arlete, Geórgio, Douglas, Alex, Richard, Rodrigo, Juliana Farinacci, Rodrigo, Fabiana, Juliana Perri e Mônica, pela amizade, mas principalmente pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

Às amigas Valéria, Cleide, Márcia, Rosabel, Beth, Sílvia, Márcia Regina e Ana Cláudia, pelos momentos de convívio e pelas trocas de sugestões (e também frustrações), que engrandeceram os nossos trabalhos.

Aos amigos Silvério, Fernando, Ismar e Fabiana, pela amizade e pelas horas de descontração enquanto eu esperava “a hora” de entrar no fluxo.

Aos funcionários Alessandra, Stella, Erivaldo, Ana, Mirtis, Sandra, Rosângela, Carlos, Aírton e Chico por todos os inestimáveis auxílios prestados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

Ao Silvério, André, Edson e Hernandes pela disposição em tirarem cuidadosamente as fotos apresentadas neste trabalho.

À Mickie, pelas idéias e sugestões durante os processos cromatográficos, que em muito auxiliaram na purificação.

À Pan, pela grande amizade e companheirismo e por estar sempre presente em todos os momentos, não só nos mais difíceis como também nos momentos felizes de minha vida.

Ao Cláudio, meu amigo de tanto tempo, pelas inestimáveis e incansáveis sugestões e colaborações prestadas neste trabalho, mas principalmente por tudo o que é e representa para mim.

Aos meus queridos amigos Alexandre, João, Dante, Sibov, Giovanna, Dani, Juliana, Ana Cláudia e Marília, por estarem sempre presentes e por todos os momentos agradáveis que passamos.

Ao Lima, por sempre emprestar seu computador toda vez que o meu não queria funcionar, mas principalmente pela constante demonstração de carinho.

À todos os meus outros amigos, quer estejam distantes ou não, pela lembrança, sempre presente em nossas memórias.

À minha mãe, Mieke, pelo exemplo de força e coragem e que, mesmo sem ao menos imaginar o que eu faço no laboratório, sempre me apoiou.

Aos meus irmãos Cristina e Marcelo e aos pequenos Felipe e Paulinho, por tudo o que representam na minha vida.

Ao Johny, pelo carinho e amizade, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por constantemente me incentivar.

Ao meu querido irmão Rodrigo, por tudo o que era, é e sempre será para mim.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
OBJETIVOS.....	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
1. Amostras Bacterianas.....	21
2. Extração do Fator Necrosante Citotóxico do tipo 2 (CNF 2).....	21
2.1. Mitomicina C.....	21
2.2. Polimixina B.....	22
2.3. Ultra-som.....	22
2.4. “Freeze-thawing” (congelamento e descongelamento).....	23
3. Detecção de citotocinas em cultura de tecido.....	23
3.1. Preparo das culturas celulares.....	23
3.2. Ensaio do CNF 2.....	24
4. Purificação do CNF 2.....	24
4.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônia.....	24
4.2. Cromatografia em Q-Sepharose Fast Flow.....	25
4.3. Cromatografia em Superdex200.....	26
5. Determinação da concentração protéica.....	27
6. Eletroforese.....	27
6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	27
6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE).....	28
7. Caracterização sorológica do CNF 2.....	29
7.1. Produção de antissoros.....	29
7.1.1. Produção de antissoro em coelhos.....	29
7.1.2. Produção de antissoro em camundongos.....	30
7.2. Titulação do efeito neutralizante dos antissoros em células Vero.....	30
7.3. Imunodifusão radial dupla.....	31
7.4. Purificação da IgG de camundongo.....	32
7.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	33

7.5.1. Padronização do teste.....	33
7.5.2 Ensaio de ELISA.....	33
7.6. Western-blot”.....	34
7.7. “Dot-ELISA”.....	35
8. Caracterização biológica do efeito produzido por CNF 2.....	35
8.1. Ensaio em animais.....	35
8.1.1. Ensaio em pele de coelho (“rabbit skin test, RST”).....	35
8.1.2. Necrose em pata de camundongo.....	36
8.2. Teste de viabilidade celular em Vero e HeLa.....	36
8.3. Estudo dos efeitos do CNF 2 sobre células.....	37
8.3.1. Efeito de multinucleação celular.....	37
8.3.2. Identificação dos componentes do citoesqueleto.....	38
9. Estudo epidemiológico.....	39
9.1. Extração de citotoxinas.....	39
9.2. Produção de hemolisinas.....	39
RESULTADOS.....	41
1. Extração do Fator Necrosante Citotóxico 2 (CNF 2).....	41
2. Purificação do CNF 2.....	44
2.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônia.....	44
2.2. Cromatografia em Q-Sepharose Fast Flow.....	44
2.3. Cromatografia em Superdex 200.....	46
3. Eletroforese.....	48
3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).....	48
3.2. Eletroforese em gel de pliacrilamida denaturante (SDS-PAGE).....	48
4. Caracterização sorológica do CNF 2.....	51
4.1. Titulação do efeito neutralizante dos antissoros.....	51
4.2. Imunodifusão radial dupla.....	51
4.3. Purificação da IgG de camundongo.....	52
4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	55
4.5. “Western-blot”.....	56
4.6. “Dot-ELISA”.....	56
5. Caracterização biológica do efeito produzido por CNF 2.....	58

5.1. Ensaio em animais.....	58
5.1.1. Ensaio em pele de coelho.....	58
5.1.2. Necrose em pata de camundongo.....	58
5.2. Viabilidade celular	58
5.3. Estudo dos efeitos do CNF 2 sobre células.....	60
5.3.1. Efeito de multinucleação celular.....	60
5.3.2. Identificação dos componentes do citoesqueleto.....	64
6. Estudo epidemiológico.....	67
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Estudo comparativo dos métodos de extração de CNF 2 em células Vero.....	41
Tabela 2 - Purificação do CNF 2.....	46
Tabela 3 - Efeito neutralizante dos antissoros de coelhos e camundongos.....	51
Tabela 4 - Porcentagem de células Vero e HeLa viáveis após 24 horas tratamento com CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2 e LT I.....	59
Tabela 5 - Porcentagem de células multinucleadas após 8, 24 e 48 horas de tratamento.....	61
Tabela 6 - Produção de citotoxinas e hemolisinas em amostras isoladas de bezerros da região sudeste do Brasil.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito da atividade biológica do CNF 2 em células Vero, HeLa e CHO.....	43
Figura 2 - Perfil cromatográfico da eluição de CNF 2 em Q-Sepharose Fast Flow.....	45
Figura 3 - Perfil cromatográfico da eluição de CNF 2 em Superdex 200.....	47
Figura 4 - Perfil eletroforético de CNF 2 em PAGE.....	49
Figura 5 - Perfil eletroforético de CNF 2 em SDS-PAGE.....	50
Figura 6 - Imunodifusão radial dupla.....	53
Figura 7 - Perfil cromatográfico da eluição de IgG de camundongo em Sepharose-Proteína A.....	54
Figura 8 - “Dot-ELISA”.....	57
Figura 9 - Células Vero coradas com Azul de Toluidina.....	62
Figura 10 - Células HeLa coradas com Azul de Toluidina.....	63
Figura 11 - Marcação de filamentos de actina e tubulina em células Vero.....	65
Figura 12 - Marcação de filamentos de actina e tubulina em células HeLa.....	66

RESUMO

O Fator Necrosante Citotóxico do tipo 2 (CNF 2) foi obtido através do rompimento celular bacteriano por ultra-som. Após a extração, purificou-se o CNF 2 por precipitação com sulfato de amônia, cromatografia em resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow e em resina de gel filtração molecular Superdex 200. A atividade específica do CNF 2 purificado foi de 2.925 e o grau de pureza do material aumentou em torno de 8.000 vezes.

Ensaio de caracterização sorológica foram realizados com antissoros de coelho e camundongo. Os antissoros produzidos contra CNF 2 foram capazes de inibir o efeito citotóxico de CNF 1 e CNF 2, sendo que o título neutralizante foi maior contra o seu homólogo. Os antissoros, porém, não inibiram as atividades biológicas de VT 1, VT 2 e LT I. Em ensaios de imunodifusão radial, os antissoros reconheceram tanto CNF 1 como CNF 2, apresentando identidade parcial entre eles. Quando o antissoro foi absorvido com extrato sonificado de CNF 1, este passou a não mais reconhecer CNF 1. Nos ensaios de ELISA, “western-blot” e “dot-ELISA” os antissoros não se mostraram específicos, reconhecendo além de CNF 2, CNF 1, VT 1, VT 2 e LT I.

Foram realizados ensaios de caracterização do efeito biológico de CNF 2, que revelaram que esta toxina foi capaz de causar necrose em pele de coelho e em pata de camundongo. O efeito de multinucleação celular foi observado em células Vero e em células HeLa, sendo que em células Vero este efeito foi mais claramente observado; nas células HeLa foi possível observar aumento de células multinucleadas, que já eram observadas nos controles. Foi possível observar também, que a toxina leva ao acúmulo de

RNA nos núcleos e à formação de grandes vacúolos ao redor do núcleo. Em ensaios de marcação dos componentes do citoesqueleto, foi possível verificar que, após 8 horas de tratamento com CNF 2, as células apresentam alterações dos filamentos de actina, com formação de fibras de estresse. Esse efeito aumenta conforme o teste é prolongado. Quanto aos microtúbulos, não foram observadas alterações claras. Parece ocorrer apenas uma adaptação destes filamentos à presença de mais de um núcleo.

O estudo epidemiológico revelou que havia produção de CNF em 19,05% das amostras isoladas de fezes de bezerros e que, das amostras produtoras de CNF, 30,77% produziram também α -hemolisina.

INTRODUÇÃO

A espécie *Escherichia coli* está classificada como membro da família Enterobacteriaceae, sendo bactérias Gram negativas e anaeróbias facultativas. A bactéria *E. coli* é encontrada no homem e na maioria dos animais vertebrados, iniciando um processo de colonização do epitélio intestinal momentos após o nascimento, desempenhando importante papel na manutenção da microbiota intestinal (Drasar & Hill, 1974; Levine, 1987). Quando apresenta fatores de virulência, *E. coli* torna-se patogênica, geralmente causando infecções intestinais, tendo como quadro clínico diarreias agudas e disenteria (Sack, 1978; Blanco & González, 1985; Levine, 1987; Robins-Browne, 1987). *E. coli* pode também causar infecções extra intestinais no homem, como no trato urinário (cistite e pielonefrite) (Pechére, 1985; Johnson *et al.*, 1987a), trato pulmonar, meningites, peritonites, mamites (Blanco *et al.*, 1992c) e septicemia no homem (Ørskov & Ørskov, 1985). Em animais, *E. coli* pode também causar doenças entéricas como colibacilose bovina (Yano *et al.*, 1986; Blanco *et al.*, 1991a; Burnensa *et al.*, 1995) e suína (Bertschinger *et al.*, 1984) e infecções no trato respiratório em aves (Levine, 1984).

Kauffmann (1947) propôs uma forma de diferenciar *E. coli* a partir de seus antígenos de superfície. As *E. coli* apresentam antígenos na superfície celular: antígenos O (somáticos), K (capsulares) e H (flagelares). Atualmente são reconhecidos 173 antígenos O, 103 antígenos K e 56 antígenos H, que podem formar numerosas combinações entre si (Ørskov & Ørskov, 1985).

O estudo da presença de fatores de colonização, geralmente estruturas fimbriais de *E. coli*, responsáveis pela adesão da bactéria ao epitélio do hospedeiro, e a produção de toxinas protéicas são essenciais para a compreensão da sua patogenicidade, uma vez que para uma bactéria ser patogênica é necessário que ocorra uma combinação desses fatores de virulência.

Desta forma, por existir uma grande variedade de *E. coli* causadoras de doença, foi realizado um agrupamento com base nos mecanismos de patogenicidade destas bactérias. Atualmente as *E. coli* encontram-se classificadas nestes grupos: *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC); *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC); *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC); *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAggEC) e *Escherichia coli* com padrão de aderência difusa (DAEC). Mais recentemente González & Blanco (1989) propuseram um novo grupo para incluir as *Escherichia coli* produtoras de CNF (NTEC).

O amplo estudo da patogenicidade de *E. coli*, realizado em vários países, tem demonstrado a grande variação de mecanismos e fatores de virulência apresentado por essas bactérias. Assim, tem-se algumas toxinas que não estão agrupadas mas que de certa forma, apresentam importante papel na patogenia de homens e animais, como é o caso da Toxina Citoletal Distensora (CLDT) (Johnson & Lior, 1988) e de diferentes verotoxinas (O'Brien & Holmes, 1987).

As toxinas apresentam importante papel na patogenicidade das bactérias. Atualmente 3 grupos de citotoxinas estão bem caracterizados: toxinas termo-lábeis (LT) e toxinas termo-estáveis (ST), pertencentes ao grupo ETEC e verotoxinas (VT), pertencentes ao grupo EHEC.

A enterotoxina termo-estável (ST) resiste à temperatura de 100° C e é subdividida em STa (ST I) e STb (ST II), ambas não imunogênicas. A toxina STa está associada às doenças humanas e animais e apresenta massa molecular de 2 kDa (Dreyfus *et al.*, 1983; Thompson & Giannella, 1985). STa é solúvel em metanol, além de ser resistente às enzimas proteolíticas (Clements & Finkelstein, 1979), podendo ser identificada através do teste em camundongo recém nascido (Dean, 1972). A toxina STb por sua vez, está exclusivamente associada à diarreia em suínos, embora estudos recentes tenham demonstrado a presença de STb em casos de diarreia em humanos (Okamoto *et al.*, 1993). A toxina STb possui massa molecular de aproximadamente 5 kDa, sendo uma proteína insolúvel em metanol e sensível à tripsina, podendo ser identificada biologicamente através do teste em alça ligada de coelho (De, 1959).

A enterotoxina termo-lábil (LT) é inativada ao ser aquecida a 60°C por 15 minutos e também é subdividida em LT I e LT II. A LT I está associada às doenças tanto em humanos quanto em animais e está correlacionada sorologicamente com a toxina colérica, produzida pelo *Vibrio cholerae*, apresentando cerca de 80% na homologia da sequência protéica. LT I tem massa molecular entre 85 e 90 kDa e é codificada por um plasmídeo de alta massa molecular (Sears & Kaper, 1996). A identificação biológica de LT I pode ser realizada em testes em cultura de células, utilizando as linhagens Y-1 (Donta *et al.*, 1974), CHO (Guerrant *et al.*, 1974) e Vero (Speirs *et al.*, 1977) ou em alça ligada de intestino de coelho (De, 1959). A toxina LT II está associada somente aos animais e apresenta massa molecular de aproximadamente 87 kDa. A LT II está ainda subdividida em LT IIa e LT IIb, tendo como base de variação sua antigenicidade. Usando testes biológicos, LT II pode ser identificada através de aumento da permeabilidade celular em dorso de coelho (Sears & Kaper, 1996) e chega a ser cerca de 25 a 50 vezes mais potente

em ensaios utilizando cultura de tecido; no entanto, esta toxina não causa secreção em alça ligada de coelho (Holmes *et al.*, 1986).

As verotoxinas (VT) foram inicialmente descritas por Konowalchuk *et al.* (1977), sendo assim denominada por causarem efeito citotóxico em células Vero. As verotoxinas apresentam efeito muito semelhante à toxina produzida por *Shigella dysenteriae* ("Shiga-toxin"), inibindo a síntese protéica em células HeLa, sendo enterotóxicas em intestino de coelho e letais para camundongo. As verotoxinas são também subdivididas em VT 1 ou "Shiga-like" I (SLT I), cuja atividade citotóxica é completamente neutralizada pelo antissoro anti "Shiga-toxin", e VT 2 ou "Shiga-like" II (SLT II), que não apresenta reação sorológica cruzada com a "Shiga-toxin" (Gyles, 1992). Atualmente, novas citotoxinas que causam efeitos citotóxicos em células Vero têm sido descritas. Estas citotoxinas estão relacionadas à VT 2, tanto na homologia de sequência de aminoácidos quanto nas reações imunológicas cruzadas (Lindgren *et al.*, 1994) e são denominadas de verotoxinas variantes. Dentre as verotoxinas variantes, a melhor caracterizada é a VT IIv, responsável pela doença do edema em suínos (Marques *et al.*, 1987; MacLeod *et al.*, 1991).

As verotoxinas possuem massa molecular de aproximadamente 70 kDa e seus genes estão associados a bacteriófagos (Sears & Kaper, 1996).

Johnson & Lior (1987b) descreveram uma nova citotoxina, em amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com diarreia, que causava um alongamento nas células CHO após 24-48 horas de ensaio, mas que progredia para uma distensão das células (72-96 horas) e culminava com morte celular após 120 horas de ensaio. Esta toxina foi denominada de toxina citoletal distensora (CLDT)

A CLDT é de natureza protéica, termo-lábil, perdendo sua atividade biológica quando aquecida a 70°C por 15 minutos. Sua atividade pode ser observada em células Vero, HeLa, CHO e HEp-2, mas é inativa em células Y-1. As amostras produtoras de CLDT não apresentaram associação com produção de hemolisinas. CLDT também não apresentou atividade tanto em ensaios em alça ligada de coelho, quanto em teste de camundongo recém-nascido, gerando apenas uma reação eritematosa quando inoculada em dorso de coelho (Johnson & Lior, 1987b, 1988).

Embora a atividade de CLDT tenha sido descrita há pelo menos dez anos, ainda não se conhece os mecanismos pelos quais esta citotoxina causa alterações celulares *in vitro*. Pouco se sabe também da importância de CLDT na patogenicidade de *E. coli*. A descrição de CLDT em amostras isoladas de animais é bastante escassa. Faltam, assim, estudos epidemiológicos que caracterizem CLDT como um importante agente no papel de colibacilose animal.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Caprioli *et al.* (1983) estudaram a presença de enterotoxina termo-lábil (LT) em amostras de *E. coli* isoladas de fezes de crianças com diarreia aguda. O teste em cultura de células CHO com o sonicação dessas amostras, demonstrou que além de amostras produtoras de LT, algumas amostras induziam alterações celulares diferentes do que era observado para a toxina termo-lábil e para a verotoxina: as células ensaiadas com essas toxinas apresentaram um notável aumento celular e presença de mais de um núcleo. Além deste efeito celular citopático, todas estas amostras produziam hemolisina. Observaram também, que esta citotoxina não era liberada no meio de cultura, sendo necessário o rompimento celular por ultra-som ou a adição de Mitomicina C ao crescimento bacteriano. As amostras que produziram efeito citopático em células não acumularam líquido quando inoculadas em alça ligada de coelho e nem estimularam a adenil ciclase em células CHO. O soro anti-toxina colérica não neutralizou o efeito produzido por estas amostras e todas apresentaram resultados negativos no teste para enterotoxina termo-estável (ST).

Esta nova citotoxina, além de produzir efeitos citopáticos em CHO, foi ativa em células Vero e HeLa, com formação de células gigantes e multinucleadas. A substituição do meio de cultura das células após 6 horas da inoculação não impediu a ocorrência das alterações morfológicas nas três células testadas. As células HeLa foram mais sensíveis ao efeito desta citotoxina. Injeções intradérmicas dos extratos bacterianos no dorso de coelhos causaram uma área de endurecimento com necrose no centro. Inoculações subcutâneas no abdômen de cobaias provocaram uma grande reação

necrótica, com 50% dos animais morrendo nas primeiras 48 horas com quadro de hemorragia difusa. O aquecimento dos extratos bacterianos a 75°C por 15 minutos ou a 65°C por 1 hora inativaram a proteína, com consequente eliminação do efeito tóxico em células. Entretanto, a atividade citotóxica não foi alterada com a variação do pH entre 6 e 10,5. Esta nova citotoxina foi denominada de Fator Necrosante Citotóxico (CNF) (Caprioli *et al.*, 1983).

Caprioli *et al.* (1984) demonstraram que o CNF é uma proteína com massa molecular de 110 kDa. Todas as vezes em que eram encontradas amostras produtoras de CNF, era também verificada a produção de hemolisina pelas mesmas amostras, em porcentagens consideráveis, entre 40 e 60% (Caprioli *et al.*, 1987; Alonso *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1990a; Cherifi *et al.*, 1990). A associação de CNF com hemolisina não era estranha, uma vez que a maioria das amostras isoladas que apresentava CNF era proveniente de infecções extra intestinais, geralmente de trato urinário e por ser a hemolisina mais comumente encontrada em amostras isoladas de infecções extra intestinais.

Até então estavam sendo estudadas apenas amostras isoladas de casos de diarreia em humanos. Blanco *et al.* (1988), estudando a produção de toxinas em bezerros com diarreia, detectaram a presença de CNF em 18% das amostras bacterianas. Mais tarde, Blanco *et al.* (1993b) verificaram que o CNF era também produzido em alta porcentagem, por amostras isoladas de bezerros sem diarreia: 34% em animais sadios e 20% em animais com diarreia, sugerindo, assim, que as amostras de *E. coli* produtoras de CNF podem fazer parte da flora normal intestinal dos bezerros. Estudos mais recentes em gado bovino têm mostrado que o CNF é prevalente em animais sadios (30,9%), enquanto que somente 19,3% de animais com diarreia apresentam o CNF (Burns *et al.*, 1996).

Quando se passou a estudar amostras isoladas de animais, não foi mais verificada a associação de CNF com hemolisina ou, quando era verificada, estava sempre em porcentagens inferiores às encontradas em casos de diarreia em humanos (Oswald *et al.*, 1991).

