

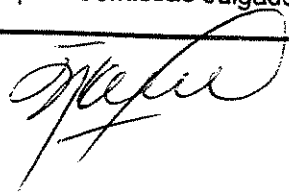
ROSABEL FALCÓN MÁRQUEZ

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

**MECANISMO MOLECULAR DE
PATOGENICIDADE DA ENTEROTOXINA
CITOTÓXICA DE *Aeromonas hydrophila*.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Rosabel Falcón Márquez
e aprovada pela Comissão Julgadora.

**Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do título
de Doutor em Biologia Funcional e
Molecular, na Área de Bioquímica.**



Orientador: Prof. Dr. Tomomasa Yano

**CAMPINAS, SP
2003**

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/Unicamp
	F 181-m
V	EX
TOMBO BCI	55631
PROC.	16-124/03
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/09/03
Nº CPD	

CM00188922-0

Bib id 300092

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

M348m

F 181-m

Márquez, Falcón Rosabel

Mecanismo molecular de patogenicidade da enterotoxina citotóxica de
Aeromonas hydrophila / Rosabel Falcón Márquez.--
Campinas, SP: [s.n.], 2003.

Orientador: Tomomasa Yano

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas .
Instituto de Biologia.

1. Hemolisina. 2. Apoptose. 3. Toxinas bacterianas. I. Yano, Tomomasa.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

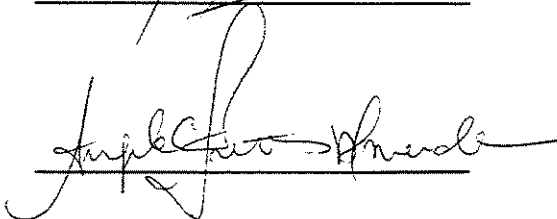
DATA DA DEFESA: 16/06/2003

BANCA EXAMINADORA:

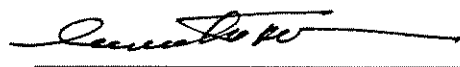
Prof. Dr. Tomomasa Yano (Orientador)



Profa. Dra. Ângela Corrêa de Freitas-Almeida



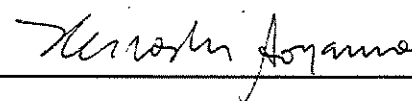
Prof. Dr. Carlos Alberto de Magalhães Lopes



Profa. Dra. Clarice Weis Arns



Prof. Dr. Hiroshi Aoyama



Profa. Dra. Gleize Villela Carbonell

Prof. Dr. Sergio Marangoni

5466103-0003

*A meus familiares e amigos pela constância,
amor e dedicação.*

“Cuando en los hombres se encarna un grave pensamiento, un firme intento, una aspiración noble y legítima, los contornos del hombre se desvanecen en los espacios sin confines de la idea. Quien intenta triunfar, no inspire miedo: que nada triunfa contra el instinto de conservación amenazado.”

José Martí

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano, pela confiança, incentivo e apoio oferecido durante todos estes anos.

Aos professores, Maria Silvia Viccari Gatti, Hernandes Faustino Carvalho e Paulo Pinto Joazeiro pela parceria, disponibilidade e valiosos ensinamentos.

As professoras. Maria Sumiko Arita Matsuura, e Carla Beatriz Collares Buzato, pelas sugestões oportunas e a disponibilidade para a participação do exame de Qualificação deste trabalho.

Aos professores, Clarice Weis Ams, Hiroshi Aoyama, Angela Correia Freitas-Almeida, Carlos Alberto Magalhães Lopes, pela sua colaboração e participação como membros da Banca Examinadora definitiva.

As biólogas Adriane Cristina S. Sprogis e Antonia Maria F. Lima pelo auxílio na preparação e observação do material de microscopia eletrônica.

Aos Profs. Drs. do Depto de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP pelos valiosos ensinamentos e o auxílio na realização deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório, Ana Claudia, Ana Soledade, Aldo, Cláudio Amorín, Cláudio Baiano, Carol Yaeko, Eneida, Erivaldo, Georgio, Jane Martha, Luciano, Márcia Tomy, Patrícia, Rosimary, Rovilson, Sandra pela força, e troca de experiências que marcaram e enriqueceram minha estadia nestes anos.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular, Heloisa, Silvia, Manuel, Elaine, Helene, Sérgio, pelo carinho e colaboração neste trabalho.

Aos amigos Mario Paulo, Silvia Simi, Valeria, Stella, Cleide, e Gleize pela paciência, dedicação e agradável convivência. Obrigada pelo carinho e otimismo que sempre me transmitiram.

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e otimismo na minha realização. A meus queridos vovôs, minhas irmãs e belos sobrinhos pelas alegrias e o carinho permanente.

A Luis, pela confiança e paciência.

Aos amigos, Frank, Mayté, Guilherme, Isabel, Lúcia Beatriz, Maribel, Antonio, Mariano, Edilio, Dania, Humberto, Martica e Wilson pela dedicação, força e apoio incondicional.

Aos colegas do Departamento de Microbiologia do Instituto “Pedro Kouri”, especialmente à Gilda, Pelegrino, Carlos Fernández, Mayda, Ibis e Dianeya pelo apoio e dedicação.

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

Finalmente, quero agradecer pela grandiosa oportunidade de ter compartilhado seis anos de minha vida neste maravilhoso país, que conjuga de modo harmonioso a heterogeneidade cultural à exuberância da paisagem, mudando o curso da minha vida e deixando, sem dúvida alguma, marcas gravadas no meu crescimento pessoal.

RESUMO

A enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila* (Ent-ctx) possui múltiplas atividades biológicas. Entre elas, está a capacidade de lisar eritrócitos, causar danos irreversíveis nas membranas celulares e induzir acúmulo de fluido no intestino em modelo animal. Neste estudo, as hemácias de rato foram mais sensíveis a ação citolítica da Ent-ctx quando comparadas às outras hemácias. A IgG purificada anti-Ent-ctx foi capaz de neutralizar o efeito citotóxico da Ent-ctx, apresentando títulos maiores que 1:16384, revelando uma única banda com um peso molecular aproximado de 54 kDa na análise do imunoblotting. A Ent-ctx causou perda de junção intercelular, crescente condensação nuclear, a fragmentação e eliminação de corpos nucleares e citoplasmáticos em linhagens celulares Vero (rim de macaco verde africano) e HT29 (epitélio intestinal humano). As análises ultraestruturais, assim como análise eletroforética em gel de agarose, reação de Feulgen, e a metodologia do TUNEL confirmaram que a Ent-ctx induziu apoptose em HT29. Os danos ocasionados pela Ent-ctx foram irreversíveis, constatando-se que a perda da função mitocondrial nas células HT29 precede a destruição da membrana celular. Estudos *in vivo* em células epiteliais intestinais de rato revelaram severa desorganização estrutural, levando a destruição de enterócitos, alterações em organelas intracelulares e a perda do arranjo das células do tecido conectivo. A presença de um infiltrado inflamatório difuso constituído por eosinófilos e neutrófilos foi constatada nas análises microscópicas. Através da técnica de PCR não foram detectados os genes responsáveis pela enteropatogenicidade em *E. coli* (LT-I, STa, STb) na amostra de *A. hydrophila* produtora da Ent-ctx. Neste estudo, as alterações morfológicas observadas em células intestinais epiteliais *in vitro* e *in vivo*, sugerem que a Ent-ctx está relacionada com a enteropatogenicidade de *A. hydrophila*.

Palavras-chave: *Aeromonas hydrophila*, enterotoxina, citotoxina, hemolisina, apoptose.

ABSTRACT

The cytotoxic enterotoxin secreted by *Aeromonas hydrophila* (Ent-ctx) produces hemolytic and cytotoxic activities and possesses the ability to evoke a fluid secretory response in a ligated intestinal loop model, amongst other biological activities. In this study, rat erythrocytes were the most sensitive to the hemolytic activity. The cytopathic effects were neutralized using antiserum purified against the cytotoxin of *A. hydrophila* (titer > 1:16384). The immunoblotting analysis revealed one only band with molecular weight of 54 kDa. Vero (African green monkey kidney) and HT29 (human epithelial intestinal) cells treated with the Ent-ctx became round and lost their adhesion to each other and to the substrate. Cytoplasmic blebbing, nuclear condensation, fragmentation and formation of apoptotic bodies also occurred. Internucleosomal DNA fragmentation was detected by TUNEL labeling, Feulgen staining *in situ* and agarose gel electrophoresis. These results confirmed that the Ent-ctx of *A. hydrophila* induces apoptosis in HT29. The cytotoxic response of this enterotoxin was irreversible and progressive showed that the lost of mitochondrial function come first that destruction of membrane permeability. *In vivo* studies revealed a dramatic structural disorganization, leading organelles damage, degeneration of epithelial cells and lost of the connective tissue in rat epithelial intestinal cells. Microscopic observations showed migration of eosinophils and neutrophils through the intestinal epithelium. Using LT-I, STa, and STb of *E.coli* as probe no homology to the whole cell DNA of *A.hydrophila* (AH191) strain was detected on PCR analyses. These alterations induced by the cytotoxic enterotoxin of *A. hydrophila*, suggest that mechanism of this toxin could be associated to the enteropathogenicity involving *A.hydrophila* strains.

Key-words: *Aeromonas hydrophila*, enterotoxin, cytotoxin, hemolysin, apoptosis

ÍNDICE GERAL

1-Introdução e Objetivos gerais.....	2
2-Material e Métodos.....	10
2.1-Amostras bacterianas.....	10
2.2-Produção e purificação da Enterotoxina-Citotóxica de <i>A. hydrophila</i>	10
2.3-Determinação da concentração protéica.....	10
2.4-Produção de anticorpos anti-Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	11
2.4.1-Animais e esquema de imunização.....	11
2.4.2-Purificação do antissoro anti-Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	11
2.5-Bioespecificidade do anti-Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	11
2.5.1-Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.....	11
2.5.2-Imunodeteção em membrana de nitrocelulose através do Western Blotting.....	12
2.6-Deteção da atividade hemolítica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	12
2.6.1-Inibição da atividade hemolítica devido à presença do colesterol.....	13
2.6.2-Neutralização do efeito hemolítico utilizando os antissoros anti-Ent-ctx.....	13
2.7-Deteção da atividade citotóxica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	14
2.7.1-Linhagens celulares.....	14
2.7.2-Preparação das culturas celulares.....	14
2.7.3-Teste de atividade citotóxica.....	14
2.7.4-Teste de viabilidade celular.....	15
2.8-Estudo das alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx em células HT29.....	15
2.8.1-Ensaio para o estudo das alterações citoplasmáticas e nucleares.....	15
2.8.2-Estudo das alterações ultraestruturais.....	16
2.8.3-Ensaio para o estudo da integridade da membrana celular.....	16
2.8.4- Cinética do funcionamento mitocondrial.....	17
2.8.5-Estudo da distribuição de lipídios através do método de Sudán Black...	17

2.8.6-Detecção <i>in situ</i> de apoptose usando a técnica de TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling).....	17
2.8.7-Quantificação de células apoptóticas.....	18
2.8.8-Cinética da indução de apoptosis.....	18
2.8.9-Ensaio de fragmentação do DNA e eletroforese em gel de agarose.....	19
2.9-Detecção da atividade enterotóxica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	19
2.9.1-Animais.....	19
2.9.2-Teste de alça ligada em rato.....	19
2.10-Estudo das alterações morfológicas induzidas pela enterotoxina de <i>A. hydrophila</i> nas células epiteliais intestinais.....	20
2.10.1-Microscopia óptica.....	20
2.10.2-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	20
2.10.3-Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	21
2.11-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	21
2.12-Detecção da atividade proteolítica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	23
2.12.1-Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS e gelatina.....	23
3-Resultados.....	25
3.1-Determinação da concentração protéica citotóxica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	25
3.2-Obtenção e purificação do anti-soro anti-Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	25
3.3- Imunodetecção da Ent-ctx através do Western Blotting.....	26
3.4-Sensibilidade de diferentes espécies de eritrócitos a Ent-ctx.....	26
3.5-Influência do colesterol na atividade hemolítica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> ...	27
3.6-Neutralização do efeito hemolítico através dos antissoros anti-Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	28
3.7-Atividade citotóxica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> nas células Vero e HT29.....	28
3.8-Testes de viabilidade celular em células Vero e HT29.....	28
3.9-Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> em células epiteliais intestinais humanas HT29.....	29
3.10- Ultraestrutura das células HT29 tratadas com a Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	30

3.11-Efeito da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> sobre a integridade da membrana e a função mitocondrial.....	31
3.12-Distribuição de lipídios.....	32
3.13-Indução de apoptose pela Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	33
3.14-Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx nas células epiteliais intestinais de rato.....	35
3.15-Análises ultraestruturais das células epiteliais intestinais de rato após o tratamento com a Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	35
3.15.1-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	35
3.15.2-Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	39
3.15.3-Desarranjo aa arquitetura das microvilosidades induzido pela Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	41
3.16-Presença de genes relacionados à enteropatogenicidade.....	42
3.17-Atividade proteolítica da Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	42
4-Discussão.....	44
5-Conclusões gerais.....	52
6-Referências Bibliográficas.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Perfil cromatográfico obtido com a coluna de afinidade Hi-Trap Protein A (Pharmacia), utilizada para a purificação da IgG anti-Ent-ctx.....	25
Figura 2: Western-Blotting da enterotoxina citotóxica de <i>A. hydrophila</i> frente: soro pré-imune, antissoro descomplementado a 56°C e IgG anti-Ent-ctx purificada.....	26
Figura 3: Atividade hemolítica da enterotoxina citotóxica de <i>A. hydrophila</i> frente a hemácias de boi, cavalo, carneiro, cobaia, coelho, galinha e rato.....	27
Figura 4: Cinética da viabilidade celular de células HT29 e Vero tratadas com a Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	29
Figura 5: Fotomicrografia do efeito citopático induzido pela Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> em células HT29. Coloração com Azul de toluidina.....	30
Figura 6: Fotomicrografia dos aspectos ultraestruturais obtidos em HT29 após o tratamento com a Ent-ctx.....	31
Figura 7: Cinética da atividade da enzima LDH e da formação do MTT reduzido....	32
Figura 8: Fotomicrografia obtida ao ensaiar o método de Sudan Black em células HT29.....	33
Figura 9: Indução de apoptose pela Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> em células HT29.....	34
Figura 10: Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> em células epiteliais intestinais.....	36
Figura 11: Análises ultraestruturais das células epiteliais intestinais de rato através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura.....	37
Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais intestinais de rato.....	38
Figura 13: Aspectos ultraestruturais obtidos nas vilosidades intestinais após o tratamento com a Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i> , utilizando Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	40
Figura 14: Alterações no citoesqueleto das microvilosidades induzidas pela Ent-ctx de <i>A. hydrophila</i>	41

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O primeiro relato do gênero bacteriano classificado como *Aeromonas spp* procede do isolamento de um bacilo gram-negativo do meio aquático denominado *Bacillus punctatus* por Zimmermann (1890). Em 1936, Kluver & van Niel propuseram a denominação de *Aeromonas* ao gênero que englobava bactérias isoladas do meio ambiente, geralmente aquático, as quais eram estreitamente relacionadas aos bacilos entéricos móveis por flagelo polar.

Historicamente o gênero *Aeromonas* encontrava-se classificado na família *Vibrionaceae*, juntamente com os gêneros *Vibrio*, *Plesiomonas* e *Photobacterium* (Popoff, 1984). Estudos taxonômicos (Colwell *et al.*, 1986), com base nas características bioquímicas e moleculares levaram a reclassificação do gênero *Aeromonas* em outra família, denominada *Aeromonadaceae*, que engloba junto os gêneros *Oceanimonas* e *Tolumonas* (Bergey's, 2001). Este gênero inclui pelo menos 16 genoespecies agrupando a espécie imóvel e psicrófila *Aeromonas salmonicida* num primeiro grupo e as espécies mesófilas, *A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. schubertti*, *A. jandaei*, *A. media*, *A. trota*, *A. eucrenophila*, *A. allosaccharophila*, *A. bestiarum*, e *A. encheleia*, constituindo o segundo grupo. Recentemente, três novas espécies, *A. enteropelogenes*, *A. ichthiosmia* e *A. popoffii*, têm sido reconhecidas como integrantes deste gênero (Carnahan & Altwegg, 1996).

Aeromonas spp são bacilos gram-negativos, não esporulados, medindo de 0,3 a 1,0 µm de diâmetro e 1,0 a 3,5 µm de comprimento (Popoff, 1976). Encontram-se isolados, aos pares, ou em cadeias curtas e quando móveis, e exibe um único flagelo polar. Apresentam temperatura ótima de crescimento entre os 22°C e 37°C. Podem ser isoladas em meio seletivo, ou placas de Agar sangue com ampicilina na concentração de 10 µg/ml, uma vez que a bactéria mostra-se resistente a esse antibiótico. Possuem metabolismo anaeróbio facultativo, utilizando a glicose e outros carboidratos (frutose, maltose, e trealose) com produção de ácido, ou ácido e gás. Reduzem o nitrato, produzem catalase e oxidase e mostram-se resistentes ao agente vibriostático O/129 (2,4 diamino-6,7 diisopropilpteridina). Têm a capacidade de não fermentar adonitol, dulcitol, inositol, sorbose e xilose.

As espécies mesófilas de *Aeromonas* têm sido associadas às infecções gastrointestinais humanas assim como infecções cutâneas e subcutâneas, sepsis e infecções sistêmicas, podendo ser transmitidas através do contato direto por ferimentos

ou a ingestão de água e alimentos contaminados (Altwegg & Geiss, 1989; Gracey *et al.*, 1982; Krovacek *et al.*, 1998).

Dentre o gênero, têm sido demonstrado que a presença de *A. hydrophila* em alimentos é elevada (Freitas *et al.*, 1993; Palumbo *et al.*, 1989), devido à capacidade desta espécie para produzir enterotoxinas e hemolisinas inclusive na temperatura de refrigeração (4°C), sugerindo que a ingestão de alimentos contendo toxinas pré-formadas pode provocar doenças gastrointestinais (Hardy *et al.*, 1986; Kirov, 1993, Majeed *et al.*, 1989).