No Brasil, existem poucos dados epidemiológicos a respeito de NTEC. Os dados existentes são de amostras de *E. coli* isoladas de casos de infecções do trato urinário e de crianças com diarreia. Estudos realizados com amostras de *E. coli* de crianças com diarreia, coletadas na região de Brasília, D.F., revelaram um índice de apenas 3,6% de amostras produtoras de CNF (Giugliano *et al.*, 1995).

A purificação desta nova citotoxina era um passo importante para o processo de caracterização do CNF. De Rycke *et al.* (1989) purificaram parcialmente CNF de origem humana, que também era produtora de hemolisina. Determinou-se que o CNF é uma proteína de 115 kDa, mas que poderia estar correlacionada com uma outra porção protéica de 59 kDa, que provavelmente não estaria envolvida na toxicidade do CNF. De Rycke *et al.* (1989) verificaram ainda que o CNF é produzido em baixas concentrações (cerca de 0,1% das proteínas totais produzidas) e que a atividade hemolítica está dissociada da atividade biológica do CNF.

Oswald *et al.* (1989) propuseram a existência de uma nova citotoxina de *E. coli* codificada pelo plasmídio Vir, que era letal para galinhas. O efeito citopático de Vir parecia morfológicamente distinto do efeito causado pelo Fator Necrosante Citotóxico de *E. coli*. Porém, ambas as citotoxinas foram parcialmente relacionadas imunologicamente. Esta provável nova citotoxina, foi denominada pelos autores como citotoxina Vir.

A citotoxina Vir foi relacionada a uma proteína de 110 kDa, presente em extratos sonicados do crescimento bacteriano. A toxina Vir apresentava como

característica do efeito biológico em células HeLa uma multinucleação com um aumento e alongamento celular, além de causar necrose em pata de camundongo. O efeito dessa toxina, apesar de ser semelhante ao efeito de CNF, não era exatamente o mesmo, além do CNF não causar necrose na pata de camundongo, promovendo apenas uma inflamação persistente. Em estudos de soroneutralização em células utilizando o antissoro anti-toxina Vir, verificou-se que este antissoro também neutralizava o efeito de multinucleação produzido por CNF, apesar de apresentar títulos neutralizantes de 4 a 8 vezes menores do que contra o seu homólogo. Nos ensaios de “imunoblot”, foi verificada a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 90 kDa, além da banda de 110 kDa, correspondente à citotoxina Vir (Oswald & De Rycke, 1990).

Os estudos em cultura de células com amostras de origem humana, bovina e suína demonstraram que todas as amostras causavam necrose em pele de coelho e multinucleação e aumento no tamanho celular. No entanto, quando essas citotoxinas foram ensaiadas em células HeLa, foi possível observar dois grupos distintos de toxicidade após 72 horas de incubação: o tipo 1, que caracterizava-se por produzir uma extensiva multinucleação das células, além de provocar aumento e arredondamento celular, e o tipo 2, que caracterizou-se por apresentar um pequeno índice de multinucleação, um aumento no tamanho celular, induzir alterações morfológicas das células e por uma pequena perda de viabilidade.

Os efeitos causados por extratos sonicados do tipo 2 foram produzidos por amostras de *E. coli* que apresentavam o plasmídio Vir. Após ensaios de soroneutralização foi observada uma reação cruzada entre essas duas amostras, sendo que o antissoro homólogo se mostrou de 16 a 64 vezes mais potente do que o antissoro heterólogo. Após os ensaios de soroneutralização, ficou evidente a existência de dois tipos de citotoxinas,

que foram, então, nomeadas de CNF 1 e CNF 2, de acordo com o efeito citopático que produziam em cultura de células HeLa. Em células Vero, porém, não foi possível a diferenciação clara desses dois tipos citotóxicos. Neste teste, ambos os Fatores Necrosantes Citotóxicos induziram multinucleação moderada, com aumento da refração celular e definição dos limites de cada célula (De Rycke *et al.*, 1990b).

Em ensaios em pele de coelho, o CNF 2 mostrou-se 10 vezes mais potente, enquanto que nos ensaios em pata de camundongo, inoculando-se a mesma concentração de proteína, o CNF 2 causou necrose na pata em 40 a 100% dos camundongos, e o CNF 1 não apresentou nenhum sinal de necrose. Nos testes de injeção intraperitoneal em camundongos, o CNF 2 mostrou-se letal e o CNF 1, apenas parcialmente letal, sendo que as mortes ocorreram dentro de 48 horas. Em ensaio de alça ligada, após 24 horas de incubação, os extratos de CNF 2 causaram um acúmulo de líquido significativo em pelo menos 50% das alças testadas, e o CNF 1 não causou acúmulo de líquidos. Entretanto, o acúmulo de líquido produzido por CNF 2 é muito menor do que o produzido por amostras controles de enterotoxina (De Rycke *et al.*, 1990b). Neste mesmo estudo, os autores puderam observar que, interessantemente, todas as amostras produtoras de CNF 2 eram de origem bovina, apesar de algumas amostras de origem bovina apresentarem produção de CNF1, assim como todas as amostras isoladas de humanos e suínos, que também eram produtoras de CNF 1. Nenhuma das amostras que produziram CNF 2 apresentaram resultados positivos para hemolisina.

Após a descoberta do segundo tipo de CNF, foram realizados estudos de associação de CNF 2 com outros fatores de virulência, a fim de se descrever melhor os mecanismos de patogenicidade de amostras produtoras de CNF 2. Cerca de 70% das amostras produtoras de CNF 2 estudadas por Oswald *et al.* (1991) produziram

aerobactina, 32% produziram colicina e 9% produziram hemolisina. Em ensaios de hibridização com sondas moleculares para LT IIa e F 17A, 9% das amostras produtoras de CNF 2 reagiram com a sonda para LT IIa e 53% reagiram com a sonda para F 17A. Quando foi realizado o teste de soroaglutinação para este mesmo fator de aderência, estas amostras não apresentaram resultados positivos, o que levou Oswald *et al.* (1991) a sugerirem que o fator de adesão Vir poderia ser uma variante da F 17, detectada pela sonda para F 17A.

Posteriormente, El Mazouari *et al.* (1994) demonstraram que uma subunidade da fimbria F 17, a F 17b, que é codificada pelo plasmídio Vir, é reconhecida pelo antissoro anti-F 17 em ensaios de “western-blot”, demonstrando, assim, a existência de epítomos comuns. A comparação da sequência nucleotídica demonstra que F 17b pertence à mesma família da fimbria F 17, encontradas em amostras de *E. coli* enterotoxigênicas. Assim, estabeleceu-se a relação entre a fimbria F17 e o CNF 2.

Desde a primeira descrição do CNF já se sabia que era necessário alguma forma de rompimento celular para que esta citotoxina fosse liberada do interior da célula bacteriana. Blanco *et al.* (1990b) demonstraram que a extração de CNF 1 e de CNF 2 por Mitomicina C é simples e eficiente. A praticidade deste tipo de extração tornou-se evidente na realização de estudos epidemiológicos, quando uma quantidade considerável de amostras precisam ser analisadas.

Um ensaio para a verificação de fermentação de L-sorbose foi também proposto como um método eficiente de detecção de amostras produtoras de CNF 1 e CNF 2, especialmente de CNF 1, quando associado à produção de hemolisina (Pohl *et al.*, 1993). Apesar de ter sido proposto como método de identificação de CNF 1 e CNF 2, esta metodologia não vem sendo usualmente empregada.

A necessidade de se estudar a presença de CNF em amostras de *E. coli* de campo isoladas de várias origens para determinar a prevalência do CNF, fez com que novos métodos para a detecção de CNF fossem propostos. Tabouret & De Rycke (1990) e Oswald *et al.* (1994a) propuseram o ensaio imunoenzimático - ELISA para a detecção de amostras produtoras de CNF. Ambos os autores determinaram que o ELISA é um método eficaz para a detecção de CNF, uma vez que em seus experimentos não ocorreram reações cruzadas com outras citotoxinas e que, a partir da relação positivo/negativo (P/N) foi possível encontrar um valor onde somente amostras produtoras de CNF 2 eram detectadas.

Além dos estudos da atividade biológica em células, em pele de coelho e na pata do camundongo, foram realizados experimentos *in vivo* em ovelhas e porcos para observar os efeitos que o CNF poderia causar nestes animais. De Rycke (1990a) observou que após a inoculação de CNF intravenosa de origem bovina em ovelhas, estes animais apresentavam sinais clínicos de diarreia mucóide após 12 horas de inoculação, com sinais de dores abdominais e rigidez das patas traseiras ao andar. Após 20 horas de inoculação, além da diarreia, os animais apresentaram sinais de deficiências neurológicas e convulsões. A diarreia mucóide persistiu por até 36 horas, quando, a partir daí, os animais apresentaram melhora significativa de seu estado geral.

As análises pós-morte dos animais tratados com CNF mostraram excessiva quantidade de fluido cérebro-espinhal, uma severa congestão dos vasos da meninge e presença de fezes mucóides em abundância no intestino. Em termos de lesões histológicas, foram encontradas numerosas microhemorragias no cérebro, principalmente nos animais que apresentaram sinais de deficiência neurológica, cujas lesões estavam localizadas principalmente na porção dorsolateral do tálamo. Macroscopicamente, o miocárdio dos

animais tratados com CNF apresentaram grandes e numerosas áreas de necrose. Nestas áreas de necrose, os miócitos apresentavam um aumento de eosinofilia, granulosidade do citoplasma e núcleos picnóticos. A necrose foi associada a um leve edema intersticial sendo que, ocasionalmente, também foram observados leucócitos polimorfonucleares nestas áreas de necrose (De Rycke, 1990a).

Infecções experimentais de amostras bacterianas de *E. coli* produtoras de CNF foram realizadas em porcos recém-nascidos. Inoculações com bactérias isoladas de porcos, que comprovadamente apresentavam atividade biológica de CNF, mostraram que após 18 horas de inoculação, a maioria dos animais apresentou diarreia aguda e em menor proporção disenteria e diarreias ocasionais. Inúmeras amostras produtoras de CNF foram coletadas após a morte dos animais através de “swab” retal e em estudos histopatológicos foram notadamente observadas algumas alterações, tais como danos nas microvilosidades do jejuno e íleo, presença de colitis pseudomembranosas e necrose na porção externa da lâmina própria. Foram também encontradas lesões nos pulmões, fígado e rins (Wray *et al.*, 1993).

Mais recentemente, vários estudos utilizando técnicas de biologia molecular têm sido realizados. Sondas moleculares (Oswald *et al.*, 1994b) e técnicas de PCR (Blanco *et al.*, 1996) foram produzidas para auxiliar nos processos de detecção dos fatores necrosantes.

A sonda molecular produzida por Oswald *et al.* (1994b) foi preparada a partir do gene *cnf2*. A sonda molecular apresentou 100% de especificidade e sensibilidade para CNF 2, enquanto que para CNF 1, a sonda apresentou 99% de especificidade e sensibilidade. Somente uma amostra produtora de CNF 1 não foi detectada pela sonda, enquanto que uma amostra não produtora de CNF 1 foi detectada. Uma vantagem da

utilização da sonda como método de detecção foi a possibilidade de verificar a co-produção de duas citotoxinas: VT e CNF 2. A amostra que causava morte celular em cultura de células reagiu positivamente para CNF. Quando a amostra foi neutralizada com o antissoro anti-VT, passou a apresentar os efeitos característicos de CNF na cultura de tecido.

Apesar do método de detecção por sonda molecular ser eficiente, faz-se necessária a utilização de radioisótopos. Assim, a técnica de PCR foi desenvolvida como um método de rápida detecção de CNF 1 e CNF 2 e com a segurança de não se usar radioisótopos.

Os estudos realizados com PCR mostraram que esta é uma técnica simples, que apresenta sensibilidade e especificidade, além de requerer pouco tempo técnico para a realização do ensaio, quando comparado às outras metodologias para a detecção de NTEC. Houve completa correlação entre os resultados obtidos através da técnica do PCR e os ensaios em células HeLa. O oligonucleotídeo utilizado distinguiu claramente CNF 1 de CNF 2, além de não apresentar reações cruzadas com amostras enterotoxigênicas, verotoxigênicas e não-toxigênicas (Blanco *et al.*, 1996).

A grande associação fenotípica de CNF 1 com hemolisina, que repetidamente vem sendo observada, possui respaldo em dados genéticos (Falbo *et al.*, 1992). Através de digestões enzimáticas do cromossomo da amostra que produz tanto CNF 1 como hemolisina, foi possível verificar a íntima ligação entre esses dois genes. O padrão idêntico, observado após a hibridização do DNA cromossômico com as sondas para CNF 1 e hemolisina, confirmam a ligação destes dois genes no cromossomo (Falbo *et al.* 1992). Os autores acreditam que poderia estar ocorrendo uma vantagem seletiva nas amostras

produtoras de CNF 1 e hemolisina, por esses dois fatores estarem agindo sinergicamente ou complementarmente.

Através de uma bactéria geneticamente transformada, que continha inserido em seu material genético apenas o gene responsável pela síntese de CNF 1, foi possível provar que a hemolisina não participa do processo de indução do efeito citopático causado em células tratadas com extratos de amostras produtoras de CNF 1 e hemolisina (De Rycke *et al.*, 1996).

Através do isolamento do gene *cnf1*, responsável pela produção de CNF 1, foi possível inferir a sequência protéica desta citotoxina. O gene *cnf1* corresponde a uma proteína de 1.014 aminoácidos, com peso molecular de 113,7 kDa, apresentando duas grandes extremidades laterais hidrofílicas e dois domínios subcentrais hidrofóbicos (Falbo *et al.*, 1993). A sequência do CNF 1 foi comparada com a sequência de outras proteínas, onde se verificou que havia homologia de 83 nucleotídeos com a região 3' terminal do operon de hemolisina de *E. coli* (Falbo *et al.*, 1993).

A partir da sequência protéica de CNF 1, foi possível identificar sequências homólogas de outras citotoxinas. Foram encontradas homologias com a toxina de *Pasteurella multocida* (PMT) (Falbo *et al.*, 1993) e com a toxina dermonecrótica produzida pelo gênero *Bordetella* (DNT) (Walker & Weiss, 1994). Existe uma grande região de homologia de CNF 1 com PMT e uma região homóloga de CNF 1 e DNT. Porém, a homologia de CNF 1 com DNT não ocorre na mesma região em que CNF 1 é homóloga à PMT. Não há, entretanto, homologia de DNT com PMT (Walker & Weiss, 1994).

A sequência protéica de CNF 2 foi também determinada a partir do isolamento do gene *cnf2*, que possui 3.045 nucleotídeos. A sequência nucleotídica de CNF

2 apresenta 85,7% de homologia com o CNF 1. O peso molecular do CNF 2 foi determinado em 114,659 kDa. Interessantemente, tanto CNF 1 como CNF 2 apresentam baixas concentrações do par CG em seus genes (36,5% e 35,3%, respectivamente). A comparação da sequência de aminoácido entre CNF 2 e PMT mostrou a presença de cerca de 27% de resíduos idênticos. Foram também encontradas homologias de sequência com hexoquinase B de *Saccharomyces cerevisiae* e com a enzima EpiB de *Staphylococcus epidermidis* (Oswald *et al.*, 1994c). O CNF 1 e CNF 2 apresentam alto índice de homologia com DNT na porção C-terminal, sugerindo que estas estruturas enzimáticas estejam intimamente relacionadas, com sítios de atividade que provavelmente são idênticos ou muito similares. A toxina de *Pasteurella multocida* (PMT), por sua vez, apresenta homologia com a porção N-terminal com o CNF (Lemichez *et al.*, 1997).

Recentemente foi verificada regiões de homologia entre CNF e CLDT através de sequências genéticas. Foi verificado ainda que a CLDT, assim como o CNF 1 e CNF 2, induz um bloqueio na fase G2 do ciclo mitótico levando à formação de células gigantes, porém, mononucleadas (Pérès *et al.*, 1997).

Atualmente, os estudos sobre CNF têm sido enfocados nas alterações do citoesqueleto (Fiorentini *et al.*, 1988; Oswald *et al.*, 1994c; Fiorentini *et al.*, 1995), no efeito de multinucleação celular (Fiorentini *et al.*, 1988) e nas alterações em nível de divisão celular (De Rycke *et al.*, 1996).

Muito se dizia a respeito da multinucleação celular causada por CNF, inclusive afirmando-se que a multinucleação causada por CNF 1 é muito mais expressiva do que a causada por CNF 2 (De Rycke *et al.*, 1990b). O primeiro estudo a demonstrar quantitativamente os efeitos de multinucleação provocado por CNF 1, foi o de Fiorentini *et al.* (1988), realizado em cultura de células HEp-2. A análise quantitativa revelou que nas

células controle, 96% das células são mononucleadas, cerca de 3% apresentam dois núcleos e apenas 1% apresentam 3 ou mais núcleos. Em contraste, as células tratadas com CNF 1, após 48 horas de ensaio, apresentavam 13% de células mononucleadas, 56% de células binucleadas e 31% de células com 3 ou mais núcleos.

Na observação das células HEp-2 tratadas com CNF 1 em microscópio eletrônico de varredura, as células, após 6 horas de contato com a toxina, exibem uma diminuição no número e encurtamento das microvilosidades, presentes em abundância nas células controle. Essas alterações tornam-se mais aparentes conforme o prolongamento do teste (Fiorentini *et al.*, 1988).

A marcação dos filamentos de actina através de faloidina permitiu que fossem observadas alterações na estrutura destes filamentos. Após 6 horas de tratamento com o CNF 1, as células HEp-2 apresentaram um acúmulo evidente dos filamentos de actina na borda das células. Após 24 horas de ensaio, as células apresentavam um aumento na formação de feixes espessos de actina, que pareciam rearranjados. Com 48 horas de ensaio, parte das células exibiam numerosos feixes espessos de filamentos de actina, que percorriam todo o comprimento da célula; em outras células, os feixes de actina estavam dispostos na periferia celular, formando uma complexa rede (Fiorentini *et al.*, 1993). Estes feixes de filamentos de actina é mais comumente conhecido como “stress fibers” ou fibras de estresse.

Os microtúbulos, outros componentes do citoesqueleto, também parecem ser afetados pelo CNF 1. Nas células tratadas, aparentemente há uma organização microtubular na região perinuclear, que parece estar associada com a segmentação do núcleo (Fiorentini *et al.*, 1988).

Células HEP-2 após 24 horas de incubação com o CNF 2 também apresentaram alterações nos filamentos de actina, com formação de filamentos longos e espessos (fibras de estresse), como o observado para CNF 1.

A organização dos filamentos de actina em células eucarióticas tem sido relacionada às proteínas Rho (Chardin *et al.*, 1989; Paterson *et al.*, 1990). Recentemente levantou-se a possibilidade de CNF 1 agir diretamente sobre as GTPases Rho (Fiorentini *et al.*, 1995). Através de experimentos bem caracterizados para a verificação das modificações nas GTPases Rho causadas por toxinas bacterianas, foi possível demonstrar que o CNF 1 age diretamente sobre estas proteínas, ativando, assim o processo de formação das fibras de estresse (Lemichiez *et al.*, 1997). Oswald *et al.* (1994c) propõem que o CNF 2 modifica covalentemente a estrutura da proteína Rho, o que faz com que essa proteína modificada seja funcionalmente hiperativa, quando comparada à proteína nativa.

Oswald *et al.* (1994c) propõem que tanto o CNF 1 quanto o CNF 2 podem bloquear a citocinese após a mitose, levando à formação de células multinucleadas em cultura. Funcionalmente, tanto as células que recebem bactérias produtoras de CNF 1, como as células que recebem o extrato bacteriano contendo CNF 1, apresentaram uma interrupção irreversível na fase G2 do ciclo celular, inibindo, assim, a proliferação celular. A diferença entre um tratamento e outro ocorreu apenas na maneira como a mitose foi afetada. Células que foram expostas à bactéria não iniciaram o processo de mitose, enquanto que as células que receberam o CNF 1 no extrato bacteriano tiveram todo o seu ciclo de mitose intacto, à exceção da citocinese. Essas diferenças, no entanto, podem explicar o fato de que células que são expostas à bactéria não apresentarem multinucleação celular.

Apesar das células que receberam a amostra bacteriana não apresentarem multinucleação celular, após 5 dias de tratamento os núcleos dessas células estavam completamente desintegrados, evidenciando grandes massas de cromatina condensada próximas à membrana nuclear, produzindo uma lesão similar à apoptose. Os núcleos apresentavam forma de feijão, envoltos por uma nítida área de coloração reduzida (De Rycke *et al.*, 1996).

Estudos realizados com a porção N-terminal e C-terminal do gene *cnf1* possibilitaram a determinação de algumas características da patogenicidade do CNF. Foi possível mostrar que a porção N-terminal do CNF 1 é responsável pela ligação da molécula de CNF 1 com o receptor celular em cultura de tecido. Por outro lado, a porção C-terminal do CNF 1 não foi capaz de desencadear o efeito de multinucleação celular nas células. No entanto, através de microinjeções da porção C-terminal em cultura de células HEp-2 foi demonstrado que esta porção é responsável pelo efeito de formação de fibras de estresse. A microinjeção da porção N-terminal não produziu nenhum efeito que modificasse a estrutura dos filamentos de actina (Lemichéz *et al.*, 1997).

OBJETIVOS

1. Purificar o Fator Necrosante Citotóxico do tipo 2 (CNF 2)
2. Caracterizar sorologicamente o CNF 2
 - 2.1. Estudos sorológicos de amostras produtoras de CNF 2 em testes como ELISA e “Dot-ELISA”
3. Caracterizar o efeito da atividade biológica do CNF 2
 - 3.1. Verificar ocorrência de perda de viabilidade das células Vero e HeLa tratadas com CNF 2
 - 3.2. Verificar o efeito de multinucleação celular em células Vero e HeLa
 - 3.3. Verificar alterações de citoesqueleto em células Vero e HeLa tratadas com CNF 2
4. Realizar estudos epidemiológicos em células Vero com amostras de bezerros isoladas no Brasil

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras bacterianas

As amostras de *Escherichia coli* B26a, utilizada como padrão de Fator Necrosante Citotóxico do tipo 2 (CNF 2) e MR48, utilizada como padrão de Fator Necrosante Citotóxico do tipo 1 (CNF 1), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jorge Blanco (Universidade de Campostela, Lugo, Espanha).

Foram utilizados como controles, as amostras padrões de *E. coli* H30 (VT 1⁺), gentilmente cedida por Dr. J. Konowalchuk (Canadá), J2 (VT 2⁺), gentilmente cedida por Dr. Y. Takeda (International Medical Center of Japan) e 40T(LT 1⁺), gentilmente cedida por Dr. L. R. Trabulsi (Universidade de São Paulo, São Paulo).

Nos ensaios para a realização dos estudos epidemiológicos, foram utilizadas 273 amostras de *E. coli* previamente isoladas e identificadas, coletadas de bezerros da região sudeste do Brasil.

2. Extração do Fator Necrosante Citotóxico 2 (CNF2)

A extração do Fator Necrosante Citotóxico 2 (CNF 2) foi realizada por 4 diferentes métodos:

2.1. Mitomicina C

A extração de CNF 2 por Mitomicina C foi realizada segundo metodologia descrita por Blanco & Blanco (1993a). A amostra de *E. coli* B26a foi cultivada em 20 ml de Trypticase Soy Broth (TSB, Difco) sob agitação de 150 rpm a 37°C por 5 horas. Após

este período, a Mitomicina C foi adicionada ao crescimento bacteriano na concentração de 1 µg/ml, que foi mantido sob agitação a 37°C por mais 15 horas. O sobrenadante da cultura bacteriana foi obtido por centrifugação (10.000 rpm, 10 min, 4°C) e armazenado a -20°C até o momento da realização do ensaio em cultura de células.

2.2. Polimixina B

Para a extração por Polimixina B seguiu-se o método descrito por Karmali *et al.* (1985). A amostra de *E. coli* B26a foi cultivada em 20 ml de TSB (Difco) sob agitação de 150 rpm a 37°C por aproximadamente 5 horas. O crescimento bacteriano foi centrifugado (10.000 rpm, 10 min, 4°C) e o precipitado bacteriano lavado 2 vezes com fosfato salina tamponada pH 7,4 (PBS) e ressuspenso em 1 ml de PBS contendo 0,1 mg/ml de Polimixina B (Sigma), sendo incubado em banho-maria a 37°C por mais 30 minutos. A suspensão bacteriana foi então centrifugada (10.000 rpm, 20 min, 4°C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até o momento do ensaio em cultura de células.

2.3. Ultra-som

A extração de CNF 2 por ultra-som foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Blanco & Blanco (1993a), com algumas modificações. A amostra padrão de CNF 2 foi cultivada em 20 ml de TSB (Difco) por 18 horas sob agitação de 150 rpm a 37°C, sendo em seguida centrifugada (10.000 rpm, 10 min, 4°C), e o precipitado ressuspenso em 1 ml de PBS. A suspensão bacteriana foi então submetida a ultra-som (Sonics & Materials Inc., Vibra Cell) por 5 minutos (10 ciclos de 30 segundos),

em banho de gelo. Após a sonicação, a suspensão bacteriana foi novamente centrifugada (10.000 rpm, 20 min, 4°C), sendo o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C até o momento do ensaio em cultura de células.

2.4. “Freeze-thawing” (congelamento e descongelamento)

A extração de CNF 2 por “freeze-thawing” seguiu metodologia descrita por Blanco & Blanco (1993a). A amostra padrão de CNF 2 foi cultivada em 20 ml de TSB (Difco) sob agitação de 150 rpm a 37°C por 18 horas. Após o período de incubação, o crescimento bacteriano foi centrifugado (10.000 rpm, 10 min, 4°C) e o pellet bacteriano ressuspenso em 1 ml de PBS, quando então, sofreu 2 ciclos de congelamento (-20°C) e descongelamento (37°C). A suspensão bacteriana foi novamente centrifugada (10.000 rpm, 10 min, 4°C) e o sobrenadante coletado e armazenado a -20°C até o momento do ensaio em cultura de células.

3. Detecção de citotoxinas em cultura de tecido

3.1. Preparo das culturas celulares

As células Vero, provenientes de rim de macaco verde africano e as células HeLa, provenientes de carcinoma de útero humano, obtidas dos estoques do Laboratório de Cultura Celular (Depto. Microbiologia e Imunologia, I.B. , UNICAMP), estocadas em nitrogênio líquido, foram rapidamente descongeladas em banho-maria a 37°C, lavadas com meio Eagle (Cultilab) e transferidas para uma garrafa de cultura de células contendo Eagle suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de solução de

antibióticos contendo penicilina 1.000 U/ml e estreptomicina 250 µg/ml (Sigma). Os frascos de cultura foram, então, incubados em estufa a 37°C por 48 horas, até formação de tapete celular.

Após esse período, o meio de cultura foi descartado, sendo adicionado à cultura celular solução de Tripsina-Versene (ATV, IAL) para o deslocamento do tapete celular. As células foram então ressuspensas em Eagle acrescido de 10% de SFB e 1% de solução de antibióticos, em um número estimado de $2,5 \times 10^5$ células/ml. A suspensão de células foi distribuída em microplacas de 96 concavidades, em volume de 0,1 ml por cavidade e incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas.

3.2. Ensaio do CNF 2

Após a formação de monocamada celular nas microplacas, o meio de cultura foi substituído por Eagle contendo 100 µg/ml de Gentamicina (Sigma) e o CNF 2 em teste foi aplicado nas células em diluição 1:4. Para titulação, as amostras foram diluídas na razão 2, iniciando em 1:4 até 1:4.096. As placas permaneceram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C e as leituras foram realizadas após 24 e 48 horas de ensaio em microscópio invertido.

4. Purificação do CNF 2

4.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônia

A amostra bacteriana B26a foi cultivada em 6 litros de TSB (Difco) por 18 horas sob agitação (150 rpm) a 37°C. A suspensão bacteriana foi centrifugada (10.000

rpm, 10 min, 4°C), e o precipitado bacteriano lavado em tampão Tris-HCl 0,025 M pH 8,5 e ressuspenso no mesmo tampão em concentração 20 vezes menor do que o volume inicial de cultivo. A suspensão bacteriana foi submetida a ultra-som em 10 ciclos de 30 segundos em banho de gelo, totalizando 5 minutos de sonicação. Em seguida, a suspensão bacteriana foi novamente centrifugada (10.000 rpm, 20 min, 4°C) e o sobrenadante coletado. O extrato de CNF 2 assim obtido foi inicialmente fracionado com 30% de saturação de sulfato de amônia (Merck) sob agitação constante a 4°C por 3 horas. Com o sobrenadante obtido após a centrifugação, foram realizadas novas precipitações com 60 e 80% de saturação, do mesmo modo como para 30%. Após 3 horas de homogeneização do sal com o extrato bacteriano, a suspensão foi centrifugada (10.000 rpm, 10 min, 4°C) e as proteínas que precipitaram naquela determinada concentração de sulfato de amônia foram ressuspenso em Tris-HCl 0,025 M pH 8,5 e extensivamente dialisadas contra o mesmo tampão a 4°C, com várias trocas do tampão.

As proteínas que precipitaram a 30, 60 e 80% de saturação de sulfato de amônia foram dialisadas e posteriormente ensaiadas em células Vero para a verificação da atividade biológica.

4.2. Cromatografia em Q-Sepharose Fast Flow

O Fator Necrosante Citotóxico 2 (CNF 2) precipitado com sulfato de amônia foi cromatografado em resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) (15 cm x 4 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M pH 8,5. Foram aplicados aproximadamente 200 mg de proteínas totais e a eluição do material foi realizada com um fluxo de 8 ml/min, com gradiente de NaCl não linear, ou seja, após a passagem de aproximadamente 3 volumes da coluna foi aumentada a concentração de NaCl no tampão.

Para tanto, foram utilizados tampões Tris-HCl 0,025 M pH 8,5 com concentrações de NaCl variando de 0,1 M a 0,5 M, com intervalos de 0,05 M. A cromatografia foi monitorada em espectrofotômetro (LKB Uvicord SII, Pharmacia) com comprimento de onda de 280 nm, sendo o perfil cromatográfico registrado (LKB REC 101, Pharmacia).

Cada fração eluída foi concentrada em AMICON com membrana XM50 (AMICON) e aplicadas em células Vero para verificar a atividade biológica. O volume da fração que continha a atividade biológica foi novamente diminuído através da concentração em “speed-vac” (IS 110, Savant) e extensivamente dialisado contra tampão Tris-HCl 0,05 M contendo NaCl 0,15 M pH 7,4 (TBS) para dar continuidade ao processo de purificação do CNF 2.

4.3. Cromatografia em Superdex 200

A fração eluída após cromatografia em Q-Sepharose foi aplicada em Superdex 200 (Pharmacia) (90 cm x 1,6 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M NaCl 0,15 M pH 7,4 (TBS). Foram aplicados cerca de 3 mg de proteínas totais na coluna e eluídas a um fluxo de 1 ml/min, coletando-se 2,5 ml por fração.

O perfil cromatográfico foi monitorado em espectrofotômetro (LKB Uvicord SII, Pharmacia) no comprimento de onda de 280 nm e registrado (LKB REC 101, Pharmacia). As frações foram coletadas em coletor de frações (LKB Super Frac, Pharmacia) e testadas em células Vero para verificar a atividade biológica. As frações que continham atividade biológica foram concentradas em “speed-vac” (IS 110, Savant).

5. Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração protéica de CNF 2 foi realizada segundo metodologia descrita por Hartree (1972). A 1 ml do CNF 2 diluído a 1:10 foi acrescentado 0,9 ml da solução A e procedeu-se uma incubação de 10 minutos a 50°C. Após a solução voltar a temperatura ambiente, foi acrescentado 0,1 ml da solução B e o ensaio foi, então, mantido em temperatura ambiente por 10 min. Após o tempo de incubação, 3 ml da solução C (reativo de Folin) foram acrescentados à solução e houve nova incubação a 50°C por 10 min. Após voltar a temperatura ambiente, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro (DU-65 Spectrophotometer, Beckman) no comprimento de onda de 650 nm.

Como padrão de concentrações protéicas foi utilizado soroalbumina bovina (BSA, Calbiochem) em concentrações conhecidas.

6. Eletroforese

6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida convencional (PAGE) foi realizada com algumas modificações na metodologia de Davis (1964). A montagem dos géis e as condições de corrida seguiram metodologia descrita no “Hoefer Catalog and Exercises” (1991). O gel de resolução foi preparado na concentração de 7,5% de acrilamida. Foram utilizados padrões de massas moleculares conhecidos (Pharmacia) para a verificação do

perfil de corrida. As amostras a serem estudados os perfis eletroforéticos foram aplicadas no gel e submetidas a uma corrente constante de 1,5 mA por amostra aplicada.

A evidenciação das bandas protéicas foi realizada através da coloração dos géis por prata, segundo metodologia descrita por Blum *et al.* (1987).

6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (SDS-PAGE) foi realizada com algumas modificações na metodologia descrita por Laemmli (1970). Assim como em PAGE convencional, a montagem dos géis e as condições de corrida seguiram metodologia descrita no “Hoefer Catalog and Exercises” (1991). O gel de resolução foi preparado a uma concentração de 10% de acrilamida. Foram utilizados padrões de peso molecular conhecidos (Pharmacia) para a estimativa da massa molecular do CNF 2. As amostras a serem estudados os perfis eletroforéticos em condições denaturantes foram aplicadas no gel e submetidas a uma voltagem de 50V por aproximadamente 14 horas.

A coloração por prata foi realizada segundo metodologia descrita por Blum *et al.* (1987).

7. Caracterização sorológica do CNF 2

7.1. Produção de antissoros

7.1.1. Produção de antissoro em coelhos

A produção de antissoro em coelhos foi realizada com o CNF 2 eluído de Q-Sepharose Fast Flow, que foi aplicado em gel de poliacrilamida convencional (PAGE) e corado com Coomassie (Coomassie Blue R250 0,27%, metanol 54%, ácido acético 13,5%). A banda protéica correspondente ao CNF 2 foi excisada do gel, macerada na presença do tampão TBS e em seguida centrifugada (5.000 rpm por 10 minutos), para a retirada das proteínas da malha de poliacrilamida, como descrito por Harlow & Lane (1988), com algumas modificações.

O sobrenadante obtido através da centrifugação foi diluído a uma concentração final de 50 µg de CNF 2 e misturado ao adjuvante de Freund completo em partes iguais (volume a volume).

As inoculações foram realizadas de acordo com recomendações de De Rycke *et al.* (1989), com alteração introduzida na última inoculação. Para a produção do antissoro foram utilizados 2 coelhos albinos da raça New Zealand, com dois meses de idade. A primeira inoculação foi realizada por via intradérmica em pontos diferentes no dorso dos animais, aplicando-se 2 ml da mistura de CNF 2 com o adjuvante completo em cada animal. Após 30 dias, uma segunda dose sem adjuvante foi inoculada da mesma forma. Outras duas doses de 50 µg foram inoculadas com intervalos de uma semana, sem adjuvante.

Antes de cada inoculação foram feitas sangrias de prova e os soros previamente descomplementados por aquecimento a 56°C por 30 minutos foram avaliados por soroneutralização em células Vero. Após 1 semana da 4ª inoculação foi feita sangria total dos dois coelhos.

7.1.2. Produção de antissoro em camundongos

A produção de um segundo anticorpo foi realizada em 20 camundongos da raça Swiss, com 6 semanas de idade. O antígeno a ser inoculado foi preparado como descrito para a produção de antissoro em coelho. As inoculações foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Haque *et al.* (1992).

Após eluição de CNF 2 do gel, 20 µg de proteína foi misturada ao adjuvante de Freund completo, volume a volume, e inoculada em camundongos, por via intraperitonal (0,2 ml da mistura por animal). Após 30 dias uma segunda dose foi aplicada sem a adição de adjuvante. Duas outras inoculações foram realizadas com intervalos de 20 dias e, após sangria de prova com resultados favoráveis em soroneutralização, foi realizada sangria total dos animais. Antes de ser utilizado no ensaio de soroneutralização, o soro foi descomplementado por aquecimento a 56°C por 30 minutos.

7.2. Titulação do efeito neutralizante dos antissoros em células Vero

A capacidade dos antissoros anti-CNF 2 de neutralizarem o efeito biológico dos extratos bruto de CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2 e LT I em sobrenadantes de cultura, foi verificada em cultura de células Vero.

Inicialmente foi titulada a atividade citotóxica dos extratos de todas as citotoxinas em células Vero. Foi considerado para uso no ensaio de neutralização a diluição anterior à última que apresentou atividade citotóxica nesta célula.

Os antissoros foram descomplementados (56°C por 30 min) e em seguida diluídos em série, na razão 2, até 1:2048, em volumes de 50 µl. Para cada diluição do antissoro foram adicionados 50 µl de cada toxina previamente titulada. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C.

Ao final da incubação, a mistura foi aplicada sobre monocamadas de células Vero e observadas por 24 e 48 horas. Foi considerado como título neutralizante a última diluição do antissoro que neutralizou o efeito citotóxico das toxinas.

7.3. Imunodifusão radial dupla

A técnica de imunodifusão radial dupla para a análise sorológica foi realizada segundo Ouchterlony (1958). Sobre uma lâmina de vidro (7,5 cm X 2,5 cm) foi colocada uma camada de 0,15 cm de espessura de ágar noble (Sigma) a 1 % em salina 0,15 M. Os orifícios foram feitos utilizando molde próprio para este fim, sendo a distância entre os orifícios padronizada.

Para o estudo da identidade entre os antígenos CNF 1 e CNF 2 foi colocado no orifício central os antissoros de coelho e camundongo e nos orifícios laterais CNF 1 e CNF 2:

A especificidade dos antissoros anti-CNF 2 foi avaliada absorvendo os soros com o extrato bacteriano de CNF 1, onde 2 volumes de extrato bruto de CNF 1 foram adicionados a 1 volume do antissoros anti CNF 2 previamente descomplementado. A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C e 18 horas a 4°C e centrifugada a 10.000 rpm

por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante assim obtido foi então aplicado no ensaio de imunodifusão radial dupla.

Os ensaios foram realizados em câmara úmida por 24 horas à temperatura ambiente e em seguida, as lâminas foram extensivamente lavadas com salina 0,15 M, com várias trocas da solução salina e secas em estufa. Em seguida, as lâminas foram coradas com Coomassie (Coomassie Blue R250 0,27%, metanol 54%, ácido acético 13,5%) por 5 minutos e descoradas com solução descorante (metanol 30%, ácido acético 10%) até que aparecessem somente as linhas de precipitação que se formaram.

7.4. Purificação de IgG da camundongo

A purificação de IgG de camundongo foi realizada através de cromatografia de afinidade em resina de Sepharose-Proteína A, equilibrada com tampão fosfato 0,1 M pH 8,0, a um fluxo de 40 ml/hora. Após a aplicação do soro e de toda a sua passagem pela resina, esta foi lavada com tampão fosfato 0,1 M pH 8,0, de maneira a retirar o material que não se aderiu à resina. O material adsorvido ao gel foi eluído em volumes de 5 ml por tubo com tampão Glicina-HCl 0,1M pH 2,8. Os tubos de coleta continham 400 µl de tampão Tris-HCl 1 M pH 8,5 para a neutralização das amostras. A eluição foi interrompida quando a leitura espectrofotométrica a 280 nm das amostras coletadas se mostraram inferiores a 0,05.

As frações que apresentaram absorbâncias mais elevadas foram reunidas e dialisadas contra PBS e as proteínas foram dosadas através do método de Hartree (1972). O material foi estocado a temperatura de -20°C até o momento do uso.

7.5. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

7.5.1. Padronização do teste

A padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) foi inicialmente realizada absorvendo na placa o CNF 2 purificado diluído em tampão carbonato-bicarbonato em diluições seriadas (0,5µg, 1,0µg, 2,5µg, 5µg e 10 µg). Após a placa ser bloqueada, foram acrescentadas diluições em série do antissoro de coelho e da IgG de camundongo purificada para a verificação de quais diluições de CNF 2 e dos antissoros deveriam ser utilizadas nos ensaios de ELISA.

7.5.2. Ensaios de ELISA

O ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizado pelo método “sandwich”, onde a placa de 96 concavidades foi sensibilizada com 100 µl do anticorpo de camundongo diluído em tampão carbonato-bicarbonato por cavidade e incubada por 18 horas a 4°C. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS-T (fosfato 0,05 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%) por 2-3 minutos cada lavagem e em seguida, cada concavidade foi bloqueada com a adição de 200 µl de leite desnatado a 5% em PBS-T e incubadas por 2 horas a 37°C. Após novo processo de lavagem, foram adicionados 100 µl das citotoxinas em teste, diluídas em PBS, por cavidade e houve nova incubação de 2 horas a 37°C. Foram utilizados nos ensaios de ELISA sobrenadantes de amostras produtoras de CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2 e LT I em TSB, extraídos por Mitomicina C. Como controles foram utilizados sobrenadante de amostra negativa para qualquer citotoxina e TSB estéril. Novo processo de lavagem foi realizado, sendo adicionados, em seguida, 100 µl do soro anti-CNF 2 de coelho diluído em PBS. Passadas 2 horas de

incubação a 37°C, as placas foram novamente lavadas e foram adicionados 100 µl de conjugado marcado com peroxidase e novamente houve incubação de 2 horas a 37°C. Após o período de incubação, a placa foi lavada e revelada com ortofenilenodiamina (OPD, Sigma). O “stop” da reação foi realizado com a adição de 100 µl de H₂SO₄ 2 M por concavidade.

A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA (Labsystem Multiskan BICHROMATIC) com filtro de 492 nm. Como branco da reação foi deixada uma coluna da placa sem adição de qualquer componente da reação, exceto o revelador e o bloqueador da reação.

7.6. “Wersten-blot”

Para a realização do “wersten-blot” inicialmente foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida convencional (PAGE) e em condições denaturantes (SDS-PAGE). Ao término da eletroforese, os géis foram transferidos para cuba própria para a realização da transferência das bandas protéicas do gel para a membrana de nitrocelulose, através de corrente elétrica de 30 V, por 18 horas.

Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada por Ponceau a 5% para verificar a ocorrência da transferência. A membrana foi então bloqueada com leite desnatado a 5% em PBS por 1 hora sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com PBS e exposta ao soro anti-CNF 2 por mais 1 hora sob agitação constante. Em seguida, após repetição do processo de lavagem, a membrana foi exposta ao anticorpo secundário (anti IgG de camundongo ou de coelho) marcado com peroxidase, também por 1 hora com agitação constante. E finalmente, a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB, Sigma), tendo como substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

7.7. “Dot-ELISA”

O teste de “dot-ELISA” foi realizado em tiras de membrana de nitrocelulose, onde 5 µl dos sobrenadantes de amostras produtoras de CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2, LT I extraídas com Mitomicina C e TSB estéril foram aplicados diretamente na fita e o processo, a partir do bloqueio com leite desnatado prosseguiu da mesma maneira como descrito para o “western-blot”.