O principal habitat desta espécie são ambientes aquáticos, representados por águas correntes ou estagnadas, tanto doce quanto salgada (Gracey *et al.*, 1982, Haburchak, 1996). A prevalência de *A. hydrophila* em águas não tratadas tem superado sua presença em águas tratadas para o consumo doméstico (Borrell *et al.*, 1998). Recentemente, devido a seu potencial de crescimento nos sistemas de distribuição de água, inclusive águas cloradas, *A. hydrophila* foi incluída na lista de contaminantes importantes para saúde pública sendo considerada um patógeno emergente pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos (Borchardt *et al.*, 2003). Por outro lado, a capacidade de crescer nos mais diversos ambientes aquáticos, sob uma variedade de condições adversas, tais como salinidade, temperatura e pH têm permitido catalogar a *A. hydrophila* como um ótimo indicador de poluição de águas (Seidler *et al.*, 1980).

Aeromonas hydrophila têm sido reconhecida como patógeno oportunista em pacientes debilitados e imunologicamente comprometidos, sendo capaz de causar abscesso multilobular de pulmão e bacteremia, com mionecrose e grangena gasosa em pacientes submetidos à hemodiálise (Heckerling *et al.*, 1983, Janda & Brenden, 1987, Xin *et al.*, 1997). No entanto, a maior parte dos estudos clínicos- epidemiológicos descrevem a *A. hydrophila* como principal responsável por doenças diarreicas, assim como a sua associação com ferimentos e infecções sanguíneas (Gracey *et al.*, 1982, Haburchak, 1996).

Numerosos estudos sobre incidência, aspectos clínicos e fatores de virulência de *A. hydrophila* têm sido publicados no sentido de associá-las à enteropatogenicidade assim como para propor possíveis mecanismos de ação que levam-na a provocar doenças em homens e animais (Caselitz, 1966; Cumberbatch *et al.*, 1979; Ferguson *et al.*, 1997, Janda & Brenden, 1987; Khalifa, 1989, Khurama & Kumar, 1997). Vários levantamentos epidemiológicos indicaram que dentro do gênero, *A. hydrophila* vem sendo reconhecida como agente etiológico de numerosos casos clínicos envolvendo inclusive indivíduos

imunocompetentes de todas as idades (Figura *et al.*, 1986, Lin *et al.*, 1996, Ljungh, 1987, Mani *et al.*, 1995, Murakami *et al.*, 1995). Adicionalmente, esta espécie tem sido associada à diarreia que acomete indivíduos que se deslocam para regiões subdesenvolvidas, conhecida como “diarreia dos viajantes”, causando dores abdominais e diarreia com duração inferior a sete dias (Black, 1990).

No Brasil são poucos os estudos realizados sobre o papel desempenhado por amostras de *Aeromonas hydrophila* como patógenos entéricos. Entretanto as pesquisas realizadas por Khalifa, (1989) e Pereira (1992) demonstraram a presença de amostras pertencentes ao gênero *Aeromonas spp.* em fezes de indivíduos e crianças com diarreias. Paralelamente, Neves & Nunes, (1994) isolaram mais de 200 amostras de *Aeromonas spp.*, a partir de diferentes materiais tais como água doce, água salgada, queijos, leite e urina. Um estudo realizado em Araraquara, (SP) revelou a presença de amostras de *Aeromonas spp.* e *Vibrio cholerae* a partir de diversas fontes analisadas, sendo que as amostras de *Aeromonas* apresentavam resistência múltipla as drogas (Falcão *et al.*, 1998). Recentemente Martins *et al.*, (2002) demonstraram uma incidência de 32% de *A. hydrophila* em amostras isoladas de alimentos e fontes clínicas, revelando-se que o 72% foram produtoras de citotoxinas e 28% de enterotoxinas.

Vários marcadores têm sido descritos procurando explicar a patogênese das infecções intestinais associadas à *A. hydrophila* (Chakraborty *et al.*, 1986, Ljungh *et al.*, 1977). Dentre as substâncias segregadas por este microorganismo, e que parecem desempenhar um importante papel no processo das doenças intestinais estão as enterotoxinas, as quais são consideradas um importante estímulo de eventos bioquímicos, que se associam com quadros diarreicos agudos (Dobrescu, 1978; Ljungh *et al.*, 1982).

Duas categorias de enterotoxinas têm sido descritas: as citotônica e citotóxica. A enterotoxina citotônica similar à toxina colérica, é capaz de induzir a formação de esteróides e provocar arredondamento em células Y-1, sem causar alterações no epitélio intestinal (Chopra & Houston, 1999). A enterotoxina citotóxica (Ent-ctx), também denominada como “aerolisina” (Bernheimer & Avigar, 1974) ou β -hemolisina (Asao *et al.*, 1984), é considerada como um potente indicador de patogenicidade, cuja ação está geralmente associada a danos no tecido hospedeiro e infecções gastrointestinais (Freitas *et al.*, 1993, Houston *et al.*, 1991). Entretanto, pouco se sabe acerca do papel da Ent-ctx na patogênese das doenças gastrointestinais provocadas pela *A. hydrophila*.

Vários estudos têm demonstrado que pode existir uma correlação entre hemólise, citotoxicidade e enterotoxicidade nas amostras de *Aeromonas* (Chakraborty *et al.*, 1987, Chopra *et al.*, 1986; Cumberbatch *et al.*, 1979; Wadstrom *et al.*, 1976). Assim uma β -hemolisina de 50 kDa, que produz um efeito citotóxico em células Vero e induz acúmulo de líquido no intestino de camundongos e coelhos (Asao *et al.*, 1986, Vadivelu *et al.*, 1995), foi identificada em *A. hydrophila*. Além desta toxina, foi constatada a presença de uma alfa-hemolisina, a qual é liberada da célula durante a fase estacionária, e provoca lise parcial de eritrócitos (Caselitz, 1966; Ljungh *et al.*, 1981; Wretling *et al.*, 1971).

Potomski e colaboradores (1987) descreveram uma enterotoxina de aproximadamente 63 kDa, diferente sorologicamente da toxina colérica (CT), que causa acúmulo de fluidos em alça ligada de coelhos e camundongos, com capacidade de causar hemólise e apresentar um efeito citotóxico em cultura de células.

A enterotoxina citotóxica pertence à família de toxinas protéicas de *Aeromonas*, cuja massa molecular varia entre 48 e 54 kDa e expressam múltiplas atividades biológicas tais como hemólise, enterotoxicidade, citotoxicidade podendo ser letais quando injetada via intravenosa em camundongos (Asao *et al.*, 1986, Cahill, 1990, Rose *et al.*, 1998b). Devido a sua presença em amostras clínicas associadas a quadros de diarreia provocados por *A. hydrophila*, assim como em amostras isoladas do meio ambiente, esta toxina tem sido objeto de caracterização biológica e molecular, com o propósito de determinar a sua seqüência de aminoácidos (Buckley *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1987; Howard *et al.*, 1987).

A purificação e caracterização química e imunológica de uma enterotoxina citolítica (Act) de 52 kDa, isolada de fezes diarreicas, cujo agente etiológico foi classificado bioquimicamente como *A. hydrophila*, permitiu constatar que adicionalmente as atividades citotóxica, enterotóxica e hemolítica, a enterotoxina Act estava intimamente relacionada com a toxina colérica e com a β -hemolisina (Ferguson *et al.*, 1997, Rose *et al.*, 1989a, Rose *et al.*, 1989b).

Estudos recentes relatam um aumento na produção da enterotoxina citolítica a partir da clonagem e expressão do gene *act* em *E. coli* K12 (Ferguson *et al.*, 1995, Ferguson *et al.*, 1997). Os resultados destas pesquisas revelaram que entre os vários fosfolípidos e gangliosídeos testados, a Act interage com o grupo 3'OH do colesterol, sugerindo ser esse grupamento químico o possível receptor nas membranas celulares. Estudos sobre o mecanismo de ação revelaram a capacidade desta toxina para induzir a

formação de canais, levando à lise celular em eritrócitos e outros tipos de membranas (Abrami *et al.*, 1998a, Ferguson *et al.*, 1997, Xin *et al.*, 1997).

Por outro lado, a aerolisina, caracterizada como uma proteína formadora de poros foi purificada e posteriormente seqüenciada a partir de seu precursor protéico inativo: a proaerolisina (Buckley *et al.*, 1981, Howard *et al.*, 1986, 1987). Estudos sobre o mecanismo de ação desta toxina para a formação de poros revelaram que a exoproteína secretada sob forma inativa (68 kDa), é ativada pela clivagem proteolítica de seu precursor, convertendo-se numa proteína de 52 kDa. Uma vez ligada à membrana da célula alvo, e dependendo da concentração de proteína, o aumento desta toxina leva à polimerização do complexo toxina-receptor, o qual insere-se dentro da membrana e induz a formação de canais nas células, provocando a lise osmótica dos eritrócitos e outros tipos de membranas (Chakraborty *et al.*, 1986; Ferguson *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1989b).

Concentrações menores de aerolisina provocam a perda de moléculas pequenas e íons, podendo ativar a via de morte celular programada. Como regulador quimiostático de leucócitos humanos, a aerolisina, quando ligada ao receptor glicofosfatidil-inositol (GPI) (Lisanti *et al.*, 1989), induz apoptose em linfócitos T através das proteínas Thy-1 (Buckley, 1999).

Contudo, os mecanismos pelos quais esta toxina interage com as células de mamíferos nucleadas, ainda são pouco conhecidos (Abrami *et al.*, 1998a, Carrello *et al.*, 1988, Cumberbatch *et al.*, 1979, Freitas *et al.*, 1993). Pesquisas realizadas em nosso laboratório demonstraram que a Ent-ctx provoca alterações morfológicas em várias linhagens celulares, predominando os efeitos de vacuolização citoplasmática e condensação cromatínica (Falcón, 1998). Além disso, estudos recentes constataram que a Ent-ctx de *A. hydrophila* induz uma severa fragmentação do DNA em células epiteliais humanas HT29, sugerindo que esta enterotoxina, similarmente à aerolisina, é capaz de ativar processos que levam à morte celular via apoptose (Falcón *et al.*, 2001).

A morte celular programada, conhecida como apoptose tem sido reconhecida como um dos mecanismos de patogenicidade das bactérias, envolvendo vários fatores de virulência que são secretados pelos microorganismos bacterianos para agir como ativadores específicos do processo de apoptose. As estratégias usadas pelos patógenos podem ser necessárias para sua sobrevivência no hospedeiro, desviando os possíveis mecanismos de defesa, principalmente a ação das células da resposta imune (Jonas *et al.*, 1994, Kochi & Collier, 1993, Kuo *et al.*, 1999, Weinrauch & Zychlinsky, 1999).

As células epiteliais intestinais constituem o principal alvo de patógenos bacterianos relacionados a doenças gastrointestinais. A ativação do sistema imune em resposta à ação destes microrganismos, pode levar a destruição da barreira epitelial e conseqüentemente facilitar as vias de invasão e dispersão dos mesmos dentro do hospedeiro (Hornef *et al*, 2002, Mayhew *et al.*, 1999).

No intuito de aprofundar o conhecimento dos mecanismos de ação da Ent-ctx e associá-los com a enteropatogenicidade produzida por *A. hydrophila*, vários estudos têm sido desenvolvidos em modelos animais (Ljungh *et al.*, 1976, Ljungh *et al.* 1982, Schiavano *et al.*, 1998, Wong *et al.*, 1996), desde que Sayal *et al.*, (1975) demonstraram que sobrenadantes obtidos de culturas bacterianas desta espécie causavam acúmulo de fluido intestinal em alça ligada de coelho. Contudo, alterações histológicas não foram constatadas no ensaio de perfusão em intestino de rato (Millership *et al.*, 1992).

Demonstrada a importância da enterotoxina citotóxica como possível indicador da patogenicidade de *A. hydrophila*, e tendo em vista os estudos referentes aos mecanismos pelos quais esta toxina provoca os danos no hospedeiro, torna-se aprofundar neste fator de virulência e seu papel nas enteropatias.

Objetivos Gerais

1. A caracterização da atividade hemolítica da Ent-ctx frente a eritrócitos de diferentes origens.
2. A caracterização imunológica da Ent-ctx frente aos anti-soros obtidos em modelo animal.
3. O estudo das alterações morfológicas e intracelulares induzidas pela Ent-ctx nas células epiteliais intestinais.
4. A demonstração da ocorrência de apoptose *in vitro*
5. E, relacionar os aspectos morfológicos e intracelulares obtidos com os efeitos citopatogênicos *in vitro* produzidos pela enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila*

Objetivos Específicos

6. O estudo da cinética do efeito citopático e das alterações induzidas pela Ent-ctx nas linhagens celulares HT29 e Vero.
7. A análise ultraestrutural dos efeitos biológicos induzidos pela Ent-ctx em células epiteliais humanas e de rato.
8. O estudo das alterações do citoesqueleto celular no epitélio intestinal.
9. Verificar a possível associação entre os genes (LT-I, STa, STb, VT) responsáveis pela enteropatogenicidade em *E. coli* e a amostra de *A. hydrophila* produtora da Ent-ctx.

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1-Amostras bacterianas

Para o presente estudo foi utilizada a amostra de *Aeromonas hydrophila* (AH191), isolada de leite contaminada, gentilmente cedida pela Fundação Tropical “André Tosello”, Campinas, SP (lote 27.88 FTPT, data 20/08/1996). Outras amostras padrão utilizadas foram *Escherichia coli* enterotoxigênica 40T (LT I⁺), *Escherichia coli* verotoxigênica 8B (VTy⁺) e *Aeromonas hydrophila*, AH69, não produtora de enterotoxina. Todas as amostras bacterianas foram mantidas em Ágar Nutriente à temperatura ambiente e em meio caldo Nutriente contendo glicerol 20% a -70°C.

2.2-Produção e purificação da Enterotoxina-Citotóxica de *A. hydrophila*

As condições de cultivo utilizadas, assim como os procedimentos para a purificação da Ent-ctx foram estabelecidos como descrito por Falcón, 1998.

Para a produção da enterotoxina citotóxica (Ent-ctx), as bactérias ($2,7 \times 10^9$ bactérias ml⁻¹) (escala 8 de Mac Farland) provenientes da amostra AH191 foram cultivadas em meio TSB-EY (meio Caldo Trypticase de Soja, suplementado com de extrato de levedo a 0,6%) (Difco, Laboratories) por 18 horas, sob agitação (150 rpm). Em seguida, foram centrifugadas a $15.300 \times g$ por 20 minutos (Beckman, model J2-21) a 4°C, sendo o sobrenadante tratado com 1mM de inibidor de protease Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) (Bio-Rad Laboratories) e conservado a -70°C. O sobrenadante de cultura obtido foi submetido à precipitação com sulfato de amônio 60% (p/v) (Merck) de saturação e posteriormente as técnicas cromatográficas de troca aniônica Q Sepharose fast flow (26/10), cromatografia de interações hidrofóbicas em coluna de HiPrep 16/10 Phenyl (high sub) e finalmente a cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200. Todo o processo cromatográfico foi desenvolvido no sistema ÄKTA-FPLC (Amersham-Pharmacia) à temperatura de 22°C.

2.3-Determinação da concentração proteica

A concentração de proteínas foi determinada segundo a metodologia descrita por Bradford, 1976. Para isto, utilizou-se o kit de reagentes da Bio-Rad, contendo a solução Bradford concentrada contendo Azul de Coomassie, preparado em metanol 25% (v/v) e de ácido fosfórico 50% (v/v). A curva padrão foi obtida com BSA ($1,35 \text{ mg ml}^{-1}$) (Sigma Chemical Co.), cuja faixa de sensibilidade atingiu concentrações entre 0,2 e 0,9 mg ml⁻¹.

Foram adicionados a 100 μ l das amostras, 5 ml do reagente de cor. Depois de agitados vigorosamente, os tubos foram incubados por 5 minutos. Posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Beckman, DU 65 Spectrophotometer) no comprimento de onda de 595 nm.

2.4-Produção de anticorpos anti-Ent-ctx de *A. hydrophila*

2.4.1-Animais e esquema de imunização

Coelhos adultos (4 meses) da raça Nova Zelândia foram imunizados via subcutânea (em vários pontos do dorso do animal), com uma dose de 150 μ g ml⁻¹ da Ent-ctx previamente preparada e emulsificada com adjuvante completo de Freund (v/v) (Sigma) como descrito por Rose *et al.*, 1989b. A cada 30 dias, e durante dois meses, os coelhos foram reinoculados com a mesma dose da toxina, emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (v/v) (Sigma). Duas semanas após cada inoculação, foi feita a sangria de prova usando a técnica de imunodifusão radial dupla e duas semanas depois da última imunização foi feita a sangria total dos animais. O antissoro de coelho anti-Ent-ctx obtido após a centrifugação a 3 000 rpm durante 15 minutos (Hitachi, model CF15D2) foi armazenado a -20°C.

2.4.2-Purificação do antissoro anti-Ent-ctx de *A. hydrophila*

O antissoro anti-Ent-ctx foi purificado usando uma coluna de afinidade HiTrap-Protein A de 1 ml (Amersham-Pharmacia), em sistema convencional (LKB Uvicord SII, Pharmacia), utilizando um espectrofotômetro com sensibilidade de 2.0 AUS. A coluna foi equilibrada com tampão Fosfato 100mM pH 8,5 utilizando um fluxo linear de 1 ml min⁻¹. A IgG anti-Ent-ctx foi eluída com tampão Tris-Glicina 100mM pH 2,8. Posteriormente as frações coletadas (3 ml) foram concentradas em Amicon, utilizando-se membrana PM 10. A IgG concentrada foi dialisada contra tampão Tris-HCl 100mM, pH 8,0.

2.5-Bioespecificidade do anti-Ent-ctx

2.5.1-Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo o método descrito por Laemmli, 1970. Foram preparados géis com espessura de 1,5 mm e gel de separação de 10%, aos quais foram aplicadas 25 μ l da Ent-ctx (100 μ g ml⁻¹). A amostra e o padrão de baixo peso molecular (Amersham-Pharmacia) foram misturados v/v com o tampão de

amostra preparado com SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (p/v) e azul de bromofenol 0,025% (p/v) em Tris-HCl 125mM pH 6,8. Em ambos os casos, as amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos. A eletroforese foi realizada utilizando-se amperagem constante de 15 mA gel⁻¹. O marcador de peso molecular compunha-se de fosforilase b (94 kDa), soroalbumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,4 kDa).