O teste de “dot-ELISA” foi também realizado com a sensibilização da fita de nitrocelulose com a IgG de camundongo. Após a sensibilização da fita com o anticorpo de camundongo, a fita foi bloqueada com leite desnatado, e em seguida as toxinas em teste foram aplicadas por sobre o anticorpo de camundongo. O processo daí em diante seguiu como descrito para “western-blot”.

8. Caracterização biológica do efeito produzido por CNF 2

8.1. Ensaio em animais

8.1.1. Ensaio em pele de coelho (“rabbit skin test, RST”)

Para a realização do ensaio em pele de coelho foi seguida metodologia descrita por Blanco & Blanco (1993a), onde foram utilizados 2 coelhos albinos da raça New Zealand, com 2 meses de idade. O dorso dos animais foi depilado e quadriculado com o auxílio de uma caneta. Foram inoculados 0,1 ml de CNF 2 extraído por ultra-som. As inoculações foram realizadas em pontos diferentes no dorso de cada animal. Após 24 horas de inoculação, os animais foram sacrificados e a pele da parte dorsal foi retirada do corpo

do animal, sendo observada a porção interna. Foi considerada amostra positiva aquela que foi capaz de causar necrose na pele do coelho.

Como controles foram utilizados sobrenadantes de amostras produtoras de CNF 1, LT I, sobrenadante de amostra não produtora de toxina e salina 0,15 M.

8.1.2. Necrose em pata de camundongo

O ensaio em pata de camundongo foi realizado segundo metodologia de Blanco & Blanco (1993a). No ensaio, foram utilizados camundongos da raça Swiss, pesando entre 23 e 27 gramas. Foram injetadas nas patas traseiras dos animais, 50 µl de sobrenadante de CNF 2 extraído por ultra-som. Para cada amostra foram utilizados 3 camundongos.

Como controles foram utilizados sobrenadantes de amostras produtoras de CNF 1, LT I, sobrenadante de amostra negativa para toxina e salina 0,15 M.

Os animais foram mantidos por 7 dias, observando-se a ocorrência de necrose.

8.2. Teste de viabilidade celular em Vero e HeLa

O teste de viabilidade celular foi realizado em células Vero e HeLa, segundo metodologia descrita por Borenfreund & Puerner (1984). Inicialmente o CNF 2 foi aplicado nas células, juntamente com os sobrenadantes de amostras positivas para CNF 1, VT 1, VT 2 e LT I extraídas por Mitomicina C, que serviram de controle.

Após 24 horas da aplicação das citotoxinas, o meio foi substituído por 0,2 ml de solução de vermelho de neutro (50 µg/ml) por concavidade e a microplaca foi

novamente incubada em estufa a 37°C por mais 3 horas, para a incorporação do corante. Em seguida, o corante foi desprezado e as microplacas foram incubadas por 2 a 3 minutos com uma solução de cloreto de cálcio e formol para a retirada do corante que não foi incorporado pelas células. Novamente foi desprezado o sobrenadante, e as cavidades foram preenchidas com ácido acético-etanol. As placas permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente para a retirada do corante do interior das células.

Como controles foram deixadas células tratadas e não tratadas com a toxina sem a adição do corante vermelho de neutro, que serviram como branco da reação. Células normais, ou seja, sem adição de citotoxinas, com a adição de vermelho de neutro, serviram como o controle de 100% da reação, correspondendo às células viáveis.

A leitura da reação foi realizada em leitor de ELISA (Labsystem Multiskan BICHROMATIC), utilizando filtro de 540 nm.

8.3. Estudo dos efeitos de CNF 2 sobre células

8.3.1. Efeito de multinucleação celular

As células Vero e HeLa foram crescidas sobre lamínulas, em placas de 24 concavidades, onde em cada concavidade foram adicionadas 10^4 células/ml. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas de incubação, aproximadamente 50 µg do extrato semi-purificado que contém CNF 2 foi aplicado nas células e as placas retornaram à estufa.

Após 8, 24 e 48 horas de tratamento, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas em uma solução de formaldeído a 10% em PBS por 1 hora. As lamínulas foram então lavadas com água destilada e, em seguida coradas segundo metodologia de Mello & Vidal (1980), pelo Azul de Toluidina (AT) a 0,025% em tampão Mc Ilvane a pH 4,0.

Após 15 minutos de coloração a temperatura ambiente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com água destilada para a retirada do corante em excesso, secas ao ar e diafanizadas em xilol. As lamínulas foram montadas sobre lâminas, utilizando-se o bálsamo do Canadá.

Foram contadas as células com 1, 2, 3 e 4 ou mais núcleos tanto nas células tratadas com CNF 2 como nas células controle (sem citotoxina). Em cada tempo de incubação procurou-se analisar os núcleos de aproximadamente 1.000 células, encontradas em campos microscópicos tomados ao acaso.

8.3.2. Identificação dos componentes do citoesqueleto

As células Vero e HeLa foram cultivadas sobre lamínulas do mesmo modo como descrito para a verificação do efeito de multinucleação celular. As lamínulas foram retiradas após 8, 24 e 48 horas de tratamento.

A actina filamentar foi identificada pelo uso de faloidina acoplada ao isotiocianato de tetrametilrodamina (Sigma) e os microtúbulos identificados pela localização imunocitoquímica de β -tubulina com o emprego de anticorpo monoclonal TUB 2.1 (Sigma) e secundário anti-imunoglobulinas de camundongo acoplado ao isotiocianato de fluoresceína (Sigma). O protocolo utilizado foi uma adaptação do método de Gard (1993).

As lâminas foram montadas com DABCO (meio de montagem contendo anti-fading) e examinadas e fotografadas em microscópio de fluorescência Axioskop (Zeiss).

9. Estudo epidemiológico

O estudo epidemiológico foi realizado a partir de 273 amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros, para a verificação de produção de citotoxinas e hemolisinas.

9.1. Extração de citotoxinas

A extração das citotoxinas foi realizada segundo metodologia de Blanco & Blanco (1993a). As amostras foram inicialmente crescidas em 5 ml de TSB (Difco) com agitação a 37°C. Após 5 horas de incubação, foi adicionado 1 µg/ml de Mitomicina C aos crescimentos bacterianos, que ficaram incubados por mais 15 horas sob agitação. As culturas bacterianas foram então centrifugadas (3.000 rpm, 30 min, 4°C) e os sobrenadantes, assim coletados, foram ensaiados em células Vero para a verificação da produção de citotoxinas. O teste foi realizado com os sobrenadantes de cultura diluídos a 1:10.

Como controles dos ensaios foram utilizadas as amostras produtoras de CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2 e LT I, sendo as toxinas extraídas da mesma forma como descrito acima.

9.2. Produção de hemolisinas

A produção de hemolisinas pelas amostras isoladas de bezerros foi testada em placas de ágar sangue. As amostras bacterianas foram crescidas por 20 horas em TSB (Difco) e semeadas nas placas de ágar sangue, utilizando hemácias de carneiro a 5% lavadas com PBS, segundo metodologia descrita por Beutin *et al.* (1988). As amostras

com suspeita de serem produtoras de enterohemolisina foram novamente semeadas em placas de ágar sangue com hemácias não lavadas, segundo recomendações de Beutin *et al.* (1986).

RESULTADOS

1. Extração do Fator Necrosante Citotóxico 2 (CNF 2)

Após o crescimento da amostra padrão de *Escherichia coli* B26a produtora de CNF 2 em TSB, o crescimento bacteriano foi submetido à 4 diferentes métodos de extração de toxina, uma vez que já se sabia que o CNF 2 não era liberado nos sobrenadantes de cultura.

O CNF 2 obtido nos diferentes métodos de extração foi titulado em células Vero para a verificação da atividade biológica. Na Tabela 1 podem ser observados os títulos de CNF 2 obtidos nas células Vero, nos 4 métodos de extração utilizados.

Tabela 1 - Estudo comparativo dos métodos de extração de CNF 2 em células Vero.

Método de extração	Título ^a
Mitomicina C	1024
Polimixina B	512
Ultra-som	1024
“Freeze-thawing”	512

a - inverso do maior título com atividade biológica

De acordo com os resultados obtidos em cultura de células Vero (Tabela 1), as extrações do CNF 2 por Mitomicina C e ultra-som apresentaram título de atividade biológica em células Vero de 1: 1.024, uma casa de diluição a mais do que as extrações realizadas por Polimixina B e “freeze-thawing”.

A Figura 1 ilustra o efeito biológico produzido por CNF 2 em células Vero, HeLa e CHO, após 24 horas de tratamento.

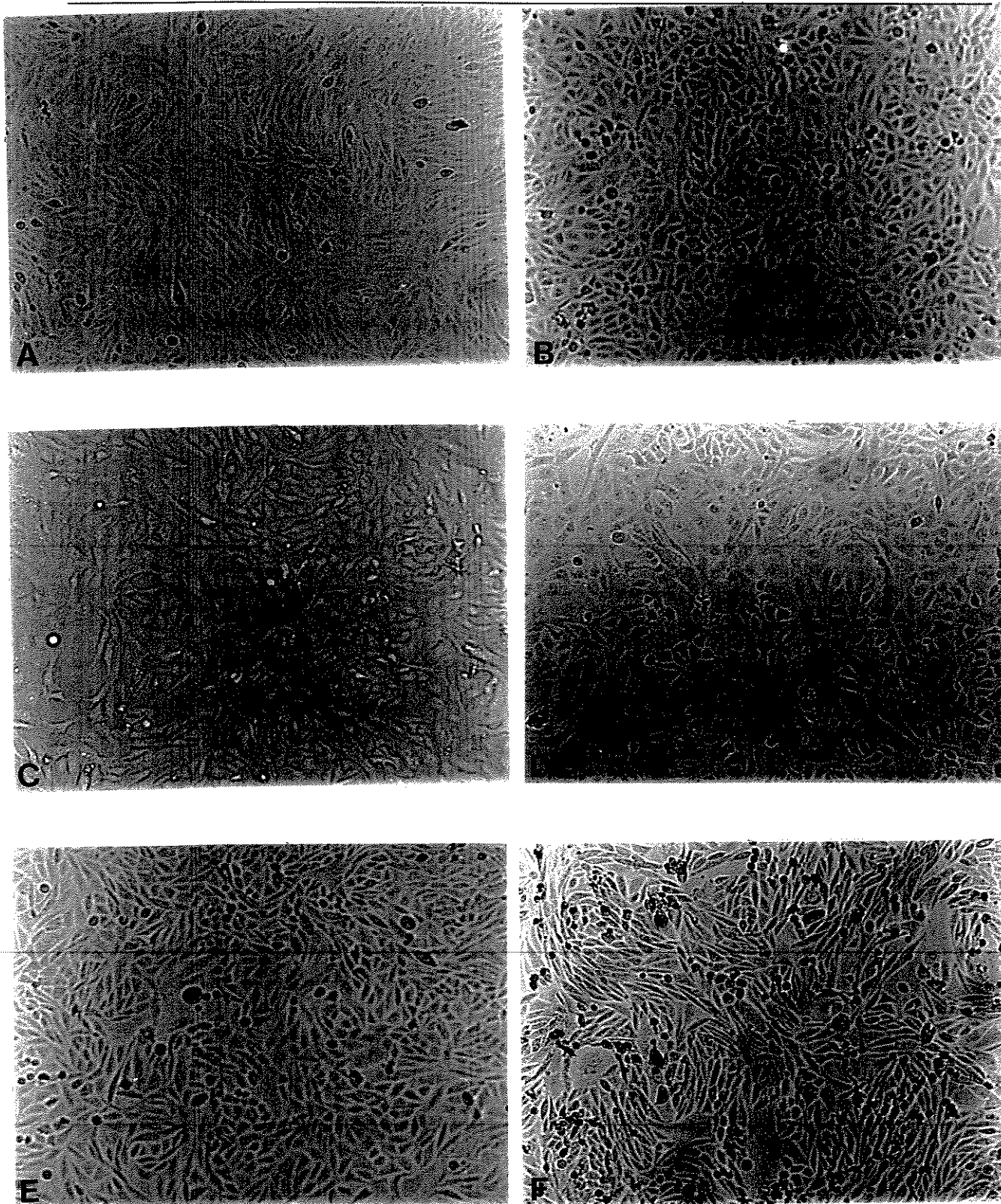


Figura 1 - Efeito da atividade biológica do CNF 2 em células Vero, HeLa e CHO. A - células Vero controle; B - células Vero tratadas com CNF 2; C - células HeLa controle; D - células HeLa tratadas com CNF 2; E - células CHO controle; F - células CHO tratadas com CNF 2. Aumento: 100 X.

2. Purificação do CNF 2

2.1. Precipitação fracionada com sulfato de amônia

Após a extração do CNF 2 por ultra-som, foram realizadas precipitações fracionadas com sulfato de amônia a 30, 60 e 80% de saturação. A atividade biológica de CNF 2 foi verificada na fração precipitada a 60% de saturação de sulfato de amônia, enquanto que nas frações precipitadas a 30 e 80% de sulfato de amônia não foi observado o efeito citopático característico de CNF 2 em células Vero.

2.2. Cromatografia em Q-Sepharose Fast Flow

A cromatografia em resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) foi realizada aplicando-se o CNF 2 extraído por ultra-som e precipitado a 60% de saturação de sulfato de amônia, tendo sido realizado um fracionamento inicial com 30% de sulfato de amônia.

O volume de cada fração coletada foi concentrado por ultrafiltração em AMICON com a utilização da membrana XM 50 (AMICON). Após reduzir o volume das frações, essas foram aplicadas em células Vero para verificar a atividade biológica do CNF

2.

O efeito citopático foi observado na fração eluída com o tampão Tris-HCl 0,025 M pH 8,5 acrescido de NaCl 0,25 M (Figura 2).

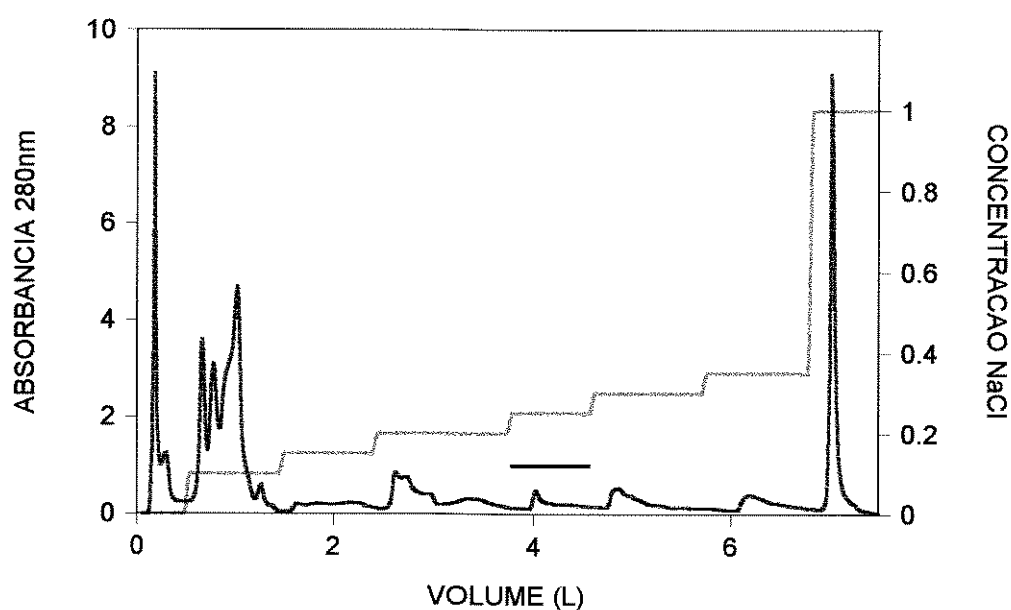


Figura 2 - Perfil cromatográfico da eluição de CNF 2 em Q-Sepharose Fast Flow a 280 nm (linha azul). A linha amarela representa o gradiente de NaCl realizado com 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 e 1 M de NaCl. A barra vermelha indica a fração com atividade biológica.

2.3. Cromatografia em Superdex 200

O CNF 2 eluído de Q-Sepharose Fast Flow (Figura 2) foi concentrado para aproximadamente 3 mg/ml e extensivamente dialisado contra tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 (TBS) e aplicado em Superdex 200 (Pharmacia), equilibrada com esse mesmo tampão.

O perfil cromatográfico de CNF 2 em Superdex 200 pode ser observado na Figura 3. A atividade biológica do CNF 2 foi observada em 8 frações, sendo que cada uma delas foi concentrada separadamente em “speed vac”.

Tabela 2 - Purificação do CNF 2.

Etapa de purificação	Proteínas totais (mg)	Atividade biológica ^a	Atividade específica ^b
Sonicado	686,40	256	0,37
Pptdo 60%	225,20	512	2,27
Eluição Q-Sepharose	26,40	1024	38,78
Eluição Superdex 200	0,175	512	2.925,71

a - Inverso do maior título com atividade biológica

b - Atividade específica = atividade biológica/proteínas totais

A atividade específica do CNF 2, como pode ser observado na Tabela 2, teve um aumento significativo, sendo que a atividade específica ao final do processo de purificação foi de 2.957,71. Esses dados permitem observar que do extrato bruto para a última etapa da purificação, a pureza do CNF 2 aumentou em 7.907 vezes.

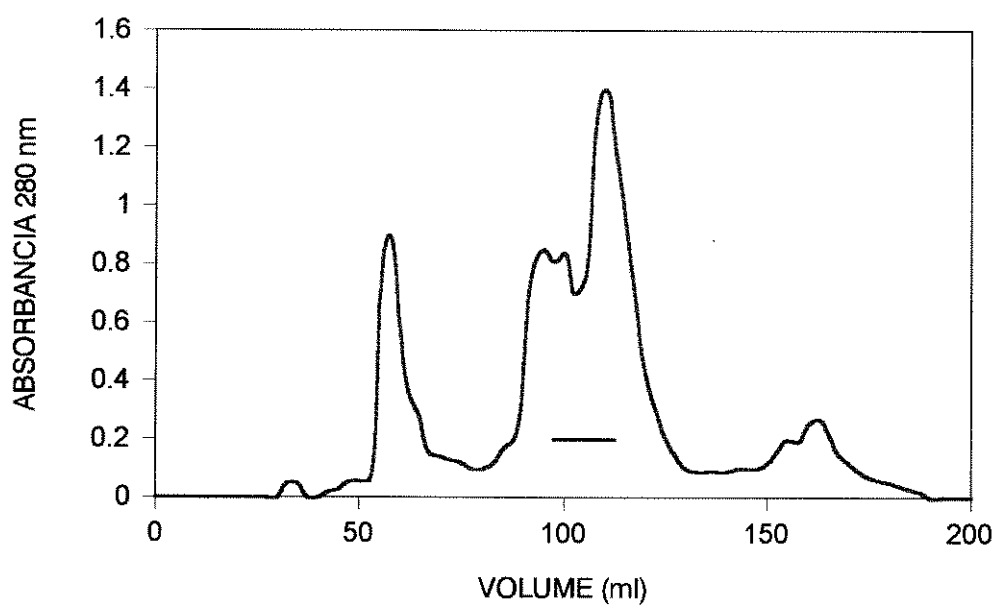


Figura 3 - Perfil cromatográfico da eluição de CNF 2 em Superdex 200. A barra em vermelho indica as frações com atividade biológica.

3. Eletroforese

3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

O material obtido em cada processo de purificação do CNF 2, foi analisado em eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não denaturantes (PAGE) para a verificação do grau de pureza desta proteína.

O perfil eletroforético de CNF 2 em PAGE pode ser observado na Figura 4. Após a cromatografia do CNF 2 em Q-Sepharose Fast Flow e em Superdex 200, pode-se observar a presença de apenas uma banda protéica.

3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (SDS-PAGE)

A análise eletroforética em gel de poliacrilamida em condições denaturantes (SDS-PAGE) foi realizada com CNF 2 purificado para a verificar a existência de subunidades.

Em observação à Figura 5, pode-se notar a presença de duas bandas protéicas, com massas moleculares estimadas em 50,932 kDa e 30,017 kDa, de acordo com os padrões de peso molecular conhecidos, segundo programa idealizado pelo Prof. Dr. Adílson Leite (CBMEG, UNICAMP).

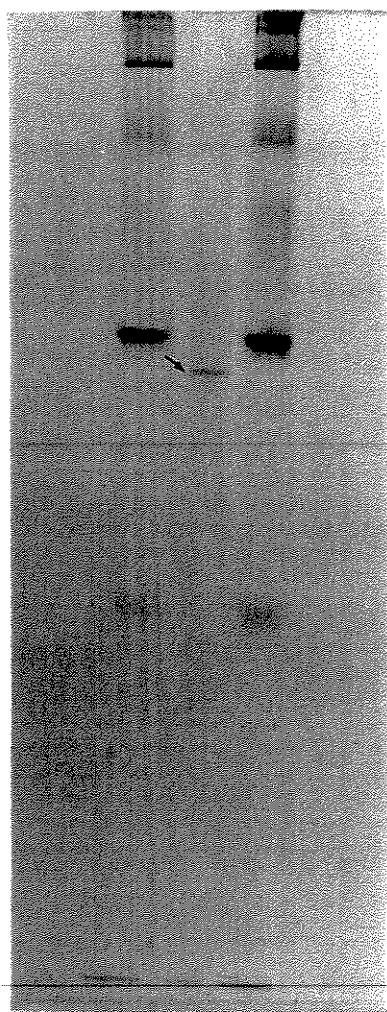


Figura 4 - Perfil eletroforético de CNF 2 em gel de poliacrilamida convencional (PAGE).

A seta indica a banda protéica correspondente ao CNF 2.

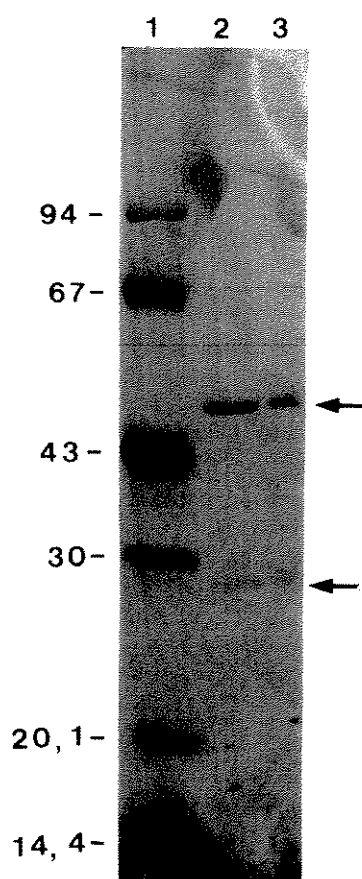


Figura 5 - Perfil eletroforético de CNF 2 em gel de poliacrilamida denaturante (SDS-PAGE). 1. Padrão de peso molecular (kDa); 2. CNF 2 tratado com 10% de β -mercaptoetanol; CNF 2 sem tratamento com β -mercaptoetanol.

4. Caracterização sorológica do CNF 2

4.1. Titulação do efeito neutralizante dos antissoros

A titulação do efeito neutralizante dos antissoros anti-CNF 2 produzidos em coelhos e camundongos realizada em células Vero pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3 - Efeito neutralizante dos antissoros de coelhos e camundongos.

Citotoxinas	Antissoros	
	coelhos	camundongos
CNF 1	64 ^a	64
CNF 2	512	512
VT 1	- ^b	-
VT 2	-	-
LT I	-	-

a - inverso do maior título obtido na soroneutralização em células Vero

b - não ocorreu soroneutralização

Pode-se notar que os antissoros anti-CNF 2 produzidos em coelhos e camundongos neutralizam também CNF 1. No entanto, a neutralização dos antissoros com seu homólogo apresenta título maior (1:512) do que o título do efeito neutralizante sobre CNF 1 (1:64).

4.2. Imunodifusão radial dupla

Como pode ser observado na Figura 6, tanto no ensaio realizado com o antissoro de coelho (Figura 6A) como no de camundongo (Figura 6B) observa-se

formação de linha de precipitação frente ao CNF 2, apresentando identidade parcial em relação ao CNF 1.

Quando o antissoro de coelho foi absorvido com CNF 1, este passou a não reconhecer mais CNF 1 no ensaio de Ouchterlony (Figura 6C). No entanto, os mesmos resultados não foram observados quando o ensaio foi realizado com o soro de camundongo. Neste ensaio, o antissoro não reconheceu CNF 1, mas também não reconheceu CNF 2, não existindo nenhuma linha de precipitação frente a esses dois antígenos.

4.3. Purificação da IgG de camundongo

A purificação da IgG de camundongo foi realizada em cromatografia de afinidade Sepharose-Proteína A. O perfil cromatográfico da purificação da IgG de camundongo pode ser observado na Figura 7. No gráfico está representado apenas o pico da eluição da IgG, uma vez que não foram feitas coletas nos procedimentos anteriores.

As frações que foram utilizadas nos ensaios sorológicos estão indicadas pela barra em vermelho.

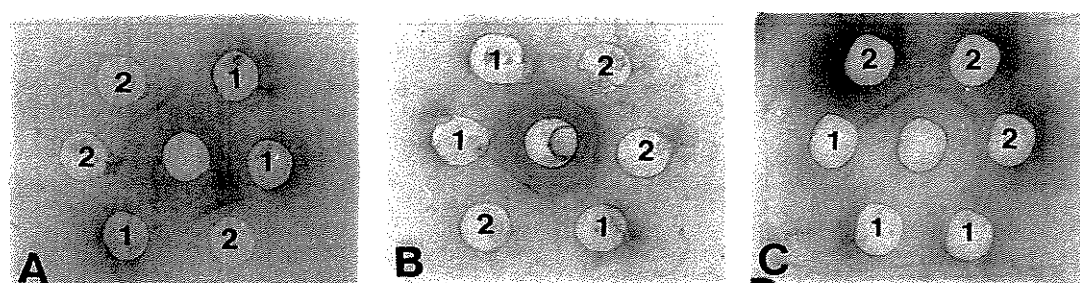


Figura 6 - Imunodifusão radial dupla. Os números 1 e 2 indicam CNF 1 e CNF 2, respectivamente. O S representa o antissoro. A - ensaio com o antissoro de coelho; B - ensaio com a IgG de camundongo purificada, C - ensaio com o antissoro de coelho absorvido com CNF 1.

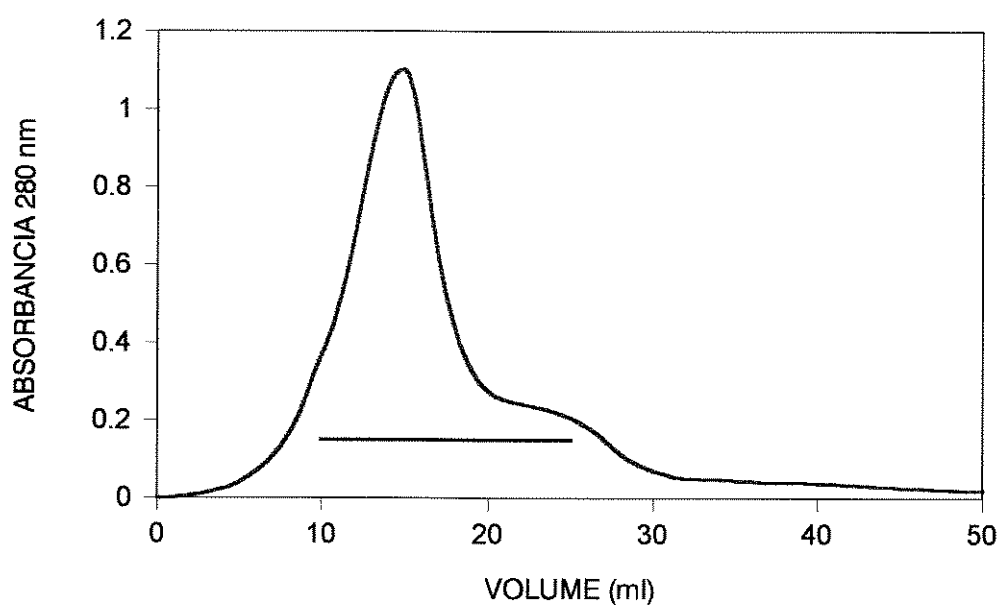


Figura 7 - Perfil cromatográfico da eluição de IgG de camundongo em Sepharose-Proteína A. A barra em vermelho indica as frações que foram concentradas para a utilização nos ensaios sorológicos.

4.4. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A padronização do ensaio imunoenzimático (ELISA) foi realizada para determinar quais diluições de CNF 2, do antissoro de coelho e da IgG purificada de camundongo deveriam ser utilizadas nos ensaios subsequentes. Ficou estabelecido que nos ensaios de ELISA seriam utilizados 150 µg/ml de IgG de camundongo purificada, 10 µg de CNF 2 e o soro de coelho diluído a 1:2.000.

Tendo estabelecida as diluições que seriam utilizadas no ensaio, o ELISA foi montado na forma de “sandwich”, onde foram testados os sobrenadantes de amostras positivas para CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2, LT I, sobrenadante de amostra negativa para qualquer citotoxina, meio de cultura (TSB), VT 1 e VT 2 purificados.

Após a leitura da reação a 492 nm, verificou-se que não havia reconhecimento de CNF 2 somente, ou seja, a reação apresentou resultados positivos para todas as outras citotoxinas testadas. A leitura espectrofotométrica do meio de cultura, apesar de ser maior do que a leitura do branco, não foi significativa quando comparada aos resultados obtidos não só para CNF 2 como para as outras citotoxinas.

De acordo com os resultados obtidos após a leitura espectrofotométrica, não foi possível determinar um índice de positividade para as amostras produtoras de CNF 2 devido à proximidade das leituras observadas para as outras citotoxinas.

4.5. “Wersten-blot”

No ensaio de “wersten-blot” não foi possível observar resultados que pudessem esclarecer o reconhecimento entre os antissoros de coelho e camundongo e a banda protéica correspondente ao CNF 2.

Nos ensaios realizados com os géis de eletroforese em PAGE e SDS-PAGE não foi possível observar resultados que indicassem que os antissoros estivessem reconhecendo o CNF 2. As membranas de nitrocelulose apresentavam apenas “borrões” quando reveladas após o tratamento tanto com soro de coelho como com a IgG de camundongo purificada.

4.6. “Dot-ELISA”

O resultado do ensaio de “dot-ELISA” com o antissoro de coelho e a IgG de camundongo purificada pode ser observado na Figura 8, onde foram utilizadas a IgG de camundongo purificada (Figura 8A) e o soro de coelho (Figura 8B).

No segundo ensaio de “dot-ELISA”, a reação foi montada de acordo como descrito para o ELISA (Figura 8C), onde a membrana de nitrocelulose foi sensibilizada com a IgG de camundongo purificada, e após o bloqueio da membrana com leite desnatado, foram adicionadas as citotoxinas, o soro de coelho, o conjugado e o revelador da reação, nesta sequência. Neste ensaio, também foi verificado o reconhecimento não só de CNF 2 como também de todas as outras citotoxinas testadas.

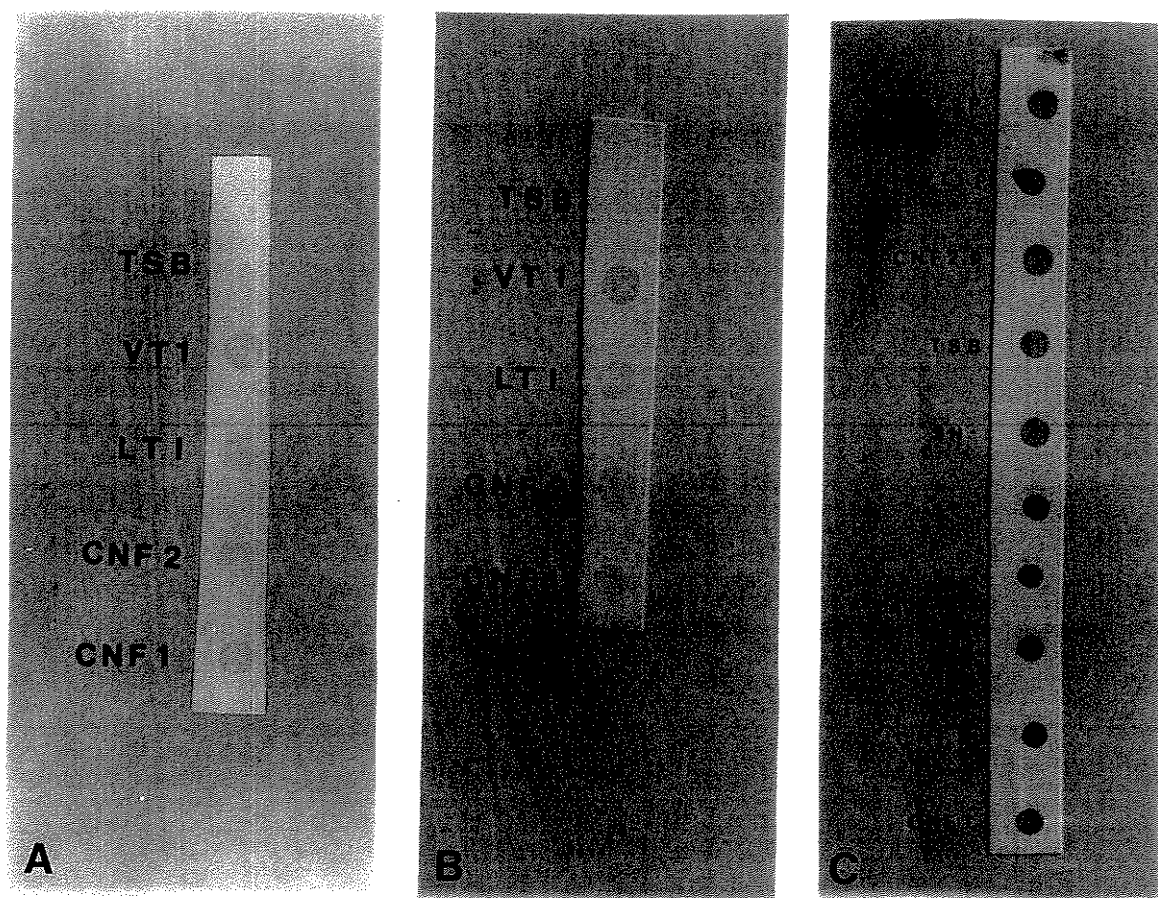


Figura 8 - "Dot-ELISA". A - ensaio com a IgG de camundongo purificada; B - ensaio com o antissoro de coelho, C - ensaio com a sensibilização da membrana de nitrocelulose com a IgG de camundongo. Ao lado de cada fita estão indicadas as toxinas em teste. TSB indica meio de cultura estéril e SN- indica sobrenadante de amostra negativa para produção de citotoxina.

5. Caracterização biológica do efeito produzido por CNF 2

5.1. Ensaio em animais

5.1.1. Necrose em pele de coelho

Foram inoculados em pele de coelhos os sobrenadantes de amostras produtoras de CNF 1, CNF 2, LT I e controles negativos. As toxinas CNF 1 e CNF 2 foram capazes de causar necrose na pele de coelho, enquanto que LT I apenas causou um edema no local da injeção. Os controles negativos não apresentaram reações.

5.1.2. Necrose em pata de camundongo

Os sobrenadantes de amostras produtoras de CNF 1 e CNF 2 e os controles negativos foram aplicados nas patas traseiras de camundongos. O CNF 2 causou necrose na pata do camundongo, levando às vezes a queda da porção necrosada, enquanto que o CNF 1 causou apenas um edema no local de injeção.

5.2. Viabilidade celular

O estudo da viabilidade celular foi realizado tratando-se as células Vero e HeLa por 24 horas com as citotoxinas CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2 e LT I. Foram utilizados controles positivos (100% de células viáveis) e controles negativos (células que não receberam o corante).

Em células Vero, as células que receberam as citotoxinas CNF 1, CNF 2 e LT I apresentaram 100% de viabilidade, enquanto que as células tratadas com VT 1 e VT 2 apresentaram perda de 74% e 56% de viabilidade, respectivamente.

Nos ensaios realizados em células HeLa, somente as células tratadas com LT I apresentaram 100% de viabilidade. As células tratadas com CNF 1 e CNF 2 apresentaram perda de 12% de viabilidade enquanto que as células tratadas com VT 1 e VT 2, perderam 33% de viabilidade.

Tabela 4 - Porcentagem de células Vero e Hela viáveis após 24 horas de tratamento com CNF 1, CNF 2, VT 1, VT 2 e LT I.

Toxinas	Vero	HeLa
CNF 1	100	88
CNF 2	100	88
VT 1	26	67
VT 2	44	67
LT I	100	100

5.3. Estudo dos efeitos do CNF 2 sobre células

5.3.1. Efeito de multinucleação celular

O efeito de multinucleação celular provocado por CNF 2 foi observado em células Vero e HeLa, verificando-se a presença de 1, 2, 3 e 4 ou mais núcleos por célula e células em divisão, após 8, 24 e 48 horas de incubação com ou sem citotoxina.

De acordo com a Tabela 5, pode-se observar que tanto as células Vero como as células HeLa apresentaram aumento na porcentagem de células com mais de um núcleo, sendo que nas células Vero essa diminuição foi mais aparente.

As Figuras 9 e 10 apresentam células Vero e HeLa, respectivamente, nos três tempos de incubação, onde é possível observar os aspectos de células multinucleadas. Foi possível observar, através desse mesmo método de coloração, que as células tratadas com CNF 2 apresentaram um acúmulo de material metacromático nos núcleos (provavelmente RNA) (Figura 10D) e um acúmulo de vesículas citoplasmáticas perinucleares (Figura 9B e 10B). Esse acúmulo de vesículas perinucleares foi mais evidente nas células HeLa, mesmo com apenas 8 horas de incubação com o CNF 2.

Tabela 5 - Porcentagem de células multinucleadas após 8, 24 e 48 horas de tratamento com CNF 2.

		Nº de núcleos por célula					Células em divisão			
Linhagem	Condições	1	2	3	4 ou +	Metáfase	Anáfase	Telófase	n ^a	
Vero	8 h ct ^b	97,92%	1,38%	- ^d	-	0,29%	0,29%	0,09%	1013	
	8 h tox ^c	91,92%	7,78%	0,19%	0,09%	-	-	-	1040	
	24 h ct	98,30%	0,99%	-	-	0,19%	0,29%	0,19%	1002	
	24 h tox	87,03%	11,59%	0,38%	0,09%	0,68%	0,19%	-	1026	
	48 h ct	94,26%	5,25%	-	-	0,38%	0,09%	-	1028	
	48 h tox	80,07%	18,30%	0,72%	0,18%	0,27%	0,27%	0,18%	1109	
HeLa	8 h ct	94,96%	3,62%	1,05%	0,35%	-	-	-	854	
	8 h tox	88,64%	9,59%	1,25%	0,50%	-	-	-	1594	
	24 h ct	94,25%	5,00%	0,37%	0,37%	-	-	-	540	
	24 h tox	88,53%	9,87%	1,11%	0,47%	-	-	-	628	
	48 h ct	92,45%	6,56%	0,88%	0,09%	-	-	-	1021	
	48 h tox	86,14%	10,87%	2,02%	0,95%	-	-	-	938	

a. número total de células contadas

b. células controle

c. células tratadas com CNF 2

d. não observado

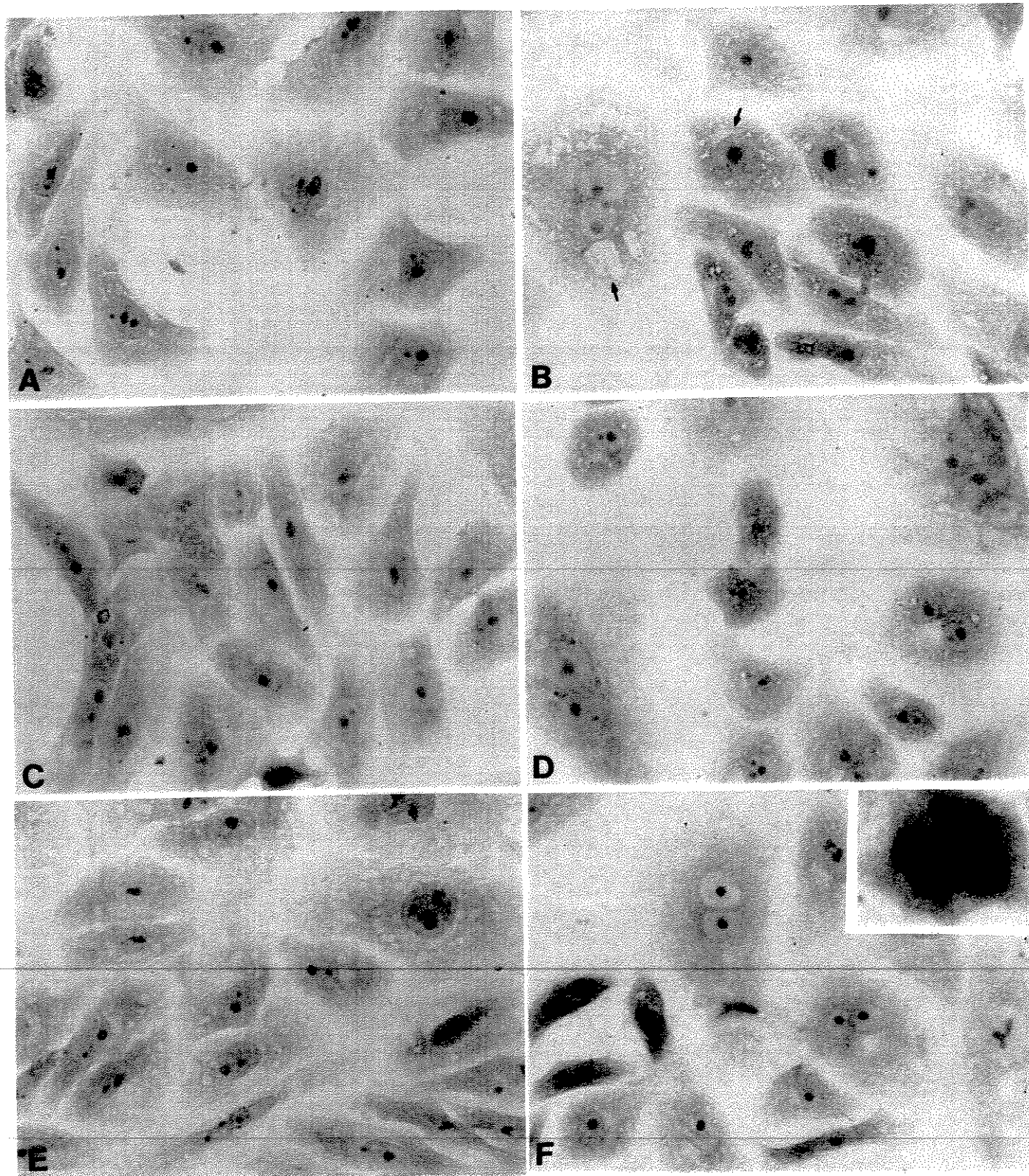


Figura 9 - Células Vero coradas com Azul de Toluidina. A - células controle, 8 horas de incubação; B - células tratadas com CNF 2, 8 horas de incubação; C - células controle, 24 horas de incubação; D - células tratadas com CNF 2, 24 horas de incubação; E - células controle, 48 horas de incubação; F - células tratadas com CNF 2, 48 horas de incubação. As setas em B apontam grandes vesículas perinucleares. A região em destaque em F apresenta uma célula em divisão tetrapolar. Aumento: 500 X