2.5.2-Imunodeteção em membrana de nitrocelulose através do Western Blotting

Após a realização da eletroforese em gel de poliacrilamida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham-Pharmacia), como descrito por Towbin *et al.*, 1979. Após a transferência, realizada a 100 V durante 1 hora a 4°C, a membrana de nitrocelulose foi tratada com solução bloqueadora, leite desnatado 5% (p/v) em PBS 5mM pH 7,2 e incubada por 1 hora à temperatura ambiente (T.A.). A membrana foi lavada três vezes com PBS 5mM pH 7,2 contendo Tween-20 a 0,05% (v/v) (PBS-T) por 5 minutos. O antissoro previamente descomplementado a 56°C por 30 minutos e a IgG anti-Ent-ctx purificada foram diluídos a 1:100 e 1:400 respectivamente em solução bloqueadora, e a membrana de nitrocelulose foi incubada por 1 hora a 37°C. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 5 minutos. Posteriormente foi incubada por 2 horas à T.A. sob agitação constante com o antissoro anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Sigma) diluído a 1:500 em solução bloqueadora. A membrana foi lavada três vezes com PBS-T por 10 minutos. A reação foi revelada com tetracloreto de diaminobenzidina (DAB, Roche Diagnostics) preparado em tampão Tris-HCl 50mM pH7,6 contendo peróxido de hidrogênio 0,03% (v/v). Finalmente, a reação foi interrompida utilizando-se água destilada.

2.6-Deteção da atividade hemolítica da Ent-ctx de *A. hydrophila*

A atividade hemolítica da Ent-Ctx foi avaliada frente a hemácias de boi, carneiro, cavalo, cabaia, coelho, galinha e rato (Microlab), diluídas a 1% (v/v) em PBS 5mM pH 7,2, seguindo a metodologia descrita por Bhakdi *et al.*, 1986.

Diluições seriadas (razão 2) em PBS foram feitas com 50 μ l da enterotoxina (100 μ g ml⁻¹), em microplaca de 96 orifícios (Falcon) mantida em banho de gelo. Em seguida foi acrescentado um mesmo volume da suspensão de cada uma das hemácias preparadas a 1% (v/v) no mesmo tampão. As placas foram incubadas a 37°C durante uma hora e, logo após, foi observada a lise celular pela liberação de hemoglobina. Os sobrenadantes (100

μl) foram transferidos para placas de fundo plano (Corning). Foram realizadas leituras a 405 nm em espectrofotômetro (Titertek Multiskan, model 340). O cálculo da atividade hemolítica (percentual de hemólise) foi realizado seguindo os parâmetros descritos por Hertle *et al.* 1999. Cada experimento foi realizado em triplicata e foram usados como controle positivo SDS 20 % (p/v) e como negativo tampão PBS 5mM pH 7,2.

Neste experimento foi verificada a influência da temperatura de incubação na interação toxina-eritrócito. Para isto, diluições seriadas da enterotoxina foram ensaiadas com hemácias de rato, e a mistura incubada à 37°C e 4°C respectivamente. Verificou-se após 1 hora de cada um dos ensaios, os títulos de atividade hemolítica em função da recíproca da maior diluição que provoca o 50% de hemólise.

2.6.1-Inibição da atividade hemolítica devido a presença do colesterol

Para este experimento foi seguida a metodologia descrita por Ferguson *et al.*, (1997). A Ent-ctx (150 μg) foi incubada a 37°C durante 30 minutos com diferentes concentrações (450 ng-1 mg) do colesterol (8 mg/ml) preparadas em PBS 5mM pH 7,2. Após esse período de tempo, foi acrescentado um mesmo volume da suspensão de eritrócitos de rato 1% em PBS 5mM pH 7,2. A leitura dos resultados procedeu-se como descrito no item 2.6.

2.6.2-Neutralização do efeito hemolítico utilizando os antissoro anti-Ent-ctx

A capacidade de inibição do efeito biológico da Ent-ctx foi testada utilizando o antissoro descomplementado (56°C por 30 minutos) e a IgG anti-Ent-ctx purificada. Diluições seriadas (razão 2) de ambos soros anti-toxina foram misturadas (v/v) com a toxina purificada (25 μg ml⁻¹) preparada em PBS e incubadas a 37°C por 1 hora e posteriormente, overnight a 4°C. Após este período as misturas foram centrifugadas, 2 100 x g durante 10 minutos (Hitachi, model CF15D2), e 0,1 ml de cada uma das diluições foi aplicada em placa de microtítulo (Falcon), contendo hemácias de rato 1% em PBS como descrito para o teste de detecção da atividade hemolítica (item 2.6). As placas foram incubadas à 37°C. As leituras dos ensaios realizados em triplicata foram feitas diariamente até 48 horas. O título de soroneutralização foi considerado como o recíproco da maior diluição que inibiu o efeito de lise celular induzido pela Ent-ctx (James *et al.*, 1982).

2.7-Detecção da atividade citotóxica da Ent-ctx de *A. hydrophila*

2.7.1-Linhagens celulares

Células epiteliais intestinais humanas (HT29), proveniente do Banco de Células de Rio de Janeiro, passagem No.7 e de rim de macaco verde africano (Vero) (ATCC CCL81), passagem No.128 foram utilizadas para os experimentos. Ambas linhagens foram providenciadas pelo Laboratório de Cultura de Células, Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNICAMP.

2.7.2-Preparação das culturas celulares

As células foram rapidamente descongeladas em banho termostatzado à 37°C e transferidas para frascos (Corning) contendo MEM (meio mínimo essencial de Eagle) (Nutricell), suplementado com soro fetal bovino 10% (v/v) (SFB) (Nutricell) nas células Vero. Utilizou-se meio Mc Coy's 5A (Cellgro, USA) suplementado com SFB 15% (v/v) (Nutricell) para as células HT29. Foram adicionados em ambos os meios, solução de antibióticos 1% (v/v), contendo penicilina (1.000 UI/ml) e estreptomicina (250 ug ml⁻¹) (Sigma Chemical Co). As células foram mantidas em estufa com CO₂ a 37°C até a confluência da monocamada.

2.7.3-Teste de atividade citotóxica

Para o teste da atividade citotóxica da Ent-ctx em células Vero e HT29 foi seguida a metodologia descrita por Borenfreund & Puerner, (1984). Após 24 horas de cultivo, o meio de cultura foi descartado. A monocamada foi lavada com solução de PBS e tripsinizadas com ATV (associação tripsina-Versene). As células (2,5 x 10⁵ células ml⁻¹) foram ressuspensas nos meios específicos acrescidos com SFB 10% (v/v) e antibióticos 1% (v/v), e transferidas para placas de 96 cavidades, adicionando 0,1 ml da suspensão celular por orifício. As placas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas. Após a formação da monocamada celular o meio de cultura das placas foi dispensado. Duplicatas de diluições seriadas (razão 2) da Ent-ctx (50 ug ml⁻¹) foram preparadas em 0,1 ml de meio MEM contendo solução de gentamicina (10 mg ml⁻¹) 1% (v/v) e adicionadas às cavidades. As placas foram incubadas em estufa de CO₂, sendo realizadas observações em microscópio invertido (Nikon) durante 72 horas. O sobrenadante de cultura de *A. hydrophila* AH69 e o meio MEM foram utilizados como controles negativo. Para o controle positivo foi usado o sobrenadante de cultura de *E. coli*

verotoxigênica 8B. A interpretação dos resultados foi realizada considerando como positivo a recíproca da maior diluição da Ent-ctx que provocava 50% de efeito citotóxico nas culturas celulares.

2.7.4-Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado como descrito na metodologia de Borenfreund & Puerner, (1984) usando o vermelho neutro no ensaio colorimétrico quantitativo. A Ent-ctx purificada ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi aplicada nas células HT29 e Vero crescidas em microplacas de 96 orifícios numa concentração de 2×10^5 células ml^{-1} . Em intervalos de tempo pré-determinados (0,5; 1; 2 e 4 horas), o meio de cultura foi removido dos orifícios. As células foram lavadas com PBS pH 7,4 e posteriormente foi adicionada a cada cavidade 0,2 ml de meio MEM contendo $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ de vermelho neutro. A microplaca foi incubada durante 3 horas a 37°C . Para remoção do vermelho neutro não incorporado, as células foram lavadas durante 3 minutos com uma solução formol-cálcio preparada usando formaldeído 10% (v/v) e cloreto de cálcio anidro 1% (p/v). Finalmente, foram adicionados 0,2 ml da mistura de etanol 50% (v/v) e ácido acético 1% (v/v) a cada orifício. A microplaca foi mantida durante 15 minutos à T.A até realizar-nos a leitura a 540 nm em espectrofotômetro (Titertek Multiskan, model 340). A cinética da viabilidade celular após o tratamento com a Ent-ctx, foi expressa como o percentual de células viáveis em relação ao controle celular (células não tratadas com a Ent-ctx) em função do tempo de ensaio.

2.8-Estudo das alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx em células HT29

Para a realização destes ensaios as células HT29 foram crescidas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 cavidades, com 0,1 ml de suspensão celular por orifício, na concentração celular de 10^4 células ml^{-1} . Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 5% de CO_2 , durante 24 horas. Para cada ensaio, concentrações pré-determinadas da Ent-ctx foram preparadas em meio Mc Coy's 5A contendo gentamicina (10 mg ml^{-1}).

2.8.1-Ensaio para o estudo das alterações citoplasmáticas e nucleares

Neste ensaio, as células foram incubadas durante 4 horas com a Ent-ctx ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$). Após a visualização do efeito citopático, as lamínulas foram primeiramente lavadas com solução de PBS e posteriormente tratadas por 1 hora com solução de formaldeído

4% (v/v) em PBS à T.A. As lamínulas foram fixadas e depois lavadas com água destilada suficiente para retirar o excesso da solução fixadora. Para a coloração usou-se o Azul de Toluidina 0,025% (p/v) (AT) em tampão Mc Ilivane pH 4,0 (Mello & Vidal, 1980). As lamínulas foram coradas por 15 minutos, lavadas três vezes com água destilada e colocadas para secar ao ar. Por último, foram montadas em lâminas usando Entelan (Merck). O material foi observado em microscópio Axioskop (Zeiss), Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP.

2.8.2-Estudo das alterações ultraestruturais

As células HT29 cultivadas em lamínulas foram tratadas com a Ent-ctx (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) durante 4 horas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As células foram lavadas com PBS pH 7,4 e fixadas durante 1 hora à T.A. com o fixador Trump's (Dykstra, 1993). Posteriormente, o material foi pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% (v/v) em tampão Millonig (Souza *et al.*, 1998), lavado novamente e desidratado usando diferentes porcentagens de acetona em escala crescente (50-100%). O material foi embebido primeiramente numa mistura Epon-acetona (1:1, v/v) e logo em resina Epon até formação dos blocos. Seções ultrafinas foram cortadas utilizando-se ultramicrotomo LKB. Os cortes foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Leo 96, Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, UNICAMP.

2.8.3-Ensaio para o estudo da integridade da membrana celular

Neste ensaio foi avaliada a perda da permeabilidade da membrana através da detecção da desidrogenase láctica (LDH). Em intervalos de tempo pré-determinados (0,5; 1; 2 e 4 horas) a Ent-ctx purificada (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) foi aplicada nas células HT29. Após cada tempo, o meio de cultura foi retirado das cavidades sendo posteriormente colocados em gelo. Aliquotas de 80 μl das amostras foram adicionadas a uma suspensão contendo NADH (2,5 mg ml^{-1}) e ácido pirúvico (1 mg ml^{-1}) (Sigma) em tampão fosfato 100mM, pH 7,4. As leituras foram feitas cada 30 segundos durante 3 minutos a 340 nm em espectrofotômetro (DU 65 Spectrophotometer, Beckman). A atividade da LDH (Unidades ml^{-1}) foi determinada de acordo como descrito por Mitchell *et al.*, (1980) e comparada com os resultados obtidos no controle deste ensaio, Triton X-100 (25 $\mu\text{g ml}^{-1}$). A medida da liberação da enzima LDH por células HT29 foi expressa em função do percentual da atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo utilizado como controle negativo tampão Fosfato 100mM, pH 7,4.

2.8.4-Cinética do funcionamento mitocondrial

O MTT (tetrazolium salt), cor amarela, é um substrato químico que quando reduzido pela presença da enzima succinato desidrogenase gera o produto MTT reduzido (formazan) de cor azul que pode ser detectado através de espectrofotometria. No intuito de avaliar o funcionamento das mitocôndrias, o ensaio foi baseado na metodologia descrita por Borenfreund *et al.*, (1988). A Ent-ctx purificada ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi aplicada nas células HT29. Após cada intervalo de tempo (0,5; 1; 2 e 4 horas) o meio de cultura das cavidades foi substituído por $500 \mu\text{l}$ de MTT (1 mg ml^{-1}) (Sigma) e as microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e as microplacas foram lavadas com PBS durante 3 minutos. Posteriormente foram adicionados a cada orifício da placa, $500 \mu\text{l}$ da mistura de isopropanol e ácido clorídrico (30:1, v/v). As placas foram agitadas durante 15 minutos à T.A. até completar a reação enzimática. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 570 nm (DU 65 Spectrophotometer, Beckman). A atividade mitocondrial foi expressa em função do percentual de MTT reduzido formado, indicativo da liberação da enzima succinato desidrogenase, portanto da alteração induzida nestas organelas.

2.8.5-Estudo da distribuição de lipídios através do método de Sudán Black

O Sudán Black 0,3% (p/v) foi preparado em etanol 70% (v/v) e agitado durante 2 horas à T.A. Após o teste de citotoxicidade a diferentes tempos (0, 5; 1; 2; 4 horas) com a Ent-ctx ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$), as lamínulas foram lavadas com água destilada, e logo em seguida, com etanol 70% (v/v). As lamínulas foram coradas durante 10 minutos com o Sudán Black, lavadas com etanol, água destilada e finalmente montadas em meio aquoso e observadas em Microscópio Axioscopio, (Zeiss), Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP.

2.8.6-Deteção *in situ* de apoptose usando a técnica de TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling)

Para detectar a fragmentação do DNA genômico (característica padrão dos processos apoptóticos) a Ent-ctx ($20 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi aplicada nas células que seguidamente foram incubadas a 37°C por um período de 2 horas. As células HT29 foram fixadas com paraformaldeído 4% (v/v) em PBS 10mM pH 7,4 durante 3 minutos e processadas *in situ* usando o kit para a detecção de apoptose (Roche Diagnostics GmbH), segundo a metodologia descrita por Sgonc *et al.*, (1994). Nesta reação, os extremos terminais livres

3'OH, produto da quebra do DNA, foram marcados com nucleotídeos modificados com fluoresceína incorporada. Para isto, uma enzima TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) catalisou a polimerização destes nucleotídeos, sendo a fluoresceína detectada por um anticorpo anti-fluoresceína conjugado com POD (enzima peroxidase). Posteriormente, as células foram tratadas com DAB (4-dimetilaminobenzaldeído) (Roche), substrato para POD, e analisadas em microscópio (Axioskop, Zeiss) Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP.

2.8.7-Quantificação de células apoptóticas

As células HT29 tratadas com a Ent-ctx ($45 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante 4 horas foram fixadas com formaldeído 4% (v/v) em PBS 10mM pH 7,4 e foram submetidas à reação de Feulgen, como descrito por Mello & Vidal, 1978. O material foi lavado com PBS 10mM pH 7,4 e hidrolisado com HCl 4N à T.A. durante 75 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas várias vezes com água destilada e tratadas com o reativo de Schiff à T.A. durante 40 minutos. Após esse período de tempo, e depois de retirado o excesso de corante, as lamínulas foram tratadas três vezes com metabissulfito de sódio 5% (p/v) durante 5 minutos. Finalmente, as lamínulas foram lavadas, secadas ao ar e montadas em lâminas usando o Bálsamo de Canadá. Análises microscópicas foram realizadas através do Axioskop (Zeiss), permitindo computar *in situ* os valores Feulgen-DNA a partir da contagem das células que apresentaram condensação nuclear e citoplasmática, as quais foram consideradas apoptóticas, como descrito por Mello & Vidal, (1980). Neste ensaio foram utilizados triplicatas do controle e do tratamento.

2.8.8-Cinética da indução de apoptose

A Ent-ctx ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi aplicada nas células HT29 em intervalos de tempo pré-determinados (0, 5, 1, 2 e 4 horas). Após cada período, o meio de cultura foi retirado das cavidades e as lamínulas contendo células foram fixadas por 3 minutos, usando uma solução de paraformaldeído preparado a 1% (v/v) em PBS 10mM pH 7,4. Posteriormente as lamínulas foram lavadas e processadas usando o kit para a detecção de fragmentação do DNA *in situ* -TUNEL (Boehringer Mannheim Corp.). O percentual de células apoptóticas (baseados nas alterações nucleares típicas) foi determinado pela contagem de seis campos ópticos selecionados a partir de triplicatas das preparações.

2.8.9-Ensaio de fragmentação do DNA e eletroforese em gel de agarose

Após 4 horas de aplicação da Ent-ctx ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) nas cavidades da placa contendo HT29 num total de 2×10^6 células ml^{-1} foi seguido o procedimento descrito por Kuo *et al.*, 1999. As células foram lisadas com 500 μl de tampão de lise durante 10 minutos. O lisado foi centrifugado a $10\,000 \times g$ (Hitachi, model CF15D2) por 10 minutos e o sobrenadante contendo o DNA celular fragmentado foi coletado, sendo incubado com $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ de protease K à temperatura de 60°C durante 1 hora e posteriormente digerido com $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ de RNase por 2 horas à 37°C . A solução de DNA foi extraída duas vezes com fenol e uma vez com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v) e em seguida precipitada por 18 horas com uma solução de isopropanol 50% (v/v), acrescida de $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ de glicogênio à 20°C . Depois de centrifugado o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% (v/v) e suspenso em tampão Tris-HCl 10mM pH 8,0 contendo EDTA 1mM. Foram usadas como controle negativo células HT29 sem tratamento e como controle positivo células HT29 tratadas com DNase ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). As amostras foram submetidas à eletroforese horizontal, submersa em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão Tris-Borato 90mM pH 8,0 contendo EDTA 4mM. O gel foi corado com $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de brometo de etídeo e posteriormente visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

2.9-Detecção da atividade enterotóxica da Ent-ctx de *A. hydrophila*

2.9.1-Animais

Foram utilizados dois grupos de 10 ratos machos jovens de 15 dias de idade da linhagem Wistar, provenientes do Centro de Bioterismo –UNICAMP. Os animais pesaram entre 20-30 g e foram mantidos em jejum por 12 horas.