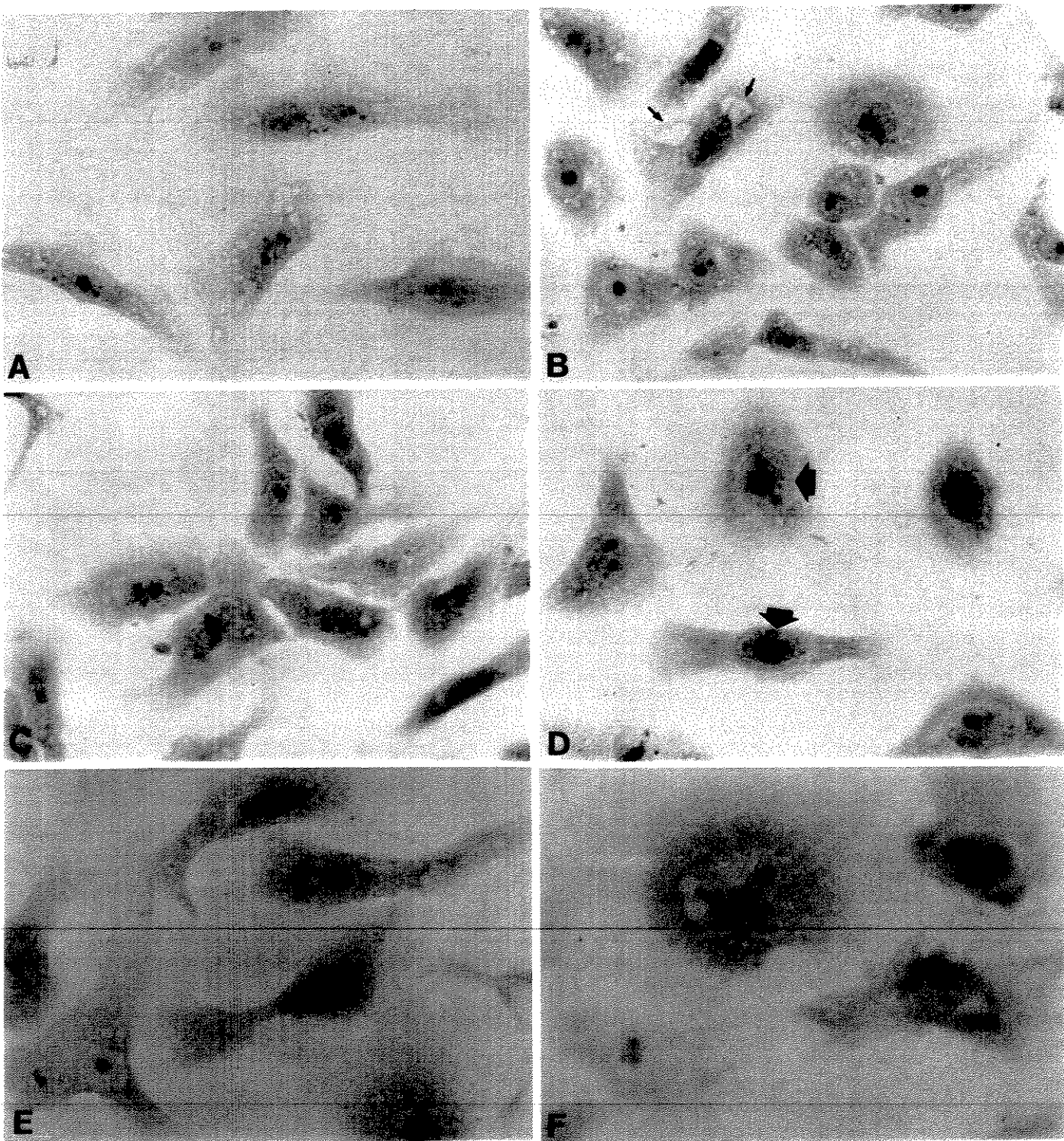


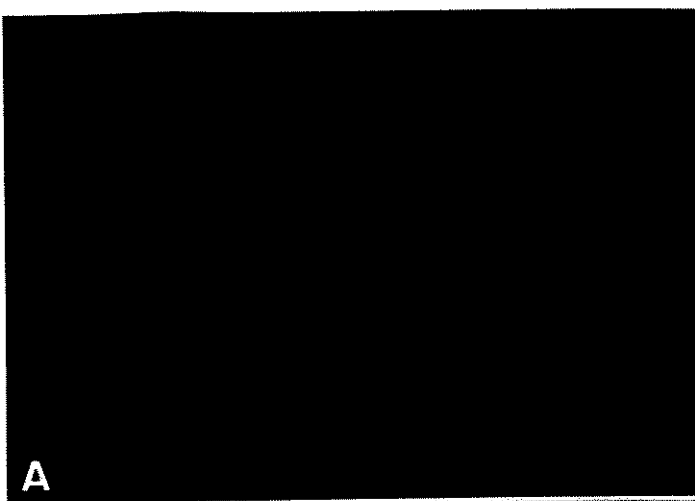
Figura 10 - Células HeLa coradas com Azul de Toluidina. A - células controle, 8 horas de incubação; B - células tratadas com CNF 2, 8 horas de incubação; C - células controle, 24 horas de incubação; D - células tratadas com CNF 2, 24 horas de incubação; E - células controle, 48 horas de incubação; F - células tratadas com CNF 2, 48 horas de incubação. As setas em B apontam a formação de vesículas perinucleares. As setas em D, apontam núcleos com acúmulo de material metacromático. Aumento: 500 X

5.3.2. Identificação dos componentes do citoesqueleto

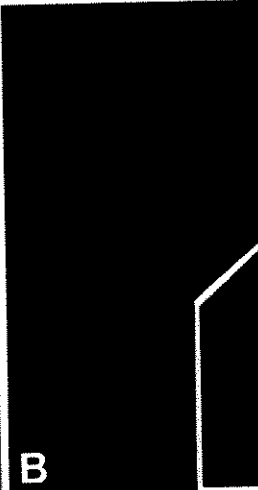
No estudo da identificação dos componentes do citoesqueleto, foram observadas as possíveis modificações dos filamentos de actina e dos microtúbulos, através de microscopia de fluorescência.

Foi possível observar que há formação de fibras de estresse, caracterizada pela formação e espessamento de feixes de filamentos de actina. Após o tratamento, pode-se observar que ocorre o desaparecimento da malha fina dos filamentos de actina, observadas nas células controle. Essas alterações podem ser observadas já com 8 horas de tratamento e se acentuam com o passar do tempo (Figuras 11 e 12).

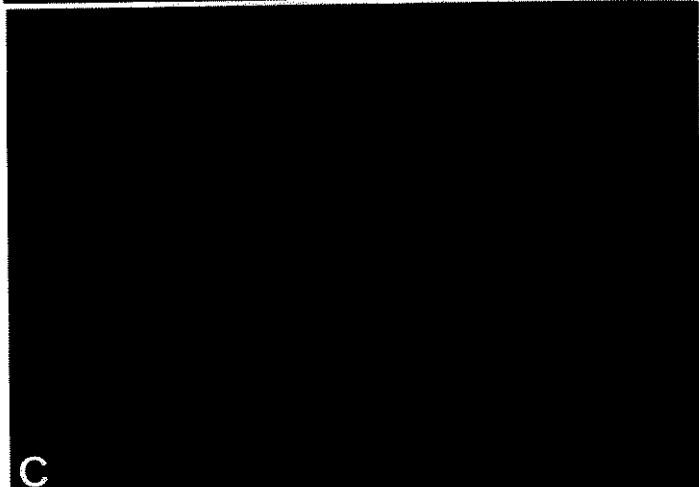
No estudo dos microtúbulos, não foram observadas modificações evidentes, em qualquer dos tempos observados. Foi possível observar, no entanto, uma sutil modificação destes filamentos quando na presença de vários núcleos (Figuras 11 e 12).



A



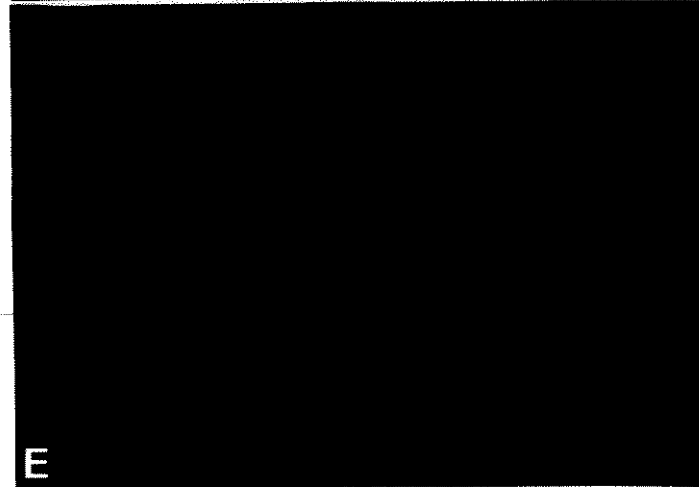
B



C



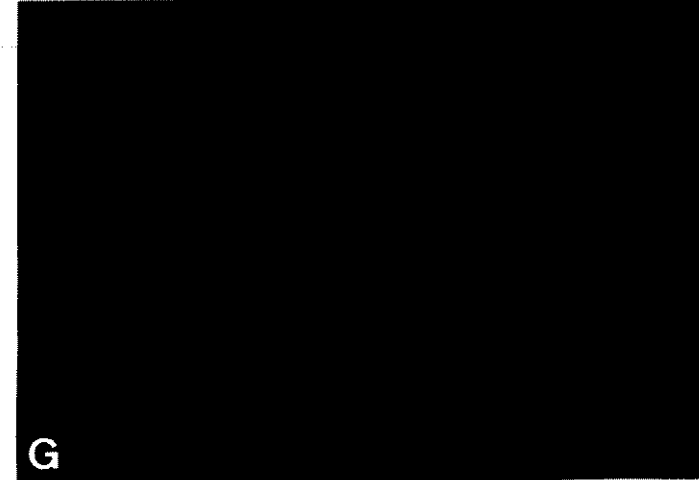
D



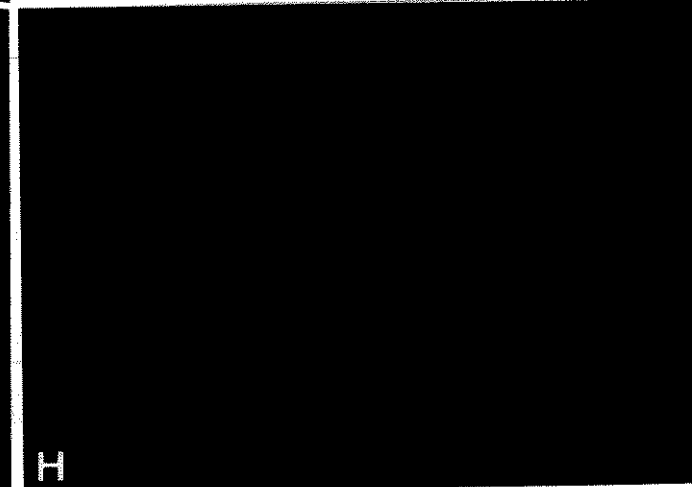
E



F



G



H

A

B

C

D

E

F

G

H

6. Estudo epidemiológico

O estudo epidemiológico foi realizado com 273 amostras de bezerros com diarreia isoladas da região sudeste do Brasil.

Do total de 273 amostras, 71 (26,00%) foram positivas para produção de citotoxinas, enquanto que 48 amostras (17,58%) produziram ou α -hemolisina ou enterohemolisina. Os resultados da produção de citotoxinas e hemolisinas podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6 - Produção de citotoxinas e hemolisinas em amostras isoladas de bezerros da região sudeste do Brasil.

Citotoxinas	Hemolisinas	Nº de amostras positivas (%) (n=273)
CNF		52 (19,05)
VT		19 (6,96)
LT		0
	α -hemolisina	37 (13,55)
	Enterohemolisina	11 (4,03)

DISCUSSÃO

Caprioli *et al.* (1983), ao descreverem pela primeira vez o Fator Necrosante Citotóxico, verificaram que essa citotoxina não era liberada em meio de cultura, necessitando de uma forma de rompimento celular para sua solubilização. Portanto, procurou-se estabelecer uma metodologia de extração desta citotoxina que fosse eficaz já que, para os objetivos propostos neste trabalho, eram necessárias grandes quantidades da proteína com título de efeito biológico significativos.

Deste modo, através de dados obtidos na literatura, foram buscados os possíveis métodos de extração de citotoxinas que se encontram no interior das células bacterianas. Foram realizadas tentativas através de processos químicos, com o uso de Mitomicina C e Polimixina B e físicos, através de “freeze-thawing” (congelamento e descongelamento) e ultra-som.

Após a realização do ensaio biológico em células Vero, foi verificado que a extração do CNF 2 por Mitomicina C e por ultra-som apresentaram títulos de atividade biológica semelhantes aos encontrados através da extração por Polimixina B e “freeze-thawing” (Tabela 1). A extração por Mitomicina C e ultra-som é o que convencionalmente vem sendo realizada para CNF e foram, neste trabalho, as metodologias que apresentaram resultados mais favoráveis para a extração de CNF. A extração por Mitomicina C é usualmente utilizada para extração do CNF em estudos epidemiológicos, quando a quantidade de amostras é elevada (Alonso *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1988; Blanco *et al.*, 1992b). Já o método por ultra-som é também descrito para a extração do CNF, principalmente em trabalhos de purificação (De Rycke *et al.*, 1989; Falzano *et al.*, 1993).

Proporcionalmente, a extração por Mitomicina C é mais satisfatória do que a extração por ultra-som devido à concentração do precipitado bacteriano que se faz antes da sonicação. Porém, a utilização da Mitomicina C na extração do CNF 2 poderia ser um fator que comprometeria o andamento do trabalho, tanto na dificuldade de aquisição da Mitomicina C, não vendido comercialmente, quanto nos processos seguintes de purificação, onde todas as proteínas do meio de cultura estariam envolvidas no processo de purificação. Além disso, quando a Mitomicina C é adicionada ao crescimento bacteriano, o CNF 2 fica disperso no meio de cultura, dificultando, assim, a sua concentração.

A metodologia adotada neste trabalho para a extração do CNF 2 foi através do rompimento celular por ultra-som. Este método permitia a concentração do crescimento bacteriano para um volume desejado, além da possibilidade da lavagem das células bacterianas para a retirada dos contaminantes do meio de cultura. Por outro lado, a extração por ultra-som acarretava na liberação de todo o conteúdo celular bacteriano no tampão.

De Rycke *et al.* (1989) utilizaram a precipitação por sulfato de amônia como o primeiro passo do processo de purificação de CNF 1. No presente estudo, verificou-se que o CNF 2 era precipitado a uma saturação de 60% de sulfato de amônia, o que permitiu a realização de um fracionamento inicial a 30% de saturação, onde as proteínas de pesos moleculares maiores, como moléculas de DNA e RNA, poderiam ser excluídas do extrato a ser cromatografado. De Rycke *et al.* (1989), porém, utilizaram 50% de saturação de sulfato de amônia para a precipitação do CNF 1. Neste trabalho foi também realizada a precipitação a 50 e 60% de sulfato de amônia, onde constatou-se que havia maior atividade biológica na fração precipitada a 60%.

Devido às semelhanças existentes entre CNF 1 e CNF 2 foi utilizada a mesma metodologia descrita por De Rycke *et al.* (1989) para a purificação de CNF 1, de modo a ser feita a purificação do CNF 2. Portanto, a escolha dos tampões bem como a utilização de resinas de troca aniônica e de gel filtração foram realizadas de acordo com os ensaios de purificação de CNF 1, descrito por De Rycke *et al.* (1989).

A purificação do CNF 2 foi obtida através de 3 processos básicos: precipitação fracionada com sulfato de amônia, cromatografia em resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow e cromatografia em resina de gel filtração Superdex 200.

A cromatografia em gel filtração foi realizada em Superdex 200, resina esta que se mostrou muito eficiente no processo de purificação do CNF 2. Foi possível observar, porém, que a eficiência de Superdex 200 depende integralmente da quantidade de proteína aplicada na resina. No decorrer deste trabalho, verificou-se que eram necessárias cerca de 3 mg de proteína para que fosse possível identificar os picos protéicos, além da atividade biológica poder ser facilmente detectada.

Observou-se aumentos de atividade específica consideráveis (Tabela 2), nos mesmos níveis encontrados em trabalhos de purificação de outras toxinas (Brown *et al.*, 1982; O'Brien & Laveck, 1983). O grau de pureza do CNF 2 aumentou cerca de 8.000 vezes a partir do extrato sonicado até a eluição de Superdex 200.

Considerando-se que o CNF 2 esteja purificado e sabendo que a concentração do CNF 2 após a eluição de Superdex 200 é de 70 µg/ml, e que com essa concentração é possível verificar atividade biológica até a diluição de 1:512 em células Vero, são necessários, então, 13 ng de CNF 2 para que ocorra as alterações celulares características de CNF 2.

A quantidade de CNF 2 necessária para desencadear uma resposta celular é relativamente elevada quando comparada, por exemplo, com verotoxinas. Sabe-se que para VT 1 e SLT-IIva são necessários apenas 1 pg e 20 pg dessas proteínas, respectivamente, para que seja observada a atividade biológica em células (Ohmura *et al.*, 1993). Apesar de serem necessárias quantidades maiores de CNF 2 para desencadear uma resposta biológica nas células, este fato provavelmente não é significativo, já que não se tem descrição de títulos de atividade biológica de CNF muito elevados, além de creditarem às amostras produtoras de CNF um baixo índice de produção da citotoxina (De Rycke *et al.*, 1989).

No início deste trabalho, foi utilizada a resina de troca aniônica DEAE-Sephacryl Fast Flow (Pharmacia). Através de perfis eletroforéticos, foi constatado que esta metodologia não estava sendo eficiente no processo de purificação, mesmo quando o material eluído de DEAE-Sephacryl Fast Flow foi cromatografado em resinas de gel filtração como Sepharose CL6B e CL4B e Sephacryl S200, S300 e S400 (Pharmacia). Apesar do material eluído de DEAE-Sephacryl Fast Flow não apresentar melhora significativa no grau de pureza, quando este era submetido à cromatografia em gel filtração, também não ocorriam evidências de purificação, uma vez que em géis de eletroforese eram observadas inúmeras bandas após qualquer processo cromatográfico (dados não apresentados). Foi possível observar também, que a utilização das resinas de gel filtração como primeiro processo de purificação também não foram processos eficientes de purificação do CNF 2.

No entanto, é possível supor que a cromatografia em DEAE-Sephacryl Fast Flow possa apresentar resultados mais satisfatórios se forem feitos gradientes com intervalos menores de concentração de NaCl e com maior volume de tampão. Em verdade,

é bem provável que não houve progresso no processo de purificação através da cromatografia em DEAE-Sepharose Fast Flow por serem feitos gradientes de intervalo muito extensos (de 0 a 1 M), com pequena quantidade de tampão (aproximadamente 700 ml).

Foram também realizadas cromatografias em resina Shimpack Diol-150 (Shimadzu) em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC, Shimadzu). O material aplicado nesta resina foi obtido através das cromatografias em DEAE-Sepharose Fast Flow e Sepharose CL6B. O material eluído de Shimpack Diol-150, coletado de um dos picos protéicos apresentava, aparentemente em PAGE convencional, apenas uma banda protéica correspondente ao CNF 2. A atividade biológica não foi detectada após a passagem do CNF 2 por esta resina mesmo após a concentração do material em aproximadamente 100 vezes. Por esse motivo, não se pode comprovar que aquele material era realmente o CNF 2 (resultados não apresentados).

A primeira evidência de purificação do CNF 2 foi observada através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC), com a utilização da resina de troca aniônica Mono-Q (Pharmacia), com eluição por gradiente não linear de cloreto de sódio. Apesar da produtividade da resina ser baixa, devido ao volume da resina de 1 ml, a reprodutibilidade dos perfis cromatográficos era extremamente satisfatória, não ocorrendo sequer pequenas alterações. O grau de pureza do CNF 2 obtido após a cromatografia em Mono-Q era excelente, onde, após eletroforese em PAGE convencional, era possível a visualização de apenas 4 bandas protéicas (resultados não apresentados).