2.9.2-Teste de alça ligada em rato

O protocolo deste ensaio (No. 361-1) constou com prévia aprovação da Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP. Para o desenvolvimento do mesmo, os animais foram anestesiados com uma dose de ketamina 80 mg e xilacina 10 mg kg^{-1} de peso corporal, aplicada via intraperitonal, segundo descrito por Zuñiga *et al.* (2001). Após o efeito anestésico, os membros superiores e inferiores dos ratos foram contidos com elásticos ao suporte da cirurgia. A antisepsia da região abdominal foi realizada com solução de álcool 70° GL. Em seguida foi feita uma incisão na linha mediana da parede abdominal, tendo como ponto médio a cicatriz

umbilical. O intestino delgado foi exposto e mantido úmido com solução salina fisiológica. As alças intestinais foram amarradas com linha estéril, partindo-se do ceco, no sentido disto-proximal em direção ao estômago. Cada alça mediu aproximadamente 2 cm, com inter-alças de 0,5 cm, principalmente no segmento ileal do intestino. Posteriormente as alças foram inoculadas com 0,15 ml da toxina purificada ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$) e como controles do ensaio as alças foram inoculadas com o meio de cultura, TSB-EY. Após a inoculação os intestinos foram recolocados na cavidade abdominal, procedendo-se à sutura do peritônio, camada muscular e pele.

Os animais foram mantidos num local arejado, em gaiolas separadas, e eutanasiados um lote após 2 e outro lote após 6 horas do ensaio por inoculação arterial de CO_2 (Report of the AVMA, Panel of Euthanasia). A cavidade peritoneal foi aberta e o intestino delgado retirado e colocado numa bandeja com salina fisiológica. Os segmentos de intestino foram processados para a análise histopatológica.

2.10-Estudo das alterações morfológicas induzidas pela enterotoxina de *A. hydrophila* nas células epiteliais intestinais

2.10.1-Microscopia óptica

Segmentos de 1 cm de alça ligada foram fixados em paraformaldeído 4% (v/v) em PBS 10mM pH7,2 por 48 horas e em seguida lavados com o mesmo tampão por 24 horas. O material foi desidratado usando diferentes porcentagens de álcool etílico em escala crescente (70-100%). O material foi colocado em xilol por 1 hora e embebido em historesina BJ₄ (Polysciences). Os cortes de 0,5 μm foram corados com hematoxilina-eosina. Para a observação ao microscópio de luz, as lâminas foram montadas usando Entelan e analisadas em microscópio (Axioskop, Zeiss) Departamento de Biologia Celular, IB, UNICAMP.

2.10.2-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Fragmentos de tecido intestinal foram fixados usando a mistura de glutaraldeído 2% (v/v) e paraformaldeído 2% (v/v) (Kitajima *et al.*, 1999), durante 4 horas à T.A.. Em seguida os tecidos foram lavados com PBS e pós-fixados durante 2 horas com tetróxido de ósmio 1% (v/v) e ácido tânico 2% (v/v). Posteriormente foram desidratados gradativamente com álcool etílico, levados ao ponto crítico com CO_2 e cobertos com uma camada de ouro em evaporador Balzers (200 segundos, 40mA), para facilitar a

observação no Microscópio de Varredura Zeiss 964, Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, UNICAMP.

2.10.3-Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Segmentos intestinais de 1 mm³ foram fixados numa mistura de glutaraldeído 2% (v/v) e paraformaldeído 2% (v/v), adicionando ácido tânico 0,25% (p/v) e sacarose 5,4% (p/v) em tampão Millonig (Souza *et al.*, 1998). Em seguida o material foi lavado com o mesmo tampão e pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% (v/v). Após uma nova lavagem, o material foi desidratado usando diferentes percentagens de acetona (50-100%) e foi embebido em Epon. Seções ultrafinas foram cortadas usando ultramicrotomo LKB e contrastadas com acetato de uranila. Os cortes foram examinados em Microscópio Eletrônico de Transmissão Leo 96, Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB, UNICAMP.

2.11- PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Para a detecção dos genes LT-I, STa e STb em *A. hydrophila* (AH191) foi realizada a técnica de PCR segundo Ausubel *et al.*, (1989), com algumas modificações.

A amostra AH191 foi semeada numa placa de TSA (Difco) e incubada por 18 horas a 37°C. Duas alçadas da cultura bacteriana foram coletadas e dissolvidas em 100 µl de água Milli-Q estéril. Ferveu-se por 10 minutos para romper a parede e membranas bacterianas e iniciar a desnaturação do DNA. Para evitar o anelamento do DNA, o material foi colocado imediatamente em banho de gelo após fervura e foi mantido assim até o momento do uso. Os reagentes utilizados neste teste, assim como volume e concentração final se encontram descritos na tabela 1.

Os iniciadores utilizados foram específicos para cada enterotoxina como descrito por Blanco *et al.*, 1997. O marcador de peso molecular (1Kb Ladder-Gibco BRL) foi utilizado como padrão para comparação do peso molecular do fragmento amplificado.

Tabela 1- Componentes e condições da reação de PCR.

Componentes	Volume (μl)	Concentração final
"PCR buffer" 10x ^❶	10	1x
"dNTP mixture" 10mM ^❶	2	0,2 mmol
Iniciadores ^❷	6,5	50 pmol
DNA molde	10	-
"Taq DNA polimerase" ^❶	0,5	2,5 U
MgCl ₂ 50mM ^❶	3	1,5 mmol
H ₂ O Milli-Q estéril	57	-
Total	100	-

^❶ Reagentes Gibco-BRL ^❷ Reagentes Pharmacia-Biotech

Para a amplificação, o material foi submetido a 30 ciclos térmicos no Termociclador (MJ Research, model PTC-150-16) nas seguintes condições:

- 94°C- 1minuto- Separação das fitas;
- x°C-x tempo Temperatura de anelamento específico para cada par de iniciadores
- 72°C- 1minuto- Atividade da Taq polimerase

Para visualização dos resultados, os produtos da amplificação foram aplicados em gel de agarose a 1% (p/v), e submetidos a uma diferença de potencial de 100v. Após a corrida, os géis foram corados com Brometo de Etídeo (0,5 μl/ml) por 20 minutos, e observados em transiluminador (Ultra Violet Products)

2.12-Detecção da atividade proteolítica da Ent-ctx de *A. hydrophila*

2.12.1-Zimografia em gel de poliacrilamida com SDS e gelatina

Para a detecção de atividade proteolítica foi realizada uma eletroforese segundo como descrito no item 2.5.1., com algumas modificações. A Ent-ctx ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) foi misturada (v/v) com o tampão de amostra sem aquecimento. Foram aplicados 25 μl da amostra em gel de SDS-PAGE 10%, contendo gelatina 1% (p/v) (Merck). Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,0, contendo Triton X-100 2,5% (v/v) (Sigma) durante 1 hora. O gel foi primeiramente equilibrado com o mesmo tampão sem o Triton X-100 durante 30 minutos, seguido de uma incubação por 3 horas a 30°C. O gel foi corado durante 30 minutos com Azul de Coomassie R-250 0,23% (p/v) (Sigma) preparado em ácido acético glacial 6% (v/v) e metanol 30% (v/v) (Merck) e posteriormente descorado com a mistura metanol 10% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

Resultados

3. RESULTADOS

3.1-Determinação da concentração proteica citotóxica da Ent-ctx de *A. hydrophila*

A concentração de proteínas estimada pelo método de Bradford para a Ent-ctx foi de $500\mu\text{g ml}^{-1}$.

3.2-Obtenção e purificação do antissoro anti-Ent-ctx de *A. hydrophila*

O antissoro de coelho anti-Ent-ctx obtido a partir do esquema de imunização utilizado, mostrou um título de 1:64 em imunodifusão radial. Foram coletados 55 ml de soro, dos quais 35 ml foram processados para purificação da IgG anti-Ent-ctx através da cromatografia de Afinidade Hi-Trap Protein A (Figura 1), garantindo-se um aumento do título para 1:1024.

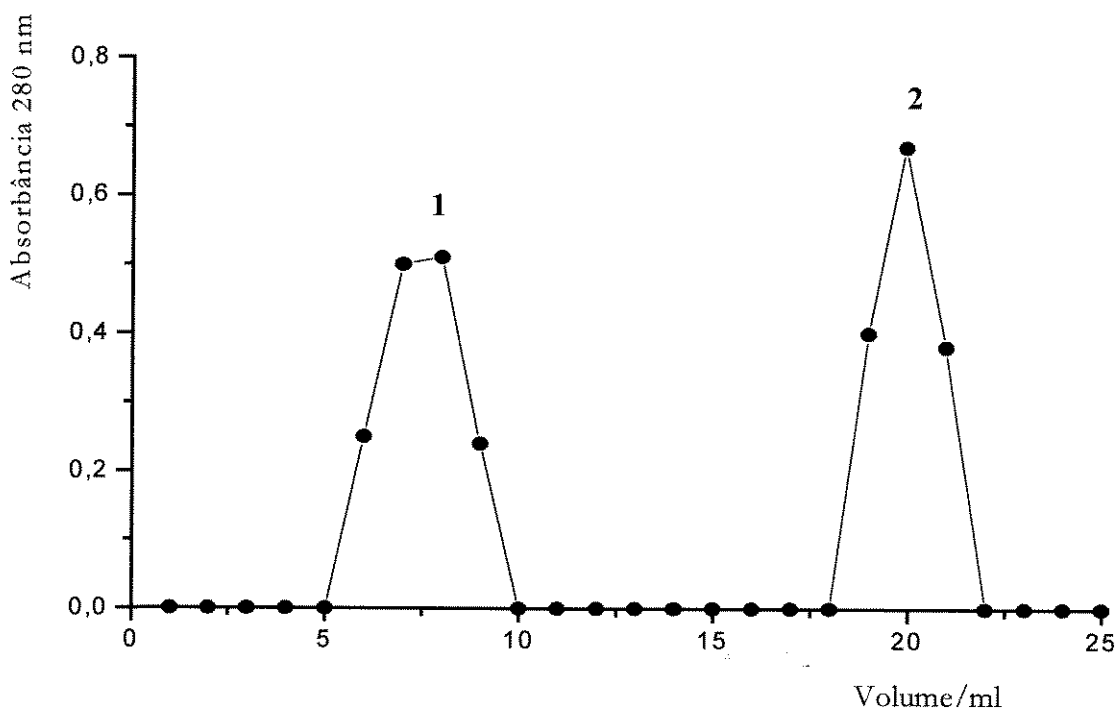


Figura 1: Perfil cromatográfico obtido com a coluna de afinidade Hi-Trap Protein A (Pharmacia), utilizada para a purificação da IgG anti-Ent-ctx. (1)- Pico contendo outras frações proteicas do soro. (2)- Pico obtido a partir da eluição com o tampão Tris-Glicina 100 mM pH 2,8, mostrando a obtenção da IgG anti-Ent-ctx purificada.

3.3-Imunodeteccção da Ent-ctx através do Western Blotting

A análise do imunoblotting (Figura 2) revelou uma única banda, com um peso molecular aproximado de 54 kDa, frente ao antissoro descomplementado a 56°C (diluição 1:100) (Fig.2, coluna 2), e frente a IgG anti-Ent-ctx purificada em cromatografia de afinidade Hi-Trap Protein A (diluição 1:400) (Fig. 2, coluna 3). Não houve imunoafinidade quando foram ensaiados os soros pré-ímmes frente a Ent-ctx (Fig 2, coluna 1).

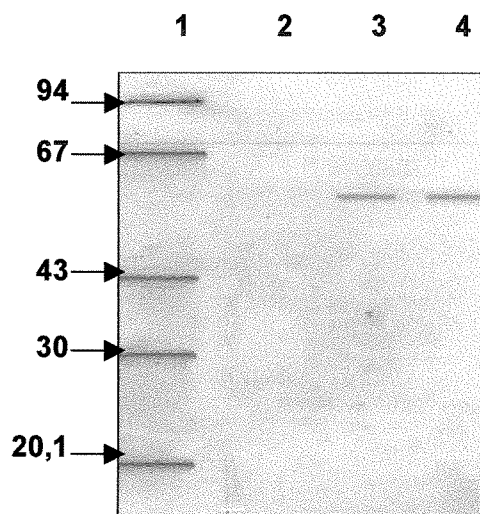


Figura 2: Western-Blotting da enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila* frente: soro pré-ímmune[coluna 2], antissoro descomplementado a 56°C (diluição 1:100) [coluna 3], IgG anti-Ent-ctx purificada (diluição 1:400) [coluna 4], padrão de peso molecular [coluna 1].

3.4-Sensibilidade de diferentes espécies de eritrócitos à Ent-ctx.

Neste teste foi avaliada a capacidade da Ent-ctx de induzir lise celular em diferentes tipos de hemácias: boi, carneiro, cavalo, cobaia, coelho, galinha e rato.

Como se pode observar na Figura 3, as hemácias provenientes de rato, cavalo e cobaia mostraram uma sensibilidade maior ao teste de atividade hemolítica, comparadas às outras hemácias estudadas.

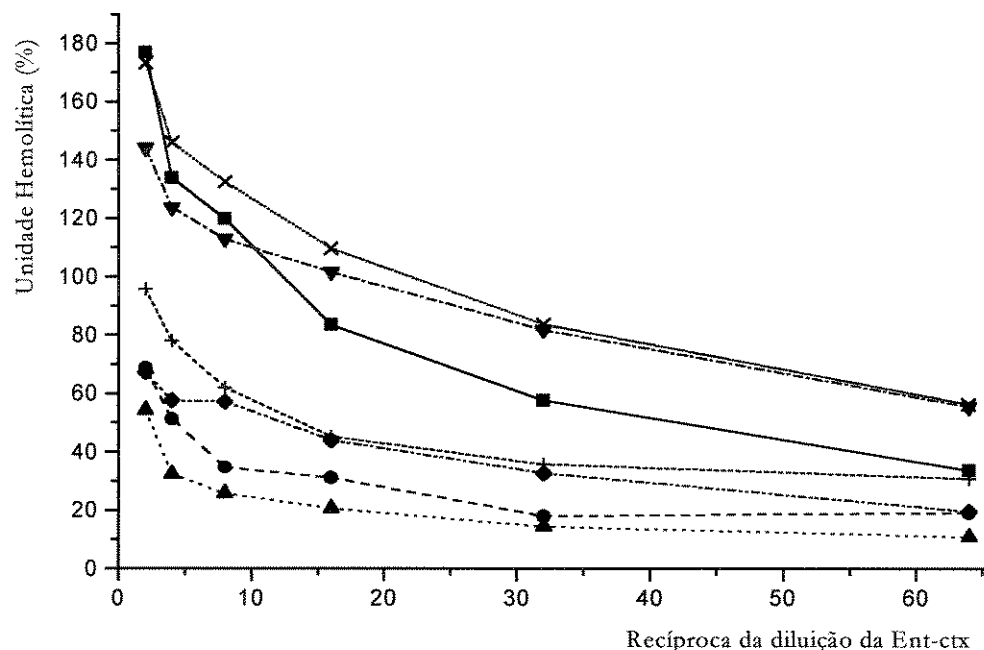


Figura 3: Atividade hemolítica da enterotoxina citotóxica de *A. hydrophila* frente a hemácias de: boi (●), cavalo (■), carneiro (▲), cobaia (▼), coelho (+), galinha (◆), rato (x).

Nossos resultados (não mostrados) indicaram que a temperatura constitui um importante fator ao avaliar o efeito que induz a Ent-ctx nos diferentes tipos de hemácias. Os experimentos demonstraram que não houve liberação de hemoglobina (visualmente detectável) quando a primeira incubação hemácia-toxina foi realizada a 4°C. Entretanto, houve um aumento significativo nos títulos da atividade hemolítica, quando o teste foi realizado incubando o ensaio primeiramente a 37°C e posteriormente a 4°C.

3.5-Influência do colesterol na atividade hemolítica da Ent-ctx de *A. hydrophila*.

Na presença do colesterol, nenhuma alteração (inibição ou ativação) da atividade hemolítica da Ent-ctx frente às hemácias de rato foi constatada (resultados não mostrados).

3.6-Neutralização do efeito hemolítico através dos antissoros anti-Ent-ctx de *A. hydrophila*

Os resultados obtidos no teste de soroneutralização utilizando o antissoro descomplementado e a IgG anti-Ent-ctx demonstraram que ambos os antissoros exerceram um efeito inibitório da atividade hemolítica, induzida pela Ent-ctx em hemácias de rato. O título expresso para o antissoro descomplementado foi de 1:16384 e para a IgG purificada de 1:65536. Ensaio prévios com os soros pré-ímmes não apresentaram nenhum efeito de neutralização sobre a capacidade hemolítica da Ent-ctx.

3.7-Atividade citotóxica da Ent-ctx de *A. hydrophila* em células Vero e HT29

Neste teste foi avaliada a capacidade da Ent-ctx de induzir o efeito citotóxico *in vitro*, frente às duas linhagens celulares. A Ent-ctx causou alterações morfológicas em células HT29 e Vero, sendo observados, entre as principais características, arredondamento celular, intensa condensação nuclear e descolamento da monocamada celular (resultados não mostrados).

Os títulos da atividade citotóxica foram expressos como a recíproca da maior diluição que causavam os efeitos citopáticos descritos, sendo para as células Vero igual a 1:256 e para HT29, 1:512.

3.8-Testes de viabilidade celular em células Vero e HT29

A Figura 4 mostra os resultados obtidos no teste de viabilidade celular, expressos como a porcentagem de células HT29 e Vero viáveis em função do tempo, frente à Ent-ctx de *A. hydrophila*. A viabilidade celular apresentou-se comprometida para ambas as células, a partir dos primeiros 30 minutos do teste, sendo evidente uma queda de quase 50% das células viáveis a partir de 2 horas do início do teste. Neste teste, ambas células mostraram similar sensibilidade frente à ação citotóxica da Ent-ctx.

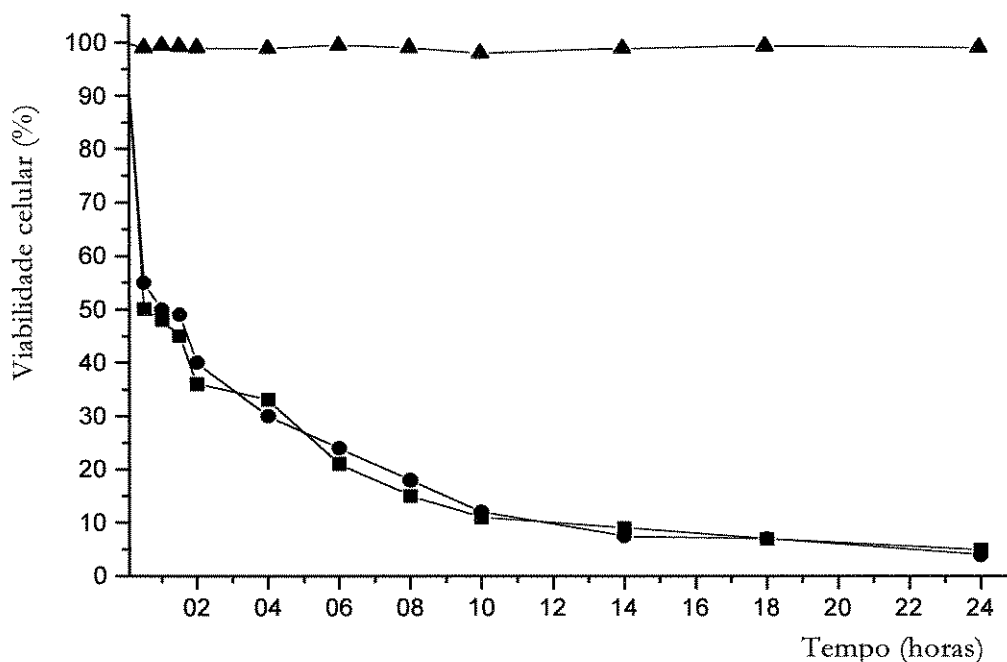


Figura 4: Cinética da viabilidade celular de células HT29 (■) e Vero (♦) tratadas com a Ent-ctx de *A. hydrophila*. Para ambas as linhagens a viabilidade celular foi expressa como o percentual de células sobreviventes à ação citotóxica da Ent-ctx nos diferentes tempos pré-determinados. Controle celular (▲).

3.9-Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx de *A. hydrophila* em células epiteliais intestinais humanas HT29

A Figura 5 mostra o efeito citotóxico causado pela Ent-ctx nas células HT29 coradas com azul de toluidina em comparação com o controle celular (Figura 5B). Em geral as células apresentaram uma progressiva condensação cromatínica, aparentemente picnótica (Figura 5A), observando-se aspectos de fragmentação nuclear.

Ressalta-se a eliminação de fragmentos citoplasmáticos na forma de “pequenas bolhas” formadas a partir da invaginação do citoplasma celular, efeito conhecido como “blebbing”. Ambas constituem características típicas de processos apoptóticos.

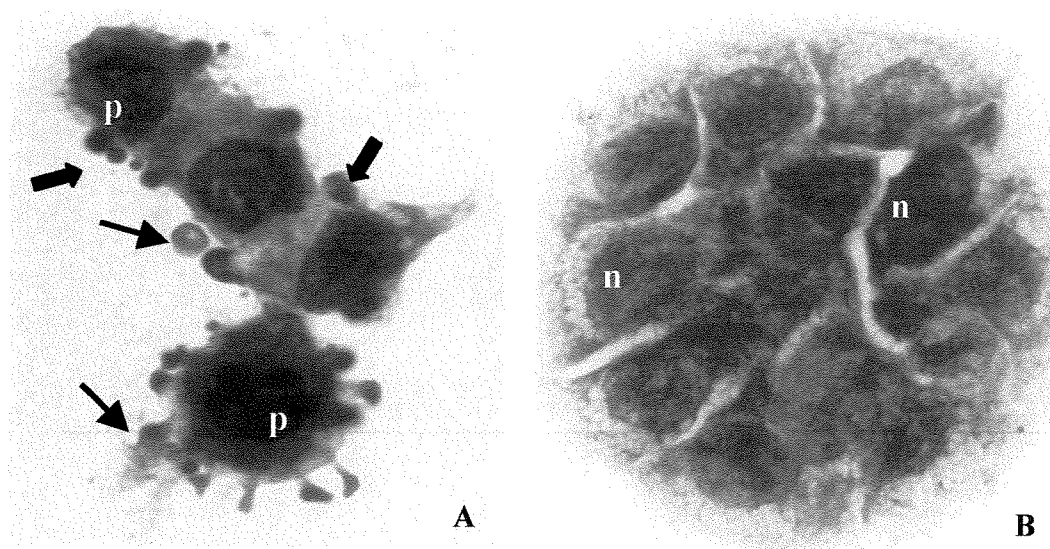


Figura 5: Fotomicrografia do efeito citopático induzido pela Ent-ctx de *A. hydrophila* em células HT29. Coloração com Azul de toluidina. Aumento 1075x. (A)-Intensa condensação cromatínica, aparentemente picnótica (p). Profusão de fragmentos citoplasmáticos, “blebbing” (→). Fragmentação nuclear, apoptose (➡). (B)-Controle celular HT29, núcleo normal (n).

3.10-Ultraestrutura das células HT29 tratadas com a Ent-ctx de *A. hydrophila*.

As análises ultraestruturais das células HT29 tratadas com a Ent-ctx mostraram aspectos de desorganização citoplásmica com perda da polaridade, assim como alta condensação nuclear e cromatínica (Figura 6B). A profusão de fragmentos plasmáticos “blebbing” (Figura 6C, seta→), contendo material de diferentes densidades eletrônicas foi também verificada. As observações microscópicas revelaram a presença de vesículas de diferentes tamanhos dispersas no citoplasma das células HT29, sugerindo um efeito de vacuolização citoplasmática, causado pela ação da Ent-ctx. O controle celular mostrou certa polarização e inúmeras projeções na membrana plasmática, típicas de células de natureza epitelial (Figura 6A).

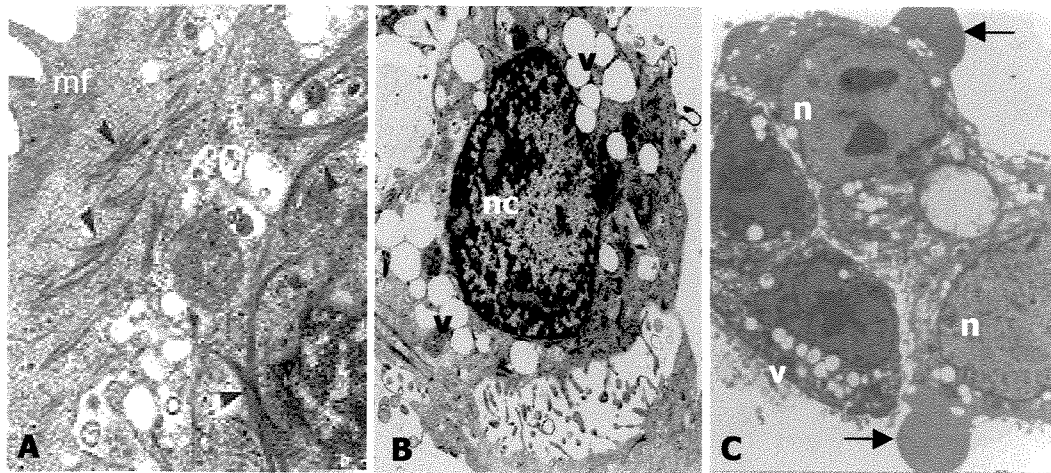


Figura 6: Fotomicrografia dos aspectos ultraestruturais obtidos em HT29 após o tratamento com a Ent-ctx. (A)-Controle celular, apresentando microfilamentos (mf) e abundantes fibras de colágeno (►). Aumento 20000x. (B)-Célula mostrando núcleos condensados (nc) e um aumento no número de vesículas (v), 8000x. (C)-Células com núcleos grandes (n) e fragmentos plasmáticos “blebbing” (→), formados a partir de expansões citoplasmáticas. Múltiplas vesículas (v) de diversos tamanhos estão dispersas no citoplasma celular, 2500x.

3.11-Efeito da Ent-ctx de *A. hydrophila* sobre a integridade da membrana celular e a função mitocondrial

Na Figura 7 mostram-se os resultados obtidos da análise da perda de integridade da membrana celular e da função mitocondrial de células HT29, devido à ação citopática da Ent-ctx. Verificou-se que houve uma diminuição acentuada da capacidade funcional das mitocôndrias após os primeiros 30 minutos do ensaio, atingindo valores menores que 50% do produto MTT reduzido. Por outro lado, observou-se um aumento da atividade enzimática da LDH às 3 horas (70%), chegando a ser máximo com 4 horas do ensaio. Estes resultados sugerem que, a perda da função mitocondrial nas células HT29 precede a ocorrência da destruição da membrana celular.

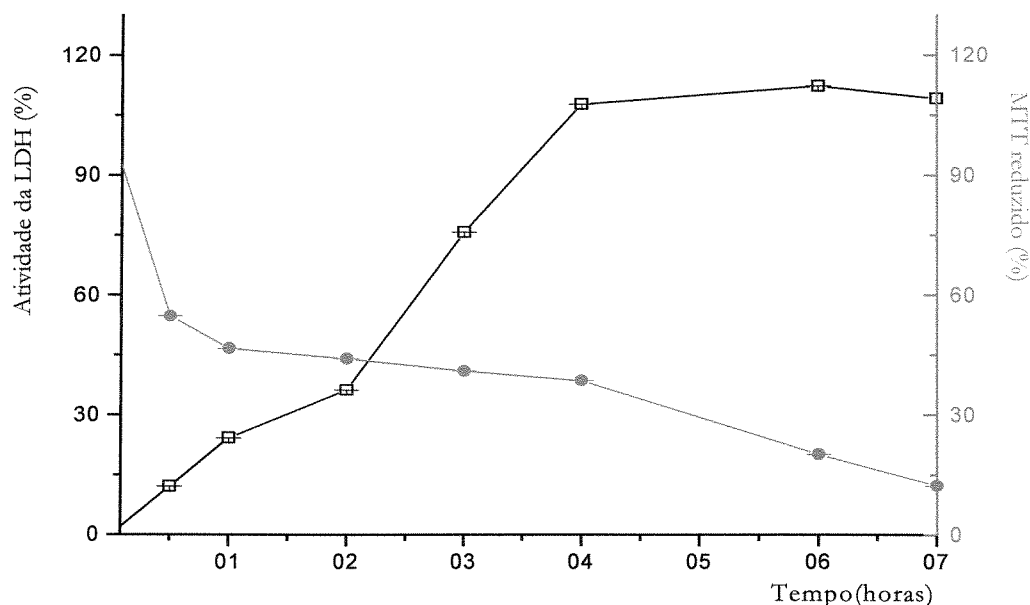


Figura 7: Cinética da atividade da enzima LDH (□) e da formação do MTT reduzido (●). Os valores percentuais (%) representados no gráfico foram calculados a partir de experimentos realizados em triplicata.

3.12-Distribuição de lipídios

Ao ensaiar o método de Sudán Black (corante específico para lipídios), nas células HT29, observou-se que naquelas tratadas com a Ent-ctx os lipídios encontravam-se geralmente dispersos no citoplasma celular (Figura 8B), enquanto nas células controle os lipídios foram observados principalmente na periferia das células (Figura 8A). Estes resultados sugerem a possível causa do aumento de vesículas no citoplasma das células HT29 tratadas com a Ent-ctx, quando realizadas as análises ultraestruturais. No entanto, não descartamos a possível presença de vacúolos embora limitada a sua visualização.

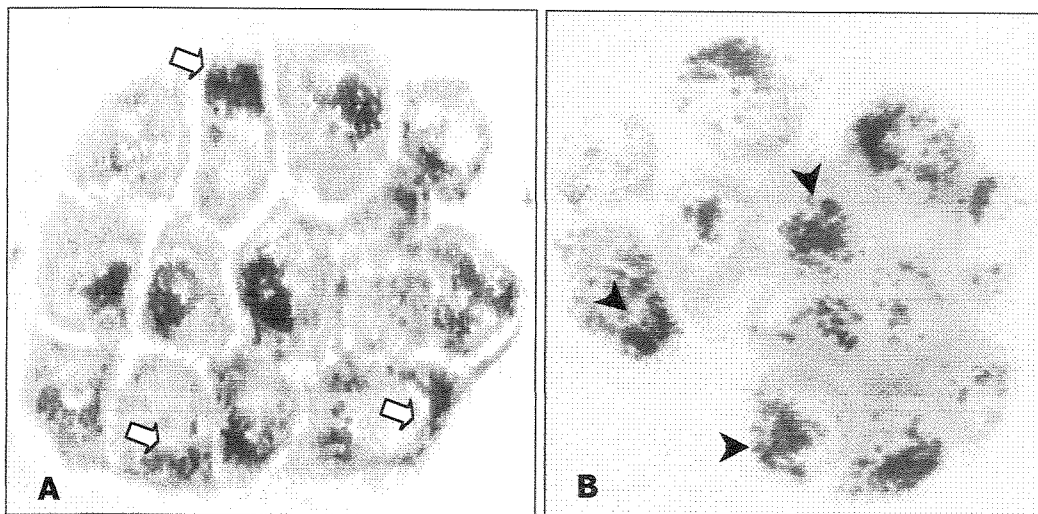


Figura 8: Fotomicrografia obtida ao ensaiar o método de Sudán Black em células HT29, Aumento 1075x. (A)-Controle celular. Note-se que os lipídios encontram-se localizados principalmente na periferia das células ($\Rightarrow$). (B)- Células após o tratamento com a Ent-ctx de *A. hydrophila*. Observou-se que naquelas células, onde os efeitos de perda de junção e arredondamento celular são evidentes, predomina a dispersão dos lipídios através do citoplasma celular ($\blacktriangleright$).

3.13-Indução de apoptose pela Ent-ctx de *A. hydrophila*

A quantificação de células apoptóticas ensaiadas com a reação de Feulgen, revelaram um incremento significativo de $20 \pm 5,12$ células apoptóticas por campo, quando comparadas ao controle celular ($3 \pm 1,20$) (Figura 9A). A fragmentação internucleossômica, representativa de processos apoptóticos, foi confirmada com o gel de agarose 2% através da presença de múltiplas bandas de 200 pb (Figura 9B). A metodologia do TUNEL permitiu detectar *in vitro* a fragmentação nuclear em células HT29 tratadas com a Ent-ctx (Figura 9D-E), sendo observadas em marrom escuro os corpos apoptóticos, assim como as células que apresentavam intensa condensação nuclear. A cinética da morte celular induzida pela Ent-ctx (Figura 9C), mostrou um incremento importante da formação de corpos apoptóticos nos primeiros 30 minutos do experimento. Após esse período de tempo contata-se uma diminuição do percentual de células com DNA fragmentado.

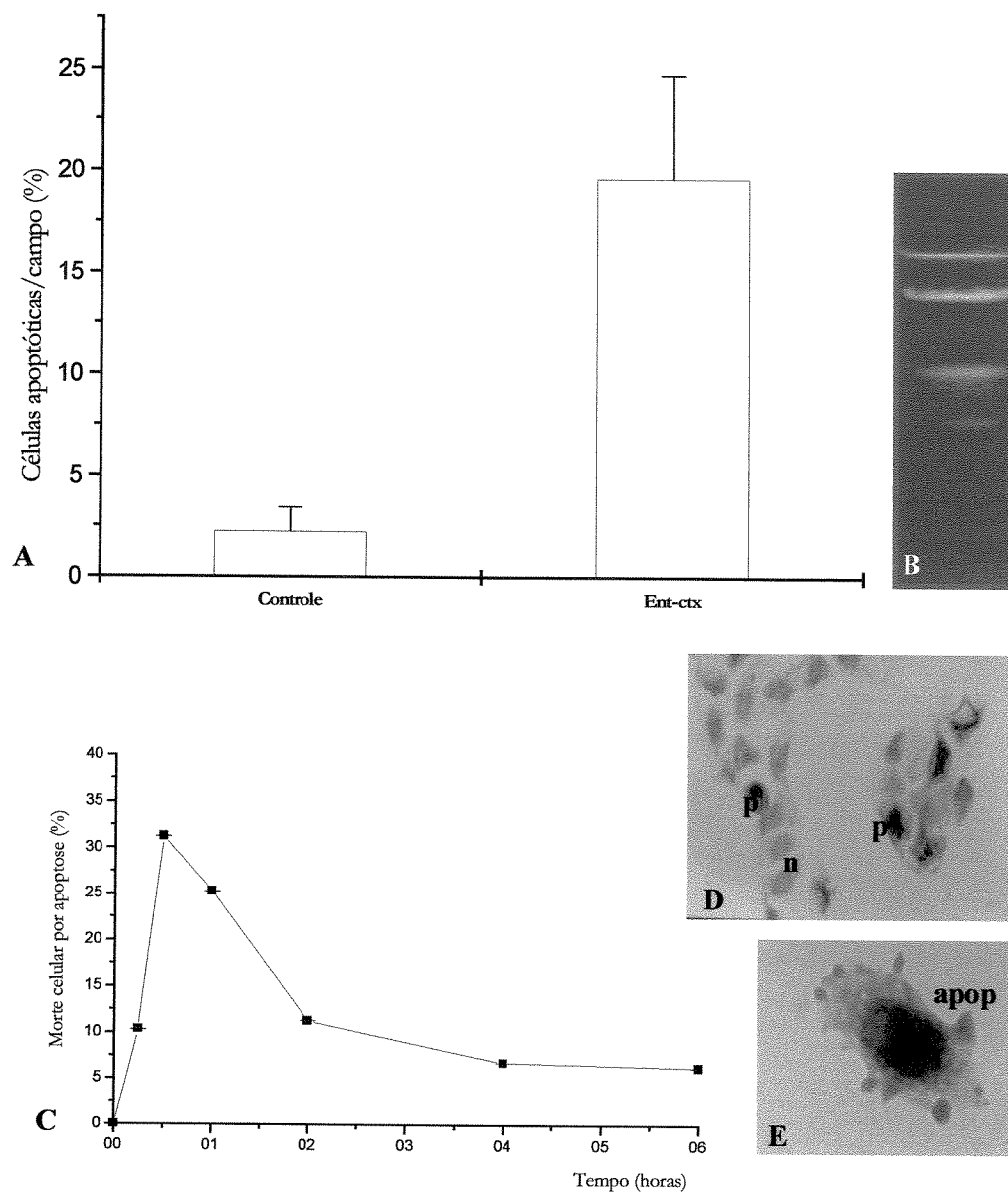


Figura 9: Indução de apoptose pela Ent-ctx de *A. hydrophila* em células HT29. (A)-Percentual de células apoptóticas por campo quantificadas pela reação de Feulgen comparadas ao controle celular. (B)-Eletroforese em gel de agarose 2% com múltiplas bandas de 200 pb representando a fragmentação nuclear do DNA. (C)-Cinética da morte celular por apoptose em HT29 tratadas com a Ent-ctx quantificada usando o ensaio de TUNEL. (D)-Células apoptóticas com intensa condensação nuclear, picnose (p) e células normais (n). (E)-Células HT29 com intensa fragmentação nuclear, expelindo corpos apoptóticos (apop), Aumento 430x.