Apesar de resultados favoráveis ao processo de purificação que vinha sendo obtida com a cromatografia em Mono-Q, este procedimento foi abandonado devido à problemas na resina, provavelmente causados pelas impurezas presentes no material que

estava sendo aplicado na resina, que pode ter se tornado tão evidente em um curto período de tempo devido ao tamanho da coluna. Como as expectativas de uso da resina não eram favoráveis, buscou-se uma outra alternativa para o processo de purificação do CNF 2.

Um problema que constantemente esteve presente no decorrer deste estudo foi a dificuldade em manter a atividade biológica do CNF 2. Blanco & Blanco (1993a) haviam observado que a atividade biológica tanto de CNF 1 como de CNF 2 era facilmente perdida, suportando apenas duas semanas de estoque, mesmo quando acondicionadas em baixas temperaturas (-20°C). No decorrer deste trabalho, porém, a atividade biológica não foi perdida em apenas duas semanas, apesar de também estarem acondicionadas a temperatura de -20°C . Contudo, pode ser verificada uma diminuição contínua da atividade biológica, o que em processos de purificação poderia ser extremamente significativo. Provavelmente deve ocorrer a perda de atividade biológica e, quando se tem poucas quantidades de CNF 2 no extrato, é possível que a atividade biológica não seja mais detectada. Assim, se o CNF 2 estiver em maiores concentrações, a perda de atividade passa a ser gradual, como ocorreu neste caso. Uma possibilidade de explicação da perda de atividade biológica estaria relacionada com o conceito de termolabilidade, atribuído ao CNF (Caprioli *et al.*, 1983). Por serem termo-lábeis, estas citotoxinas apresentam maior instabilidade, podendo, dessa forma, deformar sua estrutura terciária, que, em última instância, acarretaria na perda da atividade biológica.

Com o CNF 2 purificado, procurou-se fazer a caracterização dessa proteína. Para tanto, utilizou-se eletroforese em gel de poliacrilamida para a determinação do massa molecular e da existência de subunidades, ensaios com antissoros e estudos de alterações celulares provocadas pelo CNF 2.

Através da eletroforese em gel de poliacrilamida convencional (PAGE) (Figura 4) foi possível observar a presença de apenas uma banda protéica, indicando que CNF 2 apresenta alto grau de pureza.

Através da análise do perfil eletroforético de CNF 2 em condições denaturantes, foi possível observar a presença de 2 bandas protéicas, sugerindo que a molécula de CNF 2 seja constituída por subunidades, sendo uma de massa molecular de 50,932 kDa e possivelmente, duas de massa molecular de 30,017 kDa, que somadas representam uma proteína de 110,966 kDa, muito próxima da massa molecular que vem sendo descrita para CNF 2, de 110 kDa.

A produção de antissoros em coelho e camundongos foi realizada a fim de que pudessem ser realizados ensaios que caracterizassem o CNF 2. Em ensaio de soroneutralização em cultura de células Vero, tanto o antissoro de coelho como o antissoro de camundongo apresentaram efeito neutralizante sobre CNF 1 com título de 1:64 e sobre CNF 2 com título de 1:512. Não foram neutralizadas as atividades biológicas de VT 1, VT 2 e LT I (Tabela 3). Utilizando o antissoro anti-CNF 2 foi possível observar que o título de neutralização apresentado pelo CNF 2 é 8 vezes maior do que o título apresentado pelo CNF 1. Esses resultados estão de acordo com as observações de Oswald & De Rycke (1990), que afirmam que o efeito de soroneutralização é de 4 a 8 vezes maior na presença de seu homólogo.

Foi também realizado um ensaio de soroneutralização de CNF 2 com o antissoro anti-CLDT (Toxina Citoletal Distensora). A princípio, este antissoro foi capaz de neutralizar o efeito de CNF 2 sobre células Vero até a diluição de 1:32 (resultados não apresentados). Apesar da visualização do efeito biológico de CNF 2 e CLDT serem distintos, as citotoxinas poderiam apresentar epítomos semelhantes. Pérès *et al.* (1997)

afirmam que existem homologias entre a sequência nucleotídica de CNF e CLDT. No entanto, os ensaios que correlacionem CNF à CLDT precisam ser repetidos e bem caracterizados para que a associação entre estas duas citotoxinas seja esclarecida.

O título de soroneutralização dos antissoros de coelho e camundongos não foi considerado excelente, já que espera-se títulos neutralizantes superiores à diluição de 1:1.000. Porém, julgou-se o título obtido como sendo satisfatório para dar início aos processos de padronização de ELISA.

Quando o processo de padronização do ELISA foi iniciado, verificou-se que o antissoro de camundongo teria que ser utilizado na diluição de 1:100 e que o antissoro de coelho poderia ser utilizado na diluição de 1:2.000. A diluição do antissoro de camundongo a ser utilizada não era satisfatória, principalmente pelo fato de se trabalhar com um antissoro policlonal, onde a utilização deste soro em altas diluições poderia tornar a reação inespecífica.

A utilização de antissoros produzidos em coelhos já vinha sendo utilizada por vários autores (De Rycke *et al.*, 1989; Tabouret & De Rycke, 1990; Oswald *et al.*, 1994a). Os autores que trabalharam com a produção de antissoros para obtenção de anticorpos secundários para CNF 1 e CNF 2 fizeram esta produção em carneiros (Tabouret & De Rycke, 1990; Oswald *et al.*, 1994a).

Na literatura não se encontra dados referentes à produção de antissoros anti-CNF 2 em camundongo. O que se pode verificar, é a pequena quantidade de antissoro obtida através da inoculação em camundongo, principalmente por trabalhar com um antissoro que não apresentava título de soroneutralização elevado (1: 512).

Diante da baixa titulação do antissoro de camundongo, foi considerada a hipótese de ocorrerem muitas reações de falso positivo quando fossem testadas amostras

de campo. Assim, resolveu-se optar pela purificação da IgG de camundongo, realizada através da cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A (Figura 7).

Nos ensaios de ELISA, após os procedimentos de padronização, foram constatadas reações cruzadas com os sobrenadantes de cultura das citotoxinas VT 1, VT 2, LT I, além de serem encontradas reações positivas quando foram utilizadas VT 1 e VT 2 purificadas. Quando o meio de cultura foi adicionado ao ensaio, não foram verificadas leituras que pudessem indicar uma reação positiva. As leituras de absorbância para ambas as citotoxinas não apresentaram diferenças significativas, com as quais não foi possível estabelecer uma relação de positividade para as amostras produtoras de CNF 2 ou até mesmo uma relação que permitisse uma reação cruzada com CNF 1. Desta forma, o ELISA poderia ser utilizado como uma forma de detecção de amostras produtoras de CNF, não fazendo a distinção entre CNF 1 e CNF 2.

Por outro lado, se no ensaio de ELISA fossem encontradas reações positivas apenas com os sobrenadantes de VT 1 e VT 2, poderia ser que o problema estaria na forma de extração dessas citotoxinas, uma vez que somente o meio de cultura não apresentava resultados positivos. Porém, as citotoxinas VT 1 e VT 2 purificadas também foram reconhecidas pelo antissoro, na mesma intensidade de outras amostras.

Alguns autores padronizaram a técnica de ELISA para a detecção de CNF 1 (Tabouret & De Rycke, 1990) e CNF 2 (Oswald *et al.*, 1994a). Ambos os autores utilizaram extrato bacteriano para a inoculação dos animais. O soro, porém, foi absorvido com o extrato de uma bactéria geneticamente modificada, que não produzia a toxina que foi inoculada. No caso dos antissoros obtidos para CNF 2, após a absorção destes, foi possível determinar um valor positivo/negativo (P/N), onde somente as amostras dos antissoros homólogos fossem reconhecidos, uma vez que sempre era verificada a produção

de reações cruzadas com CNF 1 (Oswald *et al.*, 1994). No caso dos antissoros obtidos para CNF 1, os mesmos autores afirmam que não houve reconhecimento de CNF 1 nos ensaios de ELISA, nem mesmo de VT 1 e VT 2. Os antissoros apenas foram capazes de soroneutralizar parcialmente CNF 1 em ensaios em cultura de tecidos, o que já era previsto diante de outros ensaios realizados anteriormente. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que não houve relação imunológica entre CNF e verotoxinas (Tabouret & De Rycke, 1990).

Com os problemas enfrentados nos ensaios de ELISA, procurou-se outras alternativas que pudessem caracterizar melhor os antissoros que estavam disponíveis. Através do ensaio de imunodifusão radial dupla, foi possível observar que havia o reconhecimento de CNF 1 e de CNF 2 pelo antissoro de coelho (Figura 6A) e pela IgG de camundongo purificada (Figura 6B). No ensaio com o antissoro de coelho pode-se constatar que havia uma identidade parcial entre CNF 1 e CNF 2. Com a IgG de camundongo pode-se notar que também ocorre identidade parcial entre CNF 1 e CNF 2 (Figura 6B).

Quando o antissoro de coelho foi absorvido com extrato bruto sonificado de CNF 1, não foi verificada mais a linha de precipitação com o CNF 1, formando-se apenas a linha de precipitação com CNF 2 (Figura 6C). Os mesmos resultados não foram observados quando a IgG de camundongo foi absorvida com o CNF 1. Não ocorreram formações de linha de precipitação nem com CNF 1, nem com CNF 2. O que provavelmente deve ter ocorrido é que a IgG de camundongo, ao ser absorvida com o CNF 1, diluiu-se a ponto de não ter anticorpos suficientes para a formação de uma linha de precipitação, levando-se em consideração também, que já nos ensaios de ELISA a IgG de camundongo não se mostrou eficiente. Uma outra possibilidade para o não reconhecimento

tanto de CNF 1 como de CNF 2 pelo antissoro de camundongo seria a de que os anticorpos de camundongo reconhecessem somente epítomos comuns entre CNF 1 e CNF 2, sugerindo que na estrutura destas citotoxinas existiria dominância de um epítomo sobre outros na mesma molécula.

Ensaio de imunodifusão radial dupla foram também realizados com as citotoxinas VT 1, VT 2 e LT I para que se pudesse verificar se havia reconhecimento dos antissoros com essas toxinas (resultados não apresentados). Não foram observadas linhas de precipitação, mas os resultados não podem ser conclusivos porque neste ensaio foram utilizados sobrenadantes de cultura de ambas as citotoxinas, além de VT 1 e VT 2 purificadas. É provável que as linhas de precipitação não tenham se formado devido às baixas concentrações destas citotoxinas nestes sobrenadantes.

Foram realizados ensaios de “dot-blot” a fim de se confirmar o reconhecimento de CNF 1, VT 1, VT 2 e LT I, obtidos no ELISA. Foi possível verificar que tanto o soro de coelho como a IgG de camundongo reconheceram todos os antígenos testados, não reconhecendo apenas o meio de cultura (Figura 8A e 8B). No ensaio realizado nos mesmos moldes do ELISA, onde a IgG de camundongo foi utilizada para “sensibilizar” a membrana, foi verificado um aumento ainda maior da reação (Figura 8C).

Em ensaios de “western-blot” os resultados observados não foram favoráveis quanto ao reconhecimento dos antissoros frente as bandas protéicas que correspondessem ao CNF 2, tanto em PAGE convencional como em SDS-PAGE. Esses resultados apenas confirmaram que os antissoros obtidos não eram específicos e tão pouco eram eficientes no reconhecimento do CNF 2.

Após serem realizados ensaios de reação antígeno-anticorpo foi possível observar que tanto o antissoro de coelho como o de camundongo não foram específicos

para CNF 2, reconhecendo, também, outras citotoxinas. O único ensaio em que os antissoros se mostraram específicos foi no ensaio de soroneutralização em células Vero (Tabela 3). É possível que nos antissoros estivessem presentes anticorpos contra epítomos que fossem responsáveis pela ligação da citotoxina aos receptores celulares, impedindo, desta forma, a ligação da citotoxina nas células. Assim, somente neste momento estaria sendo caracterizada especificidade contra CNF 1 e CNF 2, em títulos diferentes.

Apesar de alguns autores utilizarem como metodologia de inoculação uma banda protéica excisada do gel de poliacrilamida, esta não é a forma mais comumente encontrada na literatura. Neste trabalho optou-se pela utilização deste método apenas como uma alternativa às dificuldades que vinham sendo encontradas no processo de purificação. Em inoculações anteriores com material semi-purificado, conseguiu-se a obtenção de títulos de soroneutralização iguais aos obtidos com a inoculação da banda protéica correspondente ao CNF 2 (resultados não apresentados). Isso pode indicar que esta metodologia que utiliza a proteína extraída do gel de poliacrilamida não seja eficiente. Uma outra hipótese seria a de que o material eluído do PAGE convencional pudesse, em parte, perder a sua capacidade imunogênica e por isso não alcançaria títulos maiores. Assim, uma hipótese para o baixo rendimento dos antissoros poderia estar relacionada ao esquema de imunização empregado.

No estudo da viabilidade celular foi possível constatar que as células HeLa são mais sensíveis ao tratamento com CNF 2, quando comparadas às células Vero. Após 24 horas de ensaio as células Vero não perdem sua viabilidade após o tratamento com CNF 2, enquanto que as células HeLa, após 24 horas de ensaio perderam cerca de 12% de sua viabilidade. Esses resultados que mostram as diferenças entre a sensibilidade de células Vero e HeLa foram obtidos por Caprioli *et al.* (1983), que, no entanto, afirmaram que não

ocorria perda de viabilidade celular mesmo após 5 dias de ensaio e que as células HeLa poderiam morrer após 60 horas de ensaio se o meio de cultura celular não fosse substituído. De Rycke *et al.* (1990b), por outro lado, afirmaram que o CNF 2 causa perda parcial de viabilidade quando ensaiadas em células HeLa. Os resultados obtidos apresentaram alguns dados que contradizem estas afirmações quanto a ocorrência de perda ou não de viabilidade de células HeLa tratadas tanto com CNF 1 como com CNF 2.

Os resultados apresentados no estudo de viabilidade celular mostraram que, após 24 horas de ensaio, as células Vero não apresentam perda de viabilidade quando tratadas com CNF 1 e CNF 2. Como o esperado, as células tratadas com LT I também não perderam sua viabilidade enquanto que as células tratadas com VT 1 e VT 2 a perderam, em parte. Já nas células HeLa, foi verificada uma perda parcial da viabilidade das células que receberam CNF 1 e CNF 2 (12%), onde os controles LT I, VT 1 e VT 2 apresentaram os resultados esperados (Tabela 4).

Supõe-se que a perda de viabilidade celular provavelmente esteja associada à quantidade de CNF aplicada sobre as células. Neste ensaio, todas as toxinas foram extraídas da mesma forma e utilizadas nas mesmas diluições. Nos vários ensaios realizados no decorrer do trabalho, foi possível observar, por diversas vezes, que o CNF 2 provocava a morte celular quando pouco diluído e, que a morte estaria relacionada com o CNF, já que controles negativos, como meio de cultura e sobrenadante de amostra negativa para qualquer citotoxina não provocaram a morte celular.

Caprioli *et al.* (1983) foram os primeiros autores a verificar o efeito da multinucleação, que vem sido repetidamente observado. Outros autores citam a multinucleação celular como uma característica fundamental do CNF (De Rycke *et al.*, 1989; Oswald *et al.*, 1989; Blanco *et al.*, 1988). O primeiro estudo quantitativo em relação

à multinucleação foi realizado por Fiorentini *et al.* (1988) que observaram, em células HEp-2, um alto índice de células multinucleadas após 48 horas de ensaio com CNF 1.

Nos experimentos realizados neste trabalho, verificou-se que o efeito de multinucleação celular em células Vero e HeLa tratadas com CNF 2 ocorria já nas primeiras 8 horas de ensaio, e que esse efeito de multinucleação aumentava de acordo com o tempo de incubação (Tabela 5 e Figuras 9 e 10). O efeito de multinucleação celular foi mais claramente observado nas células Vero. Notou-se ainda, que as células HeLa apresentaram maior polimorfismo quanto à quantidade de núcleos. Nas células HeLa foi possível a observação de células com até 4 ou mais núcleos em células controle, o que não ocorreu em células Vero, onde a presença de 3 e 4 ou mais núcleos não foi observada nas células controle, sendo observada somente com o tratamento das células com CNF 2 (Tabela 5). Foi possível observar ainda, que as células apresentam regiões com grandes vacúolos (Figuras 9B e 10B) e algumas células aparentemente apresentam um acúmulo de RNA no núcleo (Figura 10D).

De Rycke *et al.* (1990b), apesar de não apresentarem resultados quantitativos, já haviam mencionado que a multinucleação causada por CNF 1 era mais evidente do que a multinucleação provocada por CNF 2. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho e os resultados obtidos por Fiorentini *et al.* (1988), a afirmação de De Rycke *et al.* (1990b) se faz verdadeira, sendo comprovada pelas análises quantitativas.

As alterações de citoesqueleto ocasionadas pelo CNF 1 e CNF 2 devem-se, ao menos em parte, às ligações que a molécula protéica da citotoxina faz com as GTPases Rho. Hoje já se sabe que as GTPases Rho são as proteínas responsáveis pelo controle da formação dos filamentos de actina (Hall, 1994). A ligação do CNF 1 ou do CNF 2 à molécula de GTPase Rho faz com que essa molécula se torne ativa, induzindo a

polimerização dos filamentos de actina, com pontos de concentração destes filamentos (Fiorentini *et al.*, 1995).

Nos ensaios realizados neste trabalho, pode-se observar a ocorrência de formação de feixes espessos de filamentos de actina, que percorrem toda a extensão celular, com apenas 8 horas de tratamento com o CNF 2 (Figuras 11 e 12). Fiorentini *et al.* (1988) observaram que, com 6 horas de tratamento com CNF 1, as células HEP-2 apresentavam os feixes apenas na região das bordas da célula. De acordo com esses resultados, não foi possível apontar diferenças ou mesmo serem feitas associações entre CNF 1 e CNF 2, devido às condições utilizadas em um e outro tratamento serem muito adversas.

Oswald *et al.* (1994c) observaram que a reorganização dos filamentos de actina, precedida pelo efeito de multinucleação, foi observada somente após 48-72 horas de exposição ao CNF 2. Essas observações foram realizadas em células HEP-2, o que poderia ser um fator que permitisse a observação de diferenças entre esses resultados e os resultados apresentados neste trabalho. Porém, é provável que o fator célula não seja extremamente relevante na formação das fibras de estresse, uma vez que os filamentos de actina estão presentes em ambas as células, fazendo parte do citoesqueleto celular.

Com os resultados apresentados por Fiorentini *et al.* (1988) e Oswald *et al.* (1994c), que utilizaram o mesmo modelo celular, pode-se verificar que o efeito de formação de fibras de estresse por CNF 1 e CNF 2 é praticamente o mesmo. Não existe nenhum dado na literatura que indique que CNF 1 e CNF 2 causem efeitos distintos sobre os filamento de actina. Foi possível notar, de acordo com os experimentos realizados, que o mesmo efeito de formação de feixes espessos foi produzido em células Vero tratadas com CNF 2, à semelhança do que se encontra na literatura.

Fiorentini *et al.* (1988) constataram pequenas alterações nos microtúbulos, principalmente na região perinuclear, possivelmente associadas com a segmentação nuclear. Nos experimentos realizados neste trabalho, também foram observadas modificações muito sutis na distribuição destes filamentos, que, acredita-se, referem-se apenas a uma adaptação dos filamentos à presença de mais de um núcleo. Assim, a alteração seria um efeito secundário à ação da citotoxina, que não estaria ocorrendo devido a ação direta do CNF 2 sobre os microtúbulos.

Uma vez que o CNF 2 é capaz de alterar os filamentos de actina, é possível que a movimentação dos componentes celulares esteja prejudicada, já que os filamentos de actina são também, responsáveis por esta função. Assim, pode-se supor que a formação de grandes vacúolos (Figuras 9B e 10B) esteja relacionada à perda de algumas funções dos filamentos de actina e pela dificuldade de locomoção no interior das células levaria à fusão desses vacúolos.

A epidemiologia em relação ao CNF foi realizada principalmente no fim da década de 80 e no início da década de 90, quando ainda se buscava dados que comprovassem a importância etiopatológica desta citotoxina tanto em humanos como em animais. Vários estudos com amostras isoladas de casos de infecções extraintestinais (Alonso *et al.*, 1987; Blanco *et al.*, 1992b; Caprioli *et al.*, 1987) e com amostras isoladas de fezes de humanos (Blanco *et al.*, 1991b; Blanco *et al.*, 1992c) foram realizados, sempre verificando-se a presença deste fator citotóxico sem, no entanto, associar o CNF como o responsável por uma patogenia. Os mesmos estudos epidemiológicos foram também realizados em animais com infecções intestinais e em animais sãos, onde também não foi verificada a relação entre presença de CNF e patogenia, devido ao CNF sempre estar

presente em fezes de animais sãos (Blanco *et al.*, 1993b; Blanco *et al.*, 1988; Burns *et al.*, 1996).

No estudo epidemiológico realizado, utilizando amostras bovinas, foi possível constatar a presença de CNF em 19,05% das amostras estudadas (Tabela 6), sendo que dessas amostras produtoras de CNF, 30,77% produziram também α -hemolisina e 3,84% produziram enterohemolisina. Além da presença de CNF, verificou-se a produção de VT (6,96%) e uma significativa produção de α -hemolisina (13,55%).