3.14-Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx de *A. hydrophila* nas células epiteliais intestinais de rato

Os resultados obtidos após o ensaio de enterotoxicidade mostraram acúmulo de fluido viscoso, o que supõe uma elevada secreção de muco nas alças tratadas com a enterotoxina de *A. hydrophila*. Após o contato das células epiteliais intestinais com a Ent-ctx, foram observadas algumas áreas hemorrágicas. As análises histológicas revelaram redução do tamanho e dilatação das vilosidades intestinais, aparentemente causados por edema quando comparadas com as células controles de aparência normal (Figura 10A). Em algumas regiões constatou-se a dilatação de vasos linfáticos (Figura 10B). Na lâmina própria e submucosa observou-se a presença de infiltrado inflamatório difuso constituído por eosinófilos e nas camadas musculares um infiltrado focal composto por neutrófilos (Figura 10C). Outros aspectos significativos foram a exposição da lâmina própria na região do ápice das vilosidades intestinais devido a perda focal de enterócitos (Figura 10D) e o predomínio de restos celulares no lúmen intestinal.

3.15-Análises ultraestruturais das células epiteliais intestinais de rato após o tratamento com a Ent-ctx de *A. hydrophila*

3.15.1-Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises ultraestruturais revelaram destruição severa das vilosidades e a presença abundante de muco na porção apical das mesmas. Danos evidentes foram constatados na região do íleo quando comparado com o jejuno, sugerindo que a porção ileal do intestino seja mais sensível para o efeito enterotóxico desta toxina. Após 2 horas do ensaio, Ent-ctx foi capaz de induzir uma severa desorganização estrutural, provocando a destruição de enterócitos (Figura 11C-F).

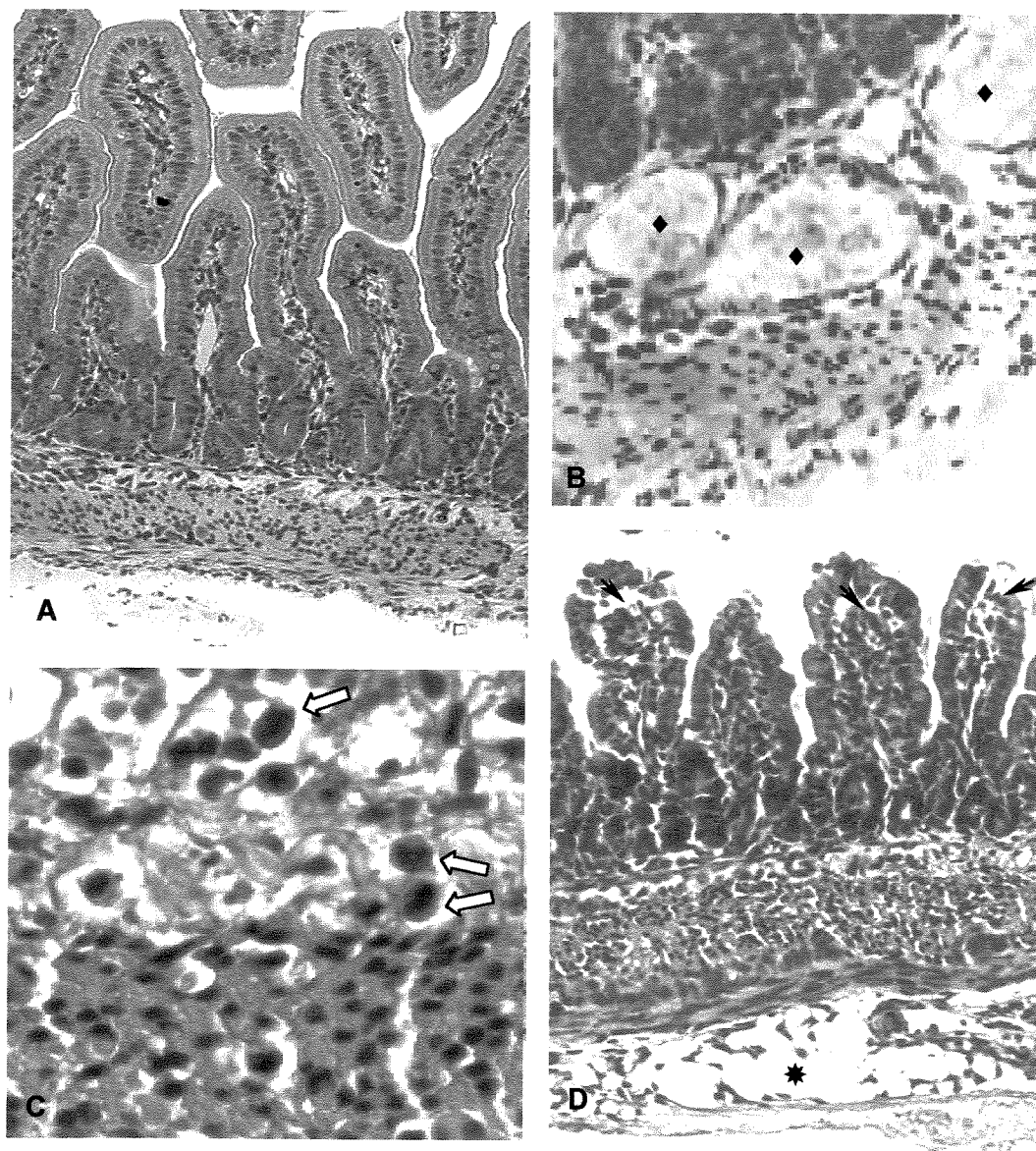


Figura 10: Alterações morfológicas induzidas pela Ent-ctx de *A. hydrophila* em células epiteliais intestinais. (A)-Controle de células epiteliais, 430x. (B)- Regiões mostrando vasos linfáticos dilatados (◆), 640x. (C)-Infiltração de neutrófilos nas camadas submusculares (⇒), 1075x. (D)-Células epiteliais intestinais mostrando desarranjo estrutural com exposição da lâmina própria na região do ápice das vilosidades (➤) e perda da membrana basal (*), 430x.

A perda de integridade nas células suporte do tecido conectivo (Figura 11D), derivou na exposição da lâmina própria, a qual mostrou-se compactada e reduzida quando comparada com o controle da vilosidade intestinal (Figura 11A-B). Assim como a lâmina própria, vasos linfáticos mostraram-se expostos devido à perda do arranjo celular (Figura 11C).

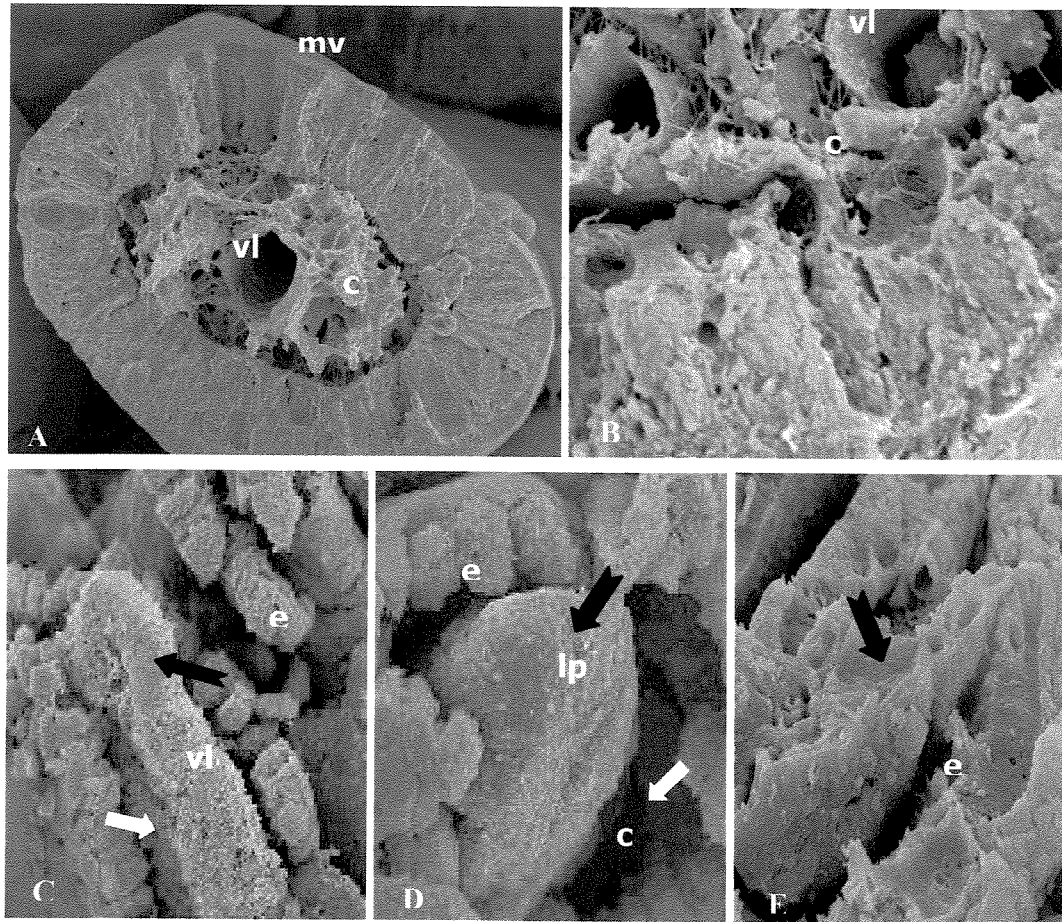


Figura 11: Análises ultraestruturais das células epiteliais intestinais de rato através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura. (A)-Vista interna de uma vilosidade intestinal controle, mostrando vasos linfáticos (vl), tecido conectivo (c), microvilosidades (mv), sem alterações, 1500x. (B)-Detalhes ultraestruturais da organização das células epiteliais intestinais, 3300x. (C-E)-Vilosidades intestinais de rato após o tratamento com a Ent-ctx de *A. hydrophila*. Observa-se desarranjo da arquitetura celular, principalmente das células do tecido conectivo (seta branca). A perda de enterócitos leva à exposição da lâmina própria e vasos linfáticos (seta preta), Aumento 900x (C), 1600x (D) e 1500x (F).

Os efeitos de dilatação (aumento do volume) e redução do tamanho das vilosidades tratadas com a Ent-ctx em comparação às células controles se repetiram nas observações feitas através da microscopia de varredura (Figura 12). Nas análises microscópicas também verificou-se que as células superficiais das vilosidades, ao contrário do controle, mostraram desarranjo celular (Figura 12).

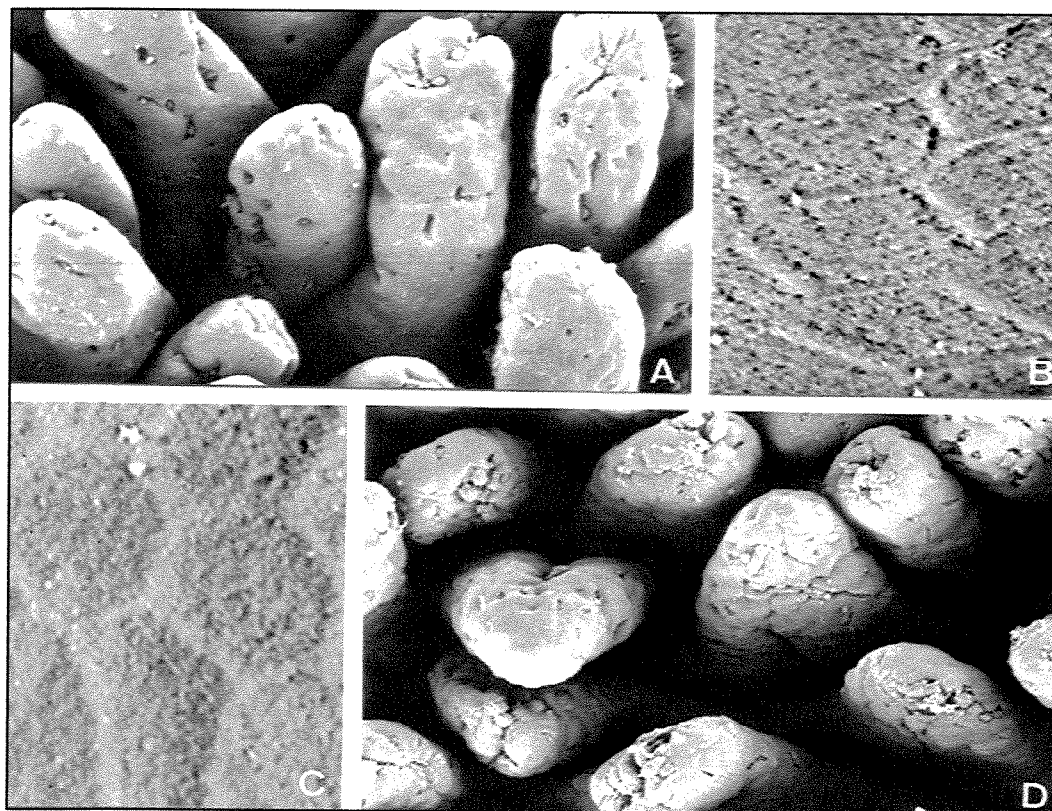


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura das células epiteliais intestinais de rato. (A)-Controle das vilosidades intestinais, 270x. (B)-Organização das células epiteliais superficiais, 2300x. (C-D)-Vilosidades intestinais tratadas com a Ent-ctx de *A. hydrophila*. Observa-se desarranjo da arquitetura das células superficiais, assim como dilatação e redução do tamanho das vilosidades quando comparadas ao controle, Aumento 2300x (C) e 270x (D).

3.15.2-Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As análises microscópicas revelaram severos danos ultraestruturais quando as vilosidades intestinais foram tratadas com a Ent-ctx de *A. hydrophila*. Devido ao acúmulo de secreções, alterações morfológicas foram observadas começando pela lâmina basal até chegar as microvilosidades (Figura 13B). As principais alterações constatadas após 2 horas de experimento foram a infiltração de células linfocitárias no epitélio, perda de junção intercelular e dilatação de estruturas celulares e organelas.

Nas análises ultraestruturais verificou-se a presença de eosinófilos e macrófagos. Após 6 horas de ensaio, o número de granulócitos aumentou e foram constatadas células fagocitárias (macrófagos), sugerindo que houve ativação de quimiotaxia como produto da ação toxigênica nos enterócitos (Figura 13C-D). Na região basal das células epiteliais observou-se um aumento do volume devido à infiltração de material com densidade semelhante à do plasma, contido nos vasos linfáticos, levando à formação de invaginações da membrana, consequentemente à desorganização na membrana basal (Figura 13E). Alterações intracelulares mostraram perturbações na estrutura das mitocôndrias caracterizadas por um aumento considerável do volume celular, assim como a redução e posterior destruição das cristas mitocondriais (Figura 13F-G). Também se pode observar que durante o tratamento com a Ent-ctx perdeu-se a associação entre os filamentos de actina e constatou-se desarranjo das microvilosidades. Finalmente, é notório que todas estas alterações levaram à destruição e descolamento das células epiteliais (Figura 13I). O controle celular não mostrou alterações na orientação das microvilosidades e nenhuma modificação na estrutura das organelas celulares (Figura 13A).

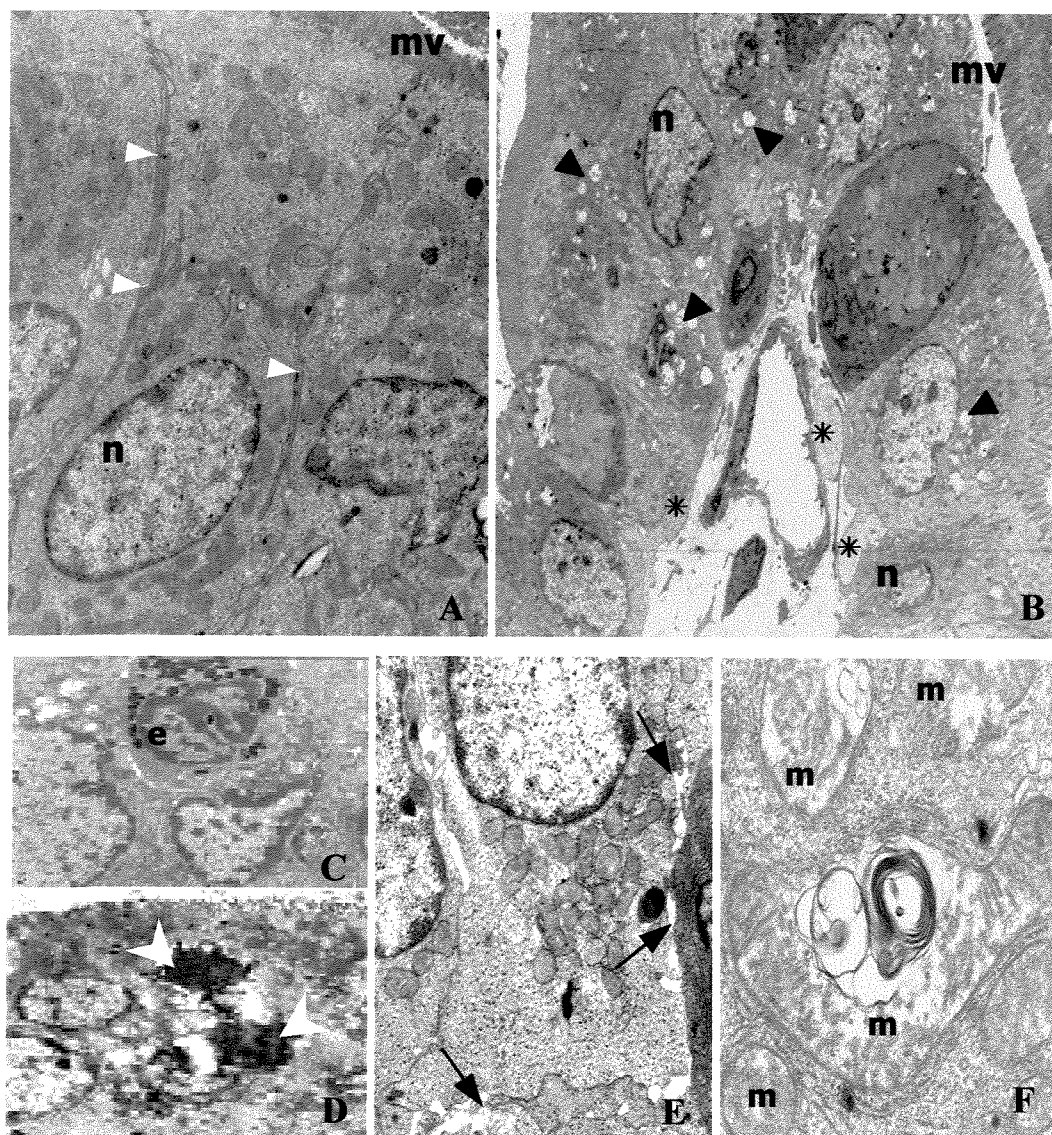


Figura 13: Aspectos ultraestruturais obtidos nas vilosidades intestinais após o tratamento com a Ent-ctx de *A. hydrophila*, utilizando MET. (A)-Controle da célula epitelial intestinal de rato, núcleo (n), microvilosidades (mv), junção intercelular (seta branca), 2700x. (B)-Vista geral das células epiteliais intestinais e as alterações provocadas pela ação da Ent-ctx. Note-se destruição das mitocôndrias (►), perda da membrana basal (*), assim como condensação nuclear (n) de algumas células, 2300x. (C)-Presença de eosinófilos (e) no epitélio celular, 8100x. (D)-Presença de células fagocitárias (macrófagos, ►) na região apical das vilosidades, 25000x. (E)-Instabilidade da membrana basal, levando perda da junção intercelular (→), 11000x. (F)-Perturbações na estrutura das mitocôndrias caracterizadas por um aumento considerável do volume celular, assim como a destruição e redução das cristas (m), 37000x.

3.15.3-Desarranjo na arquitetura das microvilosidades induzido pela Ent-ctx de *A. hydrophila*

As análises na microscopia eletrônica de transmissão permitiram mostrar que nas células epiteliais intestinais controle, a rede de filamentos de actina constitui o cerne das microvilosidades (Figura 14a), dando-lhe a estrutura e o formato característico as mesmas (Figura 14A). Após o tratamento com a Ent-ctx, observou-se a perda de associação entre os filamentos de actina (Figura 14b) conseqüentemente a estrutura de feixe que dá consistência as microvilosidades, provocando o desarranjo na arquitetura das microvilosidades (Figura 14c).

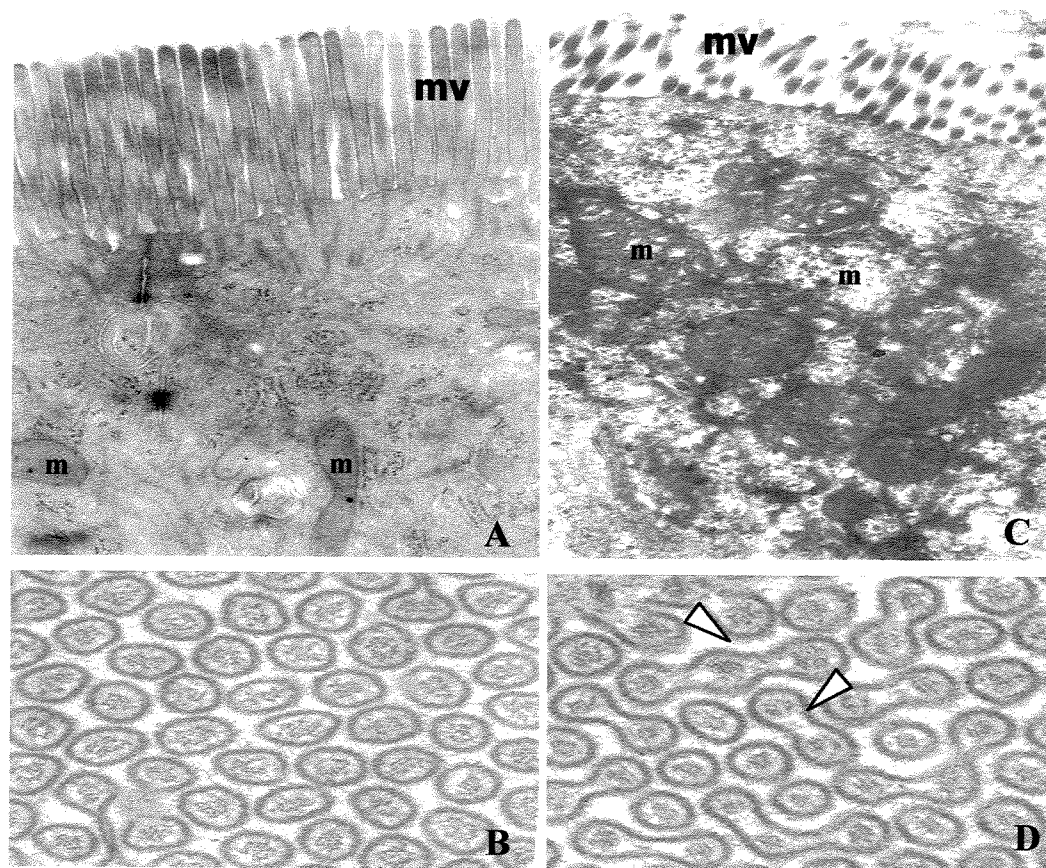


Figura 14: Alterações no citoesqueleto das microvilosidades induzidas pela Ent-ctx de *A. hydrophila*. (A)-Controle celular, microvilosidades (mv), mitocôndrias (m), 27000x. (B)-Feixe de actina que formam as microvilosidades intestinais das células controle, 36000x. (C)-Enterócito em fase de morte celular, mostrando mitocôndrias dilatadas (m) e o desarranjo das microvilosidades (mv), 25000x. (D)-Perda da organização na rede de filamento de actina, 36000x.

3.16-Presença de genes relacionados à enteropatogenicidade

Não foram observadas a presença dos genes LT-I, Sta e STb de *E. coli* no DNA cromossômico da amostra AH191 de *A. hydrophila*, produtora da enterotoxina citotóxica, através das técnicas do PCR.

3.17-Atividade proteolítica da Ent-ctx de *A. hydrophila*

Pode-se confirmar através das técnicas zimográficas que nenhuma atividade proteolítica foi detectada no gel contendo SDS e gelatina, sugerindo que a Ent-ctx seja a responsável pelos severos danos causados nas mitocôndrias e outras organelas.

Discussão

4. DISCUSSÃO

Aeromonas hydrophila tem sido descrita como um dos mais freqüentes agentes responsáveis pelas doenças gastrointestinais, assim como por sua associação com as septicemias, meningites, infecções sanguíneas e ferimentos, entre outras doenças (Albert *et al.*, 2000; Gonzalez-Serrano *et al.*, 2002; Haburchak, 1996; Vadivelu *et al.*, 1995), podendo ser adquiridas em ambientes hospitalares, contato com água ou ingestão de alimentos contaminados (Kirov *et al.*, 1993; Merino *et al.*, 1995).

Vários estudos têm relatado *A. hydrophila* como agente causal de infecções gastrointestinais associadas à ingestão de alimentos contaminados (Hardy *et al.*, 1986; Majeed *et al.*, 1989), devido a sua capacidade de produzir enterotoxinas, que uma vez segregadas dentro do epitélio interatuam seletivamente com a região apical das células epiteliais (Lisanti *et al.*, 1989). Neste estudo utilizamos uma amostra de *A. hydrophila* isolada de leite contaminada que sintetiza uma enterotoxina citotóxica, a qual é considerada como o principal fator de virulência, embora muito pouco se saiba sobre os mecanismos pelos quais esta toxina provoca os danos no tecido celular do hospedeiro (Abrami *et al.*, 2000b; Chopra *et al.*, 2000; Fivaz *et al.*, 2001). Entre as propriedades que caracterizam a Ent-ctx tem-se demonstrado a sua capacidade de induzir uma ampla variedade de efeitos biológicos, podendo ser enterotóxica em segmentos de intestino do coelho, regulador quimiostático celular e responsável pelos efeitos citotóxicos causados em várias linhagens de células de mamíferos (Abrami *et al.*, 1998b; Carrello *et al.*, 1988; Ferguson *et al.*, 1997).

Estudos sobre o mecanismo de ação da Ent-ctx de *A. hydrophila* revelaram que o incremento local da concentração protéica desta toxina leva à polimerização do heptamérico complexo receptor que insere dentro da membrana e induz a formação de canais nas células, provocando a lise osmótica dos eritrócitos e outros tipos de membranas (Buckley, 1999; Thelesman & Ljungh, 1981). Dependendo do tipo de hemácia, a perda de pequenas moléculas e íons, especialmente do potássio, acontece como consequência da formação de poros, levando à despolarização da membrana e, portanto à morte celular (Ferguson *et al.*, 1995).

Nossos resultados mostraram que eritrócitos de diferentes origens diferiram na sua sensibilidade frente à ação citolítica da Ent-ctx (Figura 3). Hemácias provenientes de rato, cavalo e cobaia exibiram uma sensibilidade maior que as outras hemácias estudadas

no ensaio de atividade hemolítica. Similares resultados foram relatados por Bernheimer *et al.*, 1974, quando avaliaram a sensibilidade das diferentes hemácias frente à aerolisina, obtendo uma sensibilidade 300 vezes maior quando trabalharam com hemácias de rato comparado as outras hemácias de afinidade moderada: coelho e boi. Contudo, ambos ensaios coincidiram em que hemácias de carneiro mostraram-se menos sensíveis ao efeito hemolítico da Ent-ctx.

A temperatura constituiu um fator importante ao avaliar o efeito da Ent-ctx sobre os diferentes tipos de hemácias. Nestes ensaios foi constatado que houve um aumento significativo no título da atividade hemolítica após a incubação a 4°C das hemácias que previamente foram incubadas à 37°C durante 1 hora. Entretanto, naqueles experimentos onde a primeira incubação hemácia-toxina foi realizada a baixas temperaturas (4°C), não foi observada lise das hemácias. Pesquisas realizadas por Ferguson *et al.*, 1997, confirmaram que a interação toxina-eritrócitos depende da temperatura (37°C) para garantir a ação citolítica da Ent-ctx em hemácias.

Divergências têm sido constatadas quanto aos estudos sobre o receptor de membrana ao qual se liga a Ent-ctx de *A. hydrophila* (Ferguson *et al.* 1997; Abrami *et al.* 1998a). Em nossos estudos, nenhuma alteração foi verificada na ação citolítica da Ent-ctx quando pré-incubada com colesterol (10 µg) e posteriormente testada frente a eritrócitos de rato. Futuros estudos deverão ser realizados visando aprofundar a compreensão da interação toxina-receptor e das vias que são ativadas para a indução dos efeitos biológicos.

Vários estudos de caracterização imunológica têm permitido relacionar sorologicamente a Ent-ctx com os antissoros homólogos produzidos em modelos animais (Asao *et al.*, 1986; Rose *et al.*, 1989b). A produção do soro anti-Ent-ctx em coelho e posterior purificação, permitiu aumentar sua especificidade, sendo obtidos resultados em imunodifusão radial dupla que revelaram títulos de 1:64 para o antissoro descomplementado e de 1:1024 para a IgG purificada.

A análise do imunoblot (Figura 2), confirmou a especificidade antígeno-anticorpo revelando uma única banda, com peso molecular aproximado de 54 kDa, tanto com antissoro descomplementado a 56°C quanto com a IgG anti-Ent-ctx. Verificou-se também, que não houve reação antígeno-anticorpo quando foram usados os soros pré-imunes. Em relação aos ensaios biológicos de soroneutralização, utilizados ambos os soros, verificou-

se que estes apresentaram atividades neutralizantes do efeito da Ent-ctx nas diluições de 1:16384 para o antissoro descomplementado e de 1:65536 para a IgG purificada.

Diversos estudos têm sido realizados para caracterizar os efeitos biológicos induzidos pela Ent-ctx em diferentes linhagens provenientes de mamíferos (Majeed & Macrae, 1994; Rose *et al.*, 1989b). Ensaio de citotoxicidade em células Vero e HT29, demonstraram que a Ent-ctx interage com ambas linhagens. Estes resultados foram confirmados no teste de viabilidade celular através do ensaio de vermelho neutro, onde as duas linhagens celulares reproduzem uma cinética similar quanto ao percentual de células viáveis. O efeito citotóxico da Ent-ctx frente às células Vero e HT29 tornou-se evidente rapidamente. Nos primeiros minutos de ensaio, diferindo do comportamento das células controle, verificou-se uma diminuição significativa de células viáveis para ambas culturas (Figura 4).

Alterações morfológicas em células de mamíferos, que se assemelham àquelas produzidas pela família das verotoxinas de *E. coli* têm sido descritas para as toxinas protéicas de *Aeromonas* relacionadas com a aerolisina (Buckley *et al.*, 1981; O'Brien & Holmes, 1987; Sears & Kaper *et al.*, 1996). Recentemente, mudanças nos níveis nuclear e citoplasmático foram constatadas em intervalos curtos de tempo (Abrami *et al.*, 2000a; Falcón *et al.*, 2001), revelando evidências morfológicas da ocorrência de apoptose.

A apoptose é definida como um processo que aciona a morte celular programada e tem indicada como um dos possíveis mecanismos utilizados pelos microrganismos patogênicos para implantar-se e suprimir a resposta do hospedeiro (Fernandez-Prada *et al.*, 1997; Merien *et al.*, 1997; Thompson, 1995; Zychlinsky, 1993). Bactérias tais como *E. coli*, *Shigella* spp., e *Salmonella* spp., associadas às doenças gastrointestinais têm sido reconhecidas como indutoras de apoptose (Weinrauch & Zychlinsky, 1999). Toxinas formadoras de canais, como a α -hemolisina de *E. coli*, e aquelas que pertencem à família de Shiga-toxinas e verotoxinas (Shiga-like toxinas), são capazes de induzir a morte celular programada (Cavalieri *et al.*, 1984; Keenan *et al.*, 1986) causando mudanças estruturais tais como, arredondamento celular, condensação nuclear, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos. Adicionalmente, a ativação de moduladores específicos da via apoptótica, assim como as ações dos superantígenos, têm sido descritas como estratégias utilizadas pelos patógenos bacterianos para sobreviver à resposta do sistema imune hospedeiro (Hueck, 1998; Stevens, 1997).

Neste estudo foi demonstrada a capacidade da Ent-ctx em causar mudanças morfológicas em células epiteliais humanas, que levaram a uma crescente condensação nuclear, passando por diferentes estágios até chegar à picnose e fragmentação nuclear, assim como a eliminação de fragmentos citoplasmáticos ou “blebbing” (Figura 5). Adicionalmente, as análises microscópicas mostraram que Ent-ctx induz apoptose nas culturas celulares de HT29 (Falcón *et al.*, 2001), sendo confirmada através da típica fragmentação do DNA observada em eletroforese em gel de agarose e da metodologia do TUNEL (Figura 9). Alterações morfológicas similares foram descritas em fibroblastos de pulmão e em células BHK. No entanto, experimentos realizados com estas linhagens, não apresentaram nenhuma fragmentação do DNA, nem condensação cromatínica (Thelestam & Ljungh, 1981; Abrami *et al.*, 1998b), sugerindo diferenças de sensibilidade entre as linhagens celulares frente à ação da Ent-ctx.

A diminuição acentuada do volume celular total, devido à ativação do processo de apoptose, induz a compactação das organelas celulares e posteriormente a fragmentação do núcleo e do citoplasma (Cotter *et al.*, 1992). Análises ultraestruturais usando microscopia eletrônica confirmaram que a Ent-ctx de *A. hydrophila* causa desorganização citoplasmática e induz a eliminação de fragmentos plasmáticos “blebbing”, revelando também aspectos de condensação e fragmentação nuclear (Figura 6).

Aspectos relacionados com intensa vacuolização citoplasmática em HT29, assim como nas células Vero (dados não mostrados) foram constatados nas observações microscópicas. Alguns autores atribuíram a presença de vesículas de diferentes tamanhos em fibroblastos (Abrami *et al.*, 1998a) e células CHO (Rose *et al.*, 1989a) à ação da Ent-ctx. Nas últimas décadas, o efeito citotóxico de toxinas vacuolizantes vem-se revelando como possível indicador da virulência de patógenos bacterianos (Henics & Wheatley, 1999; Luzzi *et al.*, 1996; Mitra *et al.*, 2000). Estudos realizados com as citotoxinas vacuolizantes produzidas por *Vibrio cholerae* e *Helicobacter pylori* têm demonstrado associação entre o efeito biológico e a patogenicidade causada por estes microorganismos (Cover, 1996; Figueroa-Arredondo *et al.*, 2001). Recentemente, pesquisas realizadas em nosso laboratório revelaram que sobrenadantes de cultura de *A. biotipo sobria* produzidos a partir de isolados clínicos e alimentos induziram vacuolização citoplasmática em células Vero (Martins *et al.*, 2002).

Neste estudo, experimentos realizados com HT29 (teste de Sudán Black), foram avaliados procurando aprofundar os possíveis mecanismos de ação da Ent-ctx de *A.*

hydrophila, permitindo detectar um elevado número de vesículas ricas em conteúdo lipídico (Figura 8), distribuídas irregularmente no citoplasma celular. Estes resultados sugeriram que a Ent-ctx provoca alterações no arranjo dos lipídios, interferindo na formação de vesículas lipídicas cuja presença impede o reconhecimento de vacúolos formados pela ação da Ent-ctx.

A Ent-ctx possui a capacidade de ser enterotóxica provocando uma resposta secretora e induzindo acúmulo de fluido em alça ligada intestinal de animais de laboratório (Abrami *et al.*, 1998b; Carrello *et al.*, 1988). Nossos estudos revelaram que, adicionalmente às mudanças morfológicas em células epiteliais humanas HT-29, a Ent-ctx de *A. hydrophila* é capaz de induzir alterações de tipo estrutural que levam à severa destruição das vilosidades intestinais, principalmente na região apical. Outros aspectos como a exposição da lâmina própria, com liberação de restos celulares ao lumen intestinal, dilatação de vasos linfáticos e presença de granulócitos, caracterizaram os efeitos citopáticos observados nas análises microscópicas através de microscopia óptica de luz (Figura 10).