De acordo com os dados disponíveis na literatura, amostras isoladas de gado bovino são produtoras de CNF 2 e não apresentam associação com produção de hemolisina. Foi notável a associação de CNF à α -hemolisina encontrada neste estudo (30,77%). No entanto, através dos ensaios realizados, não foi possível determinar que o CNF produzido por estas amostras seja o CNF 2. Se essa afirmação fosse possível, poderia-se supor que as amostras isoladas no Brasil se caracterizam de forma diferente das amostras isoladas na Europa. Mesmo que as amostras estudadas apresentassem produção de CNF 1, este também seria um dado inédito, uma vez que quando se observa a produção de CNF 1 em amostras bovinas da Europa, são sempre em baixas proporções (Blanco *et al.*, 1993b; Blanco *et al.*, 1992a; Burns *et al.*, 1996).

No Brasil, poucos estudos em relação à prevalência do CNF têm sido realizados. As poucas referências que existem estão relacionadas a área humana. Com referência aos animais não existe nenhuma publicação a respeito. Assim, estudos desta ordem necessitam ser realizados com o objetivo de determinar se o CNF representa um fator epidemiológico a ser considerado.

CONCLUSÕES

1. A extração do Fator Necrosante Citotóxico do tipo 2 (CNF 2) foi realizada através do uso de Mitomicina C, Polimixina B, por ultra-som e congelamento e descongelamento ("freeze-thawing"). As extrações pelos diferentes métodos apresentaram pequenas diferenças no título da atividade biológica. A extração por ultra-som foi a metodologia escolhida neste trabalho, por melhor se adaptar aos objetivos propostos.

2. O CNF 2 apresentou alto grau de pureza após ser cromatografado em resina de troca aniônica Q-Sepharose Fast Flow (Pharmacia) e em resina de gel filtração em Superdex 200 (Pharmacia). A utilização destas resinas permitiu um aumento de 7.907 vezes no grau de pureza, com atividade específica final de 2.957,71.

3. O CNF 2 apresentou duas bandas protéicas após ser submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS, com massas moleculares estimadas em 50,932 kDa e 30,017 kDa, o que poderia indicar a presença de subunidades, sendo uma de 50,932 kDa e possivelmente duas de 30,017 kDa, que somadas representam uma proteína de 110,966 kDa.

4. Através de ensaios de soroneutralização em cultura de células, foi possível verificar a presença de reação cruzada entre CNF 1 e CNF 2, sendo que a neutralização ocorre em títulos mais elevados quando na presença de seu homólogo. O

antissoro anti-CLDT inibiu parcialmente o efeito biológico de CNF 2, provavelmente devido à presença de epítomos comuns entre essas duas citotoxinas.

5. A absorção do antissoro anti-CNF 2 com extrato bruto de CNF 1 impediu a formação de linha de precipitação contra CNF 1, em ensaios de imunodifusão radial dupla.

6. A amostra de *E. coli* B26a, além do efeito citopático em cultura de células, causou necrose em pele de coelho e na pata de camundongo, características das amostras produtoras de CNF 2

7. O CNF 2, assim como o CNF 1 não causaram perda de viabilidade das células Vero, causando, porém, uma pequena perda de viabilidade das células HeLa (12%), após 24 horas de ensaio.

8. O efeito de multinucleação celular provocado por CNF 2 é mais claramente observado em células Vero. Em células HeLa o efeito de multinucleação é perceptível, mas as células controle apresentam polimorfismos em relação à quantidade de núcleos.

9. O CNF 2 causa formação de feixes espessos de filamentos de actina (fibras de estresse) após 8 horas de tratamento. O efeito se acentua, conforme o aumento do tempo de incubação.

10. Não foram verificadas alterações nos microtúbulos, a não ser pela adaptação destes à presença de mais de um núcleo.

11. Foram verificadas porcentagens consideráveis de produção de CNF (19,05%) pelas amostras de bezerros isoladas na região sudeste do Brasil. Houve significativa correlação entre produção de CNF e produção de α -hemolisina (30,77%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, M.P., Blanco, J., Blanco, M. & González, E.A. Frequent production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from human urinary tract infections: relation with haemagglutination. *FEMS Microbiol. Lett.*, **48**: 391-396, 1987.
- Bertschinger, H.U. & Pohlen, Z.J. Coliform mastitis. In: Disease in swine, 5th ed., Iowa State University Press, cap. 46, pp. 491-496, 1984.
- Beutin, L., Montenegro, M., Zimmermann, S., Stephan, R. Characterization of hemolytic strains of *Escherichia coli* belonging to classical enteropathogenic O-serogroups. *Zentral. Bakteriolog. Hyg. A* **261**: 266-279, 1986.
- Beutin, L., Prada, J., Zimmermann, S., Stephan, R., Ørskov, I. & Ørskov, F. Enterohemolysin, a new type of hemolysin produced by some strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Zbl. Bakt. Hyg. A* **267**: 576-588, 1988.
- Blanco, J. & González, E.A. Características de los *Escherichia coli* que causan diarrea en seres humanos. *Enf. Infec. Y Microbiol. Clin.*, **3**: 145-150, 1985.
- Blanco, J., González, E.A., García, S., Blanco, M., Regueiro, B. & Bernázdez, I. Production of toxin by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-western Spain). *Vet. Microbiol.*, **18**: 297-311, 1988.

- Blanco, J., Alonso, M.P., González, E.A., Blanco, M., & Garabal, J.I. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor (CNF) by P-fimbriate strains. *J. Med. Microbiol.*, **31**: 175-183, 1990a.
- Blanco, J., Blanco, M., González, E.A., Alonso, M.P. & Garabal, J.I. Comparative evaluation of three tests for the detection of *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors (CNF 1 e CNF 2) using filtrates of cultures treated with mitomycin C. *FEMS Microbiol. Lett.*, **69**: 311-316, 1990b.
- Blanco, J., Blanco, M., Garabal, J.I. & González, E.A. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from human and animals. *Microbiologia Sem.*, **7**: 57-72, 1991a.
- Blanco, J., González, E.A., Blanco, M., Garabal, J.I., Alonso, M.P., Fernández, S., Villanueva, R., Aguilera, A., Garcia, M.A., Torres, J., Rey, A., Jansen, W.A. & Guinée, P.A.M. Enterotoxigenic, *Escherichia coli* associated with infant diarrhoea in Galicia, north western Spain. *J. Med. Microbiol.*, **35**: 162-167, 1991b.
- Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M.P., Blanco, J.E., Garabal, J.I. & González, E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF 1 and CNF 2. *FEMS Microbiol. Lett.*, **96**: 155-160, 1992a.

- Blanco, J., Blanco, M., Alonso, M.P., Blanco, J.E., González, E.A. & Garabal, J.I. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF 1). *Res. Microbiol.*, **143**: 869-878, 1992b.
- Blanco, J., González, E.A., Espinosa, P., Blanco, M., Garabal, J.I. & Alonso, M.P. Enterotoxigenic and necrotizing *Escherichia coli* in human diarrhoea in Spain. *Eur. J. Epidemiol.*, **8**: 548-552, 1992c.
- Blanco, J. & Blanco, M. *Escherichia coli* Enterotoxigenicos, Necrotoxigenicos y Verotoxigenicos de origen humano y bovino; patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico. In Servicio de Publicaciones Diputación Provincial, Lugo, Espanha, 1993a.
- Blanco, M., Blanco, J., González, E.A., Garabal, J.I. & Blanco, J.E. *Escherichia coli* toxógenos de origen bovino. *Med. Vet.*, **9**: 199-213, 1992d.
- Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J. & Ramos, J. Enterotoxigenic, verotoxigenic, and necrotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle in Spain. *Am. J. Vet. Res.*, **54**: 1446-1451, 1993b.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., Alonso, M.P., Balsalobre, C., Mourinho, M., Madrid, C. & Juárez, A. Polymerase chain reaction for detection of *Escherichia coli* strains producing Cytotoxic Necrotizing Factor type 1 and type 2 (CNF 1 and CNF 2). *J. Microbiol. Meth.*, **26**: 95-101, 1996.

- Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. Improved silver staining of plants proteins, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electroforesis*, **8**: 93-99, 1987.
- Borenfreund E. & Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J. Tissue Cult. Meth.*, **9**: 7-9, 1984.
- Brown, J.E., Griffin, D.E., Rothmans, S.W. & Doctor, B.P. Purification and biological characterization of shiga toxin from *Shigella dysenteriae* 1. *Infect. Immun.*, **36**: 966-1005, 1982.
- Burnensa, A., Frey, A., Lior, H. & Nicolet, J. Prevalence and clinical significance of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herd with and without calf diarrhoea. *J. Vet. Med. Biol.*, **42**: 301-318, 1995.
- Burns, A.L., Ball, H.J. & Finlay, D.A. CNF producing *Escherichia coli* isolated from cattle in Northern Ireland. *Vet. Microbiol.*, **49**: 235-341, 1996.
- Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L.G., Ruggeri, F.M. & Zona, C. Partial purification and characterization of *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.*, **39**: 1300-1306, 1983.

- Caprioli, A., Donelli, G., Falbo, V., Possentini, R., Roda, L.G., Roscetti, G. & Ruggeri, F.M. A Cell-Division Active Protein from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **118**:587-593, 1984.
- Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F.M., Baldassarri, L., Bisicchia, R., Ippolito, G., Romoli, E. & Donelli, G. Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.*, **25**: 146-149, 1987.
- Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M.R., Rubin, E.S. & Gill, D.M. The mamalian RhoC is ADP-ribosylated by *C. botulinum* exoenzyme C3 and affects microfilaments in Vero cells. *EMBO J.*, **9**: 1087-1092, 1989.
- Cherif, A., Contrepois, M., Picard, B., Goulet, P.L., De Rycke, J., Fairbrother, J. & Barnovin, J. Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol. Lett.*, **70**: 279-284, 1990.
- Clements, J.D. & Finkelstein, R.A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxin with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.*, **24**: 760-769, 1979.
- Davis, B.J. Disc electrophoresis II. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**:404-427, 1964.

- De, S.N. Enterotoxicity of bacteria-free culture filtrate of *Vibrio cholerae*. *Nature (London)*, **183**: 1533-1534, 1959.
- Dean, A.G., Ching, Y.C., Willians, R.G. & Harden, L.B. Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in the study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, **125**: 407-411, 1972.
- De Rycke, J., Phan-Thanh, L. & Bernard, S. Immunochemical Identification and Biological Characterization of Cytotoxic Necrotizing Factor from *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **27**:963-988, 1989.
- De Rycke, J. Toxic effects for lambs of Cytotoxic Necrotizing Factor from *Escherichia coli*. *Res. Vet. Sci.*, **49**: 349-354, 1990a.
- De Rycke, J., González, E.A., Blanco, J., Oswald, E., Blanco, M. & Boivin, R. Evidence for Two Types of Cytotoxic Necrotizing Factor in Human and Animal Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **28**:694-699, 1990b.
- De Rycke, J., Mazars, P., Nougayrede, J.P., Tasca, C., Boury, M., Herault, F., Valette, A. & Oswald, E. Mitotic block and delayed lethality in HeLa epithelial cells exposed to *Escherichia coli* BM2-1 producing Cytotoxic Necrotizing Factor type 1. *Infect. Immun.*, **64**: 1694-1705, 1996.

- Donta, S.T., Moon, H.W. & Whipp, S.C. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science* **183**: 334-336, 1974.
- Drasar, B.S. & Hill, M.J. Human intestinal flora: the distribution of bacterial flora in the intestine. London, Academic Press, pp. 36-43, 1974
- Dreyfus, L.A., Frantz, J.C. & Robertson, D.C. Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. *Infect. Immun.*, **42**: 539-548, 1983.
- El Mazouari, K., Oswald, E., Hernalsteens, J-P., Lintermans, P. & De Greve, H. F17-like fimbriae from a invasive *Escherichia coli* strain producing cytotoxic necrotizing factor type 2 toxin. *Infect. Immun.*, **62**: 2633-2638, 1994.
- Falbo, V., Farnigietti, M. & Caprioli, A. Gene block encoding production of Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and hemolysin in *Escherichia coli* isolates from extraintestinal infections. *Infect. Immun.*, **60**: 2182-2187, 1992.
- Falbo, V., Pace, T., Picci, L., Pizzi, E. & Caprioli, A. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding Cytotoxic Necrotizing Factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **61**: 4909-4914, 1993.

- Falzano, L., Fiorentini, C., Donelli, G., Michel, E., Cockes, C., Cossart, P., Cabanie, L., Oswald, E. & Boquet, P. Induction of phagocytic behavior in human epithelial cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor type 1. *Mol. Microbiol.* 9: 1247-1254, 1993.
- Fiorentini, C., Arancia, G., Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F.M. & Donelli, G. Cytoskeletal changes induced in Hep-2 cells by the Cytotoxic Necrotizing Factor of *Escherichia coli*. *Toxicon* 26: 1047-1056, 1988.
- Fiorentini, C., Donelli, G., Matarrese, P., Fabri, A., Paradise, S. & Boquet, P. *Escherichia coli* Cytotoxic Necrotizing Factor 1: evidence for induction of actin assembly by constitutive activation of the p21 Rho GTPase. *Infect. Immun.*, 63: 3936-3944, 1995.
- Gard, D.L. Confocal immunofluorescence microscopy of microtubules in amphibian oocytes and eggs. In: Cell Biological Applications of Confocal Microscopy. Matsumoto B. (ed). Academic Press, N.Y., Cap 9, pp. 241-267, 1993.
- Giugliano, L.G., Araújo, A.N., Piva, I.C., Inham, T.M., Ferraz, L.R. & Guth, B. C. Virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic children: influence of storage conditions. *Vet. Microbiol.*, 26: 267-273, 1995.
- González, E.A. & Blanco, J. Serotypes and antibiotic resistance of verotoxigenic (VTEC) and necrotizing (NTEC) *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea. *FEMS Microbiol. Lett.*, 69: 31-36, 1989.

Guerrant, R.L., Brunton, T.C., Rebhun, L.I. & Gilman, A.G. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **10**: 320-327, 1974.

Gyles, C.L. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can. J. Microbiol.*, **38**: 734-746, 1992.

Hall, A. Small GTP-binding proteins and regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Ver. Cell. Biol.* **10**: 31-54, 1994.

Haque, A., Sugimoto, N., Horiguchi, Y., Okabe, T., Miyata, T., Iwanaga, S. & Matsuda, M. Production, purification and characterization of botulinolysin, a thiol-activated hemolysin of *Clostridium botulinum*. *Infect. Immun.*, **60**: 71-78, 1992.

Harlow, E. & Lane, D. Antibodies - A Laboratory Manual. In Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 1988.

Hartree, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, **48**:422-427, 1972.

Hoefer Catalog and Exercises, 1991.

- Holmes, R.K., Twidd, E.M. & Pickett, C.L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **53**: 464-477, 1986.
- Johnson, J.R., Roberts, P.L. & Stamm, W.L. P fimbriae and other virulence factors in *E. coli* urosepsis: associations with potents characteristics. *J. Infect. Dis.*, **156**: 225-233, 1987a.
- Johnson, W.M. & Lior, H. Response of chinese hamster ovary cells to o cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible interpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**: 19-23, 1987b.
- Johnson, W.M. & Lior, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microbiol. Pathogen.* **4**: 103-113, 1988.
- Karmali, M.A., M. Patric, C., Lim, R., Cheung & G.S. Arbus. Sensitive method for detecting low numbers Verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of Verotoxin. *J. Clin. Microbiol.*, **22**: 614-619, 1985.
- Kauffman, F. The serology of the *coli* group. *J. Immunol.*, **57**:71-100, 1947.
- Konowalchuck, J., Speirs, J.I. & Stavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**: 775-779, 1977.

- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- Lemichez, E., Flatau, G., Bruzzone, M., Boquet, P & Gauthier, M. Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNF 1 cell-binding and catalytic domains. *Mol. Microbiol.*, **24**: 1061-1070, 1997.
- Levine, M.M., *Escherichia coli* infections. In: Bacterial Vaccines, cap. 7, pp. 187-235, London, Academic Press, 1984.
- Levine, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroivasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.*, **155**: 377-389, 1987.
- Lindgren, S.W., Samuel, J.E., Schmitt, C.K. & O'Brien, A.D. The specific activities of Shiga-like toxin type II (SLT-II) and SLT-II related toxins of enterohemorrhagic *Escherichia coli* differ when measured by Vero cell cytotoxicity but not mouse lethality. *Infect. Immun.*, **62**: 623-631, 1994.
- MacLeod, D.L., Gyles, C.L. & Wilcock, B.P. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet. Pathol.*, **28**: 66-73, 1991.

- Marques, L.R.M., Peiris, J.S.M., Cryz, S.J. & O'Brien, A.D. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**: 33-38, 1987.
- Mello, M.L. & Vidal, B. *Práticas em Biologia Celular*, Edgard Blucher, 71, R.J., 1980.
- O'Brien, A.D. & Laveck, G.D. Purification and characterization of *Shigella dysenteriae* 1 - like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **40**: 675-683, 1983.
- O'Brien, A.D. & Holmes, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.*, **51**: 206-220, 1987.
- Ohmura, M., Cao, C., Karasawa, T., Okuda, J., Kurazono, H., Ganon, V.J.P., Gyles, C.L. & Takeda, Y. Purification some properties of Vero toxin 2 (Shiga-like toxin II) variant (SLT-IIva) of *Escherichia coli* isolated from infantile diarrhea. *Microbiol. Pathog.*, **15**: 399-405, 1993.
- Okamoto, K., Fujii, Y., Akashi, N., Hitotsubashi, S., Kurazono, H., Karasawa, T. & Takeda, Y. Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. *Microbiol. Immunol.*, **37**: 411-414, 1993.
- Ørskov, I. & Ørskov, F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *J. Hyg.*, **95**: 551-575, 1985.

- Oswald, E., De Rycke, J., Guillot, J.F. & Boivin, R. Cytotoxic effect of multinucleation in HeLa cell cultures associated with the presence of Vir plasmid in *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.*, **58**: 95-100, 1989.
- Oswald, E. & De Rycke, J. A single protein of 110 kDa is associated with the multinucleating and necrotizing activity coded by the Vir plasmid of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **68**: 279-284, 1990.
- Oswald, E., De Rycke, J., Lintermans, P., Van Mylen, K., Mainil, J., Daube, G. & Pohl, P. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type two in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **29**: 2522-2527, 1991.
- Oswald, E., Tabouret, M., Boivin, R. & De Rycke, J. Detection of *Escherichia coli* strains producing Cytotoxic Necrotizing Factor type two (CNF 2) by enzyme - linked immunoabsorbent assay. *Vet. Microbiol.*, **40**: 209-218, 1994a.
- Oswald, E., Pohl, P., Jacquemin, E., Lintermans, P., Van Muy Lem, K., O'Brien, A.D. & Mainil, J. Specific DNA probes to detect *Escherichia coli* strains producing Cytotoxic Necrotizing Factor type 1 or typr 2. *J. Med. Microbiol.*, **40**: 428-434, 1994b.

- Oswald, E., Sugai, M., Labigne, A., WU, H.C., Fiorentini, C., Boquet, P. & O'Brien, A.D. Cytotoxic Necrotizing Factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**: 3814-3818, 1994c.
- Ouchterlony, O. Diffusion in Gel Methods for Immunological Analysis. *Progs. Allerg.*, **5**:78, 1958.
- Paterson, U.F., Self, A.J., Garret, M.D., Just, I., Aktories, K. & Hall, A. Microinjection of p21 Rho induces rapid change in cell morphology. *J. Cell. Biol.*, **111**: 1001-1007, 1990.
- Pechère, J.C. Facteurs microbiologiques de pathogénicité i exemple de *Escherichia coli*, in: Urologie pathologie infectieuse et parasitaire. S. Khoury, Masson, Paris, pp. 47-52, 1985.
- Pérès, S.Y., Marchès, O, Daigle, F., Nougayrède, J-P., Hérault, F., Tasca, C., De Rycke, J. & Oswald, E. A new cytoletal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF 2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.*, **24**: 1095-1107, 1997.
- Pohl, P., Oswald, E., Van Muylem, K., Jacquemin, E., Lintermans, P. & Mainil, J. *Escherichia coli* producing CNF 1 and CNF 2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.*, **24**: 311-315, 1993.

- Robins-Browne, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.*, **9**: 28-53, 1987.
- Sack, R.B. The epidemiology of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, **137**: 639-640, 1978.
- Sears, C.L. & Kaper, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage of intestinal secretion. *Microbiol. Rev.*, **60**: 167-215, 1996.
- Speirs, J.I., Stavric, S. & Konowalchuk, J. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins with Vero cells. *Infect. Immun.*, **16**: 617-622, 1977.
- Tabouret, M. & De Rycke, J. Detection of Cytotoxic Necrotizing Factor (CNF) in extracts of *Escherichia coli* strains by enzyme-linked immunoabsorbent assay. *J. Med. Microbiol.*, **32**: 73-81, 1990.
- Thompson, M.R. & Giannella, R.A. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by a *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. *Infect. Immun.*, **47**: 834-836, 1985.
- Walker, K.E. & Weiss, A.A. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect. Immun.*, **62**: 3817-3828, 1994.

Wray, C., Piercy, D.W.T., Carroll, P.J. & Cooley, W.A. Experimental infection of neonatal pigs with CNF toxin-producing strains of *Escherichia coli*. *Res. Vet. Sci.*, **54**: 290-298, 1993.

Yano, T., Tamashiro, W.M.S.C., Garcia, M. & Castro, A.F.P. Detecção de Verocitotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerro com diarreia. *Rev. Microbiol.*, **17**: 339-341, 1986.