Um estudo comparativo mostrou que enterotoxinas de *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* induzem acúmulo de fluido em alças ligadas intestinais de coelho e porco (Moon *et al.*, 1971), sem apresentar nenhuma alteração histopatológica. No intuito de avaliar a possível associação entre as atividades biológicas desenvolvidas pela Ent-ctx e a presença de genes já descritos como responsáveis pela enteropatogenicidade (LT-I, STa, STb) de *E. coli*, foi realizado o teste molecular de PCR (Blanco *et al.*, 1997). Os resultados, embora negativos, porque não foi observada a presença destes genes no DNA cromossômico da *A. hydrophila*, servirão de base para futuros estudos sobre os mecanismos moleculares que permitam esclarecer o papel desta Ent-ctx nas doenças gastrointestinais. Resultados similares foram descritos por Chopra & Houston (1999) para uma enterotoxina citotônica de *Aeromonas* positiva em camundongos recém-nascidos, demonstrando através de testes moleculares, que não houve homologia entre esta enterotoxina e a LT ou ST de *E. coli*.

Os efeitos de dilatação (aumento do volume) e redução do tamanho das vilosidades tratadas com a Ent-ctx em comparação às células controles observados nas análises microscópicas, foram confirmados nos estudos usando MEV. As análises ultraestruturais demonstraram que a Ent-ctx induziu danos severos na arquitetura celular que levam ao desarranjo estrutural das células suporte do tecido conectivo, perda de enterócitos apicais e a conseqüente exposição de vasos linfáticos (Figura 11).

Os estudos ultraestruturais usando microscopia eletrônica de transmissão corroboraram que a Ent-ctx de *A. hydrophila* pode causar a perda da junção intercelular assim como da membrana basal, colapso de organelas e o desarranjo da arquitetura das microvilosidades. O efeito inicial, verificado após 2 horas do teste de enterotoxigenidade, permitiu demonstrar a formação de invaginações da membrana basal dos enterócitos e o desarranjo dos componentes da lâmina própria. Os danos foram constatados começando pela região basal das vilosidades chegando a severas alterações na região apical, após 6 horas do ensaio. A perda de permeabilidade celular derivada do tratamento com a Ent-ctx foi detectada nas primeiras 3 horas, alcançando a máxima expressão 4 horas após o ensaio atividade enzimática da LDH nas células HT29.

As análises microscópicas revelaram a perda estrutural e funcional das mitocôndrias. As alterações morfológicas foram caracterizadas pelo aumento do volume celular e a destruição parcial das cristas (Figura 13), acompanhado pela perda da função mitocondrial nos primeiros 30 minutos de interação toxina-célula, avaliada através do ensaio com MTT (Figura 7). Experimentos realizados por Korostoff *et al.*, (2000) com a leucotoxina de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, também formadora de poros e indutora de apoptose, mostraram que uma severa perturbação estrutural e funcional das mitocôndrias precedia a ativação de caspases específicas responsáveis pelo desencadeamento da via apoptótica. Outros trabalhos, usando indutores físico-químicos do processo de apoptose têm demonstrado a ocorrência de alterações nas mitocôndrias (Marchetti *et al.*, 1996, Petit *et al.*, 1995, Susin *et al.*, 1999). Aprofundando nas causas que provocam severos danos mitocondriais procuramos determinar a possível associação da Ent-ctx com ação proteolítica. As técnicas zimográficas em SDS-PAGE desenvolvidas permitiram determinar que a Ent-ctx não expressa atividade proteolítica. Apesar de avaliarmos a função mitocondrial usando o teste com MTT, futuros estudos com indicadores específicos do potencial de membrana mitocondrial, assim como a quantificação do citocromo c, deverão ser realizados para melhor avaliar as alterações funcionais desta organela frente à ação da Ent-ctx.

Os microfilamentos de actina são os responsáveis pela orientação e consistência das microvilosidades (Cotter *et al.*, 1992). Estudos realizados com células CMK-7 (Yamazaki *et al.*, 2000) e HL-60 (Levee *et al.*, 1996) mostraram que as alterações no citoesqueleto celular constituem eventos primários na cascata do mecanismo de apoptose. Assim, na presença da Ent-ctx, perde-se a associação entre os filamentos e o arranjo estrutural das microvilosidades intestinais (Figura 14). Este efeito é notado nas

análises realizadas após 6 horas do tratamento das vilosidades intestinais com a Ent-ctx de *A. hydrophila*.

Neste estudo demonstramos que a Ent-ctx isolada de *A. hydrophila* exibe relativa homologia com as atividades biológicas descritas para a enterotoxina citolítica e a aerolisina, as quais são caracterizadas como toxinas formadoras de poros capazes de causar danos severos em tecido epitelial intestinal e culturas celulares. Nas últimas décadas, vários estudos têm relatado que a perda e/ou renovação da integridade do epitélio intestinal ocorre através de mecanismos que envolvem a ativação da cascata do sistema imune intestinal, principalmente de linfócitos e fagócitos mononucleares, localizados no epitélio e na lâmina própria (Iwanaga *et al.*, 1994; Mayhew *et al.*, 1999). Vários estudos têm demonstrado que em presença destas células linfocitárias e fagocitárias podem ser segregados fatores citotóxicos tais como, radicais livres, interleucinas, óxido nítrico entre outros, sendo que estes fatores constituem indutores de apoptose (Pierce *et al.*, 2000; Ribardo *et al.*, 2002). Contudo, nossos resultados mostraram a presença de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos na lâmina própria e enterócitos. Pesquisas futuras deverão avaliar se a quimiotaxia derivada da ação da Ent-ctx e a conseqüente presença destas células não-epiteliais podem ativar a segregação destes fatores citotóxicos nas células epiteliais, assim como aprofundar nos mecanismos e vias metabólicas utilizadas pela toxina para causar morte celular.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

- [1]. Eritrócitos de rato, cavalo e cobaia foram mais sensíveis à ação citolítica da Ent-ctx de *A. hydrophila* quando comparadas à eritrócitos de boi, carneiro, coelho e galinha.
- [2]. A IgG purificada anti-Ent-ctx foi capaz de neutralizar o efeito citotóxico da Ent-ctx de *A. hydrophila* (>1:16384), revelando uma única banda na análise do imunoblotting.
- [3]. A Ent-ctx de *A. hydrophila* causou perda de junção intercelular, crescente condensação nuclear, fragmentação e eliminação de corpos nucleares e citoplasmáticos em células Vero (rim de macaco verde africano) e HT29 (epitélio intestinal humano).
- [4]. A perda da viabilidade celular e da integridade da membrana em células epiteliais intestinais HT29 demonstrou que os danos ocasionados pela Ent-ctx de *A. hydrophila* são irreversíveis.
- [5]. A Ent-ctx de *A. hydrophila* induziu apoptose em células epiteliais intestinais HT29, visualizada pela análise eletroforética em gel de agarose, reação de Feulgen e a metodologia de TUNEL.
- [6]. Análises ultraestruturais em células intestinais epiteliais HT29 sob ação da Ent-ctx de *A. hydrophila* demonstraram desorganização citoplasmática com perda da polaridade, a eliminação de fragmentos plasmáticos (blebbing), assim como a presença de múltiplas vesículas no citoplasma, sugerindo um efeito de vacuolização citoplasmática.
- [7]. Experimentos *in vitro* demonstraram que a Ent-ctx de *A. hydrophila* causa alterações morfológicas em células intestinais epiteliais de rato, levando a severa desorganização estrutural, destruição de enterócitos e de organelas celulares.
- [8]. A quimiotaxia da Ent-ctx de *A. hydrophila* ativou a resposta do sistema imune, verificando-se a presença de um infiltrado inflamatório difuso constituído por eosinófilos e neutrófilos no epitélio intestinal.
- [9]. Técnicas de PCR constataram que não há associação entre os genes responsáveis pela enteropatogenicidade em *E. coli* (LT-I, STa, STb) e a amostra de *A. hydrophila* produtora da Ent-ctx.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrami, L., Fivaz, M., Decroly, E., Seidah, N.G., Jean, F., Thomas, G., Leppla, S.H., Buckley, J.T. and Van der Goot, F.G. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J. Biol. Chem.*, **273**: 32656-32661, 1998a.
- Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.E., Parton, R.G. and Van der Goot, F.G. A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*, **140**: 525-540, 1998b.
- Abrami, L., Fivaz, M. and van der Goot, F.G. Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol.*, **8**: 168-172, 2000a.
- Abrami, L., Fivaz, M. and van der Goot, F.G. Surface dynamics of aerolysin on the plasma membrane of living cells. *Int. J. Med. Microbiol.*, **290**: 363-367, 2000b.
- Albert, M.J., Ansaruzzaman, M., Talukder, K. A., Chopra, K. A., Kuhn, I., Rahman, M., Faruque, A. S., Islam, M.S., Sack, R.B. and Mollby, R. Prevalence of enterotoxin genes in *Aeromonas* spp. isolated from children with diarrhea, healthy controls, and the environment. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 3785-3790, 2000.
- Altwegg, M. & Geiss, H.K. *Aeromonas* as human pathogen. *Crit. Rev. Microbiol.*, **16**: 253-286, 1989.
- Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T. and Sakakuchi, G. Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.*, **46**: 122-127, 1984.
- Asao, T., Kosaki, S., Kato, Y., Otsu K. and Sakakuchi, G. Purification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *J. Clin. Microbiol.*, **24**: 228-232, 1986.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J., Smith, J.A. and Struhl, K. Current protocols in molecular biology (ed.). John Wiley and Sons, Inc, New York, N.Y. 1989.
- Bernheimer, A. W. and Avigar, L. S. Partial characterization of aerolysin, a lytic exotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **9**: 1016-1021, 1974.

- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J.M. and Holland, I.B. *Escherichia coli* hemolysin may damage target membranes by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.*, **52**, 63-69, 1986.
- Black, R.E. Epidemiology of travelers diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev. Infect. Dis.*, **12**: 73-78, 1990.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Gonzales, E.A, Mora, A., Jansen, W., Gomes, T., Zerbini, L.F., Yano, T., Pestana de Castro, A.F. and Blanco, J. Genes encoding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J. Clin. Microbiol.*, **35**: 2958-2963, 1997.
- Borenfreund, E. and Puerner, J. A. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. *J. Tissue Cult. Methods*, **9**: 7-9, 1984.
- Borenfreund, E., Babich, H. and Martin-Alguacil, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays: the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxic in vitro*, **2**: 1-6, 1988.
- Borchardt, M.A., Stemper, M.E. and Standridge, J.H. *Aeromonas* isolates from human diarrheic stool and groundwater compared by pulsed-field gel electrophoresis. *Emerging Infect. Dis.*, **9**: 224-228.
- Borrell, N., Figueras, M.J. and Guarro, J. Phenotypic identification of *Aeromonas* genomospecies from clinical and enviromental sources. *Can. J. Microbiol.*, **33**: 3119-3123, 1998.
- Bradford, M.M. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **V**: 248-254, 1976.
- Buckley, J. T., Halasa, L.N. and Mac Intyre, S. Purification and some properties of the hemolysin toxin aerolysin. *Can. J. Biochem.*, **59**: 430-435, 1981.
- Burke, V.; Robinson, J. and Gracey, M. Enterotoxins of *Aeromonas* species. *Experimentia*, **43**: 368-369, 1987.

- Buckley, J. T. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. In: The channel-forming toxin aerolysin. Academic Press Ltda, London: 362-372, 1999.
- Cahill, M. Virulence factors in motile *Aeromonas* species. *J. Appl. Bact.*, 69: 1-16, 1990.
- Carnahan, A.M., Altwegg, M. (1996). Taxonomy. In: Austin B et al., eds. *The genus Aeromonas*. London, Wiley: 1-38.
- Carrello, A., Silburn, K.A., Budden, J.R. and Chang, B.J. Adhesion of clinical and enviromental *Aeromonas* isolates to HEp-2 cells. *J. Med. Microbiol.*, 26: 19-27, 1988.
- Caselitz, F.H. *Pseudomonas-Aeromonas* und ihre humanmedizinische bedeutung. *VEB Gustav Fisher Verlag*. Jenc. 1966.
- Cavalieri, S., Bohach, G. and Snyder, I. *Escherichia coli* alpha hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, 48: 326-343, 1984.
- Chakraborty, T., Montenegro, M.A., Sanyal, S.C., Helmuth, R., Bulling, E. and Timmir, K.N. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotoxic enterotoxin. *Infect. Immun.*, 46: 435-441, 1984.
- Chakraborty, T., Hunle, H. and Goebel, W. Cloning, expression, and mapping of the *Aeromonas hydrophila* aerolysin gene determinant in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 167: 368-374, 1986.
- Chakraborty, T., Hunle, B., Hof, H., Bergbauer, H. and Goebel, W. Marker exchange mutagenesis of the aerolysin determinant in *Aeromonas hydrophila* enteropathogenicity. *Curr. Microbiol.*, 14: 71-77, 1987.
- Chopra, A.K., Houston, C.W., Genaux, C.T., Dixon, J.D. and Kurosky, A. Evidence for production of an enterotoxin and cholera toxin cross-reactive factor by *Aeromonas hydrophila*. *J. Clin. Microbiol.*, 24: 661-664, 1986.
- Chopra, A. K. and Houston, C. W. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect.*, 1: 1129-1137, 1999.

- Chopra, A.K., Xu, X., Ribardo, D., Gonzalez, M., Kuhl, K., Peterson, J.W. and Houston, C.W. The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. *Infect. Immun.*, **68**: 2808-2818, 2000.
- Colwell, R.R.; MacDonell, M.T. & De Ley, J. Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 473-477, 1986.
- Cotter, T.G, Lennon, S.V., Glynn, J.M. and Green, D.R. Microfilaments-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cells undergoing apoptosis. *Cancer Res.*, **52**: 997-1005, 1992.
- Cover, T.L. The vacuolating cytotoxin of *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.*, **20**: 241-246, 1996.
- Cumberbatch, N., Gurwith, M.J., Langston, C., Sack, R.B. and Brunton, J.L. Cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*: relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect. Immun.*, **23**: 829-837, 1979.
- Dobrescu, L. Enterotoxigenic *Aeromonas hydrophila* from a cases of piglets diarrhoea. *Vet. Med.*, **25**: 713-718, 1978.
- Dykstra, M.J. A manual of applied techniques for biological electron microscopy. Plenum Press, New York, 1993.
- Falcón, R. Caracterização biológica da enterotoxina citotóxica de *Aeromonas hydrophila*. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, 1998.
- Falcón, R., Carvalho, H. F, Joazeiro, P. P, Gatti, M. S. V and Yano, T. Induction of apoptosis in HT29 human intestinal epithelial cells by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila*. *Biochem. Cell. Biol.* **79**: 525-531, 2001.
- Ferguson, M.R., Xing-Jing, X., Houston, C.W., Peterson, J.W. and Chopra, A.K. Amino-acid residues involved in biological functions of the cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Gene*, **156**: 79-83, 1995.

- Ferguson, M.R., Xing-Jing, Xu, Houston, C.W., Peterson, J.W., Coppenhaver, D.H. and Chopra, A.K. Hyperproduction, purification, and mechanism of actions of the cytotoxic enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **65**: 4299-4308, 1997.
- Fernandez-Prada, C.M., Hoover, D.L., Tall, B.D. and Venkatesan, M.M. Human monocyte-derived macrophages infected with virulent *Shigella flexeri* *in vitro* undergo a rapid cytolytic event similar to oncosis but not apoptosis. *Infect. Immun.*, **65**: 1486-1496, 1997.
- Figueroa-Arredondo P., Heuser J.E., Akopyants N.S., Moriasaki J.H., Cerezo S.G., Rincón F.E. and Berg D. Cell vacuolation caused by *Vibrio colerae* hemolysin. *Infect. Immun.*, **69**: 1613-1624, 2001.
- Figura, N., Marri, L., Verdiani, S., Ceccherini, C. and Barberi, A. Prevalence, species differentiation and toxigenicity of *Aeromonas* strains in cases of childhood gastroenteritis and in controls. *J. Clin. Microbiol.*, **23**: 595-599, 1986.
- Fivaz, M., Abrami, L., Tsitrin, Y. and van der Goot, F.G. Not as simple as just punching a hole. *Toxicon*. **39**: 1637-1645, 2001.
- Freitas, A.C.; Milhomem, A.M.; Nuses, M.P. and Ricciardi, I.D. Virulence factors produced by *Aeromonas hydrophila* strains isolated from different sources. *Rev. Microbiol.*, **24**: 168-174, 1993.
- Garrity G.M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. Vol.1. Springer-Verlag, New York. 2001.
- Gonzalez-Serrano, C.J., Santos, J.A., García-Lopez, M.L. and Otero, A. Virulence markers in *Aeromonas hydrophila* and *A. veronni* biovar *sobria* isolated from freshwater fish and from a diarrhoea case. *J. Appl. Microbiol.*, **93**: 414-419, 2002.
- Gracey, M., Burke, V. and Robinson, J. *Aeromonas* - associated gastroenteritis. *Lancet* ii: 1304-1306, 1982.
- Haburchak, D.R. *Aeromonas hydrophila*: an underappreciated danger to fisherman. *Infect. Med.*, **13**: 893-896, 1996.

- Hardy, J.C.; Tood, L.S. & Striger, M.F. Toxin production of *Aeromonas hydrophila* in bacteriological media and foods. Second European Workshop on bacterial protein toxins. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt I.*: 175-176, 1986.
- Heckerling, P.S., Stine, T.M., Pottage, J.C., Levine, S. and Harris, A.A. *Aeromonas hydrophila* myonecrosis and gas gangrene in a nonimmunocompromised host. *Arch. Intern. Med.*, **143**: 2005-2007, 1983.
- Henics, T. and Wheatley, D. Cytoplasmic vacuolation, adaptation and cell death: a view on new perspectives and features. *Biol. Cell*, **91**: 485-498, 1999.
- Hertle R., Hilger M., Weingard-Kocher S. and Walev I. Cytotoxic action of *Serratia marcescens* hemolysin on human epithelial cells. *Infect. Immun.*, **67** 817-825, 1999.
- Hornef, M.W., Wick, M.J., Rhen, M. and Normark, S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptative immune responses. *Nature*, **3**: 1033-1040, 2002.
- Houston, C.W., Chopra, A.K., Rose, J.M. and Kurosky A. Review of *Aeromonas* enterotoxins. *Experimentia*. **47**: 424-426, 1991.
- Howard, S.P., Garland, W.J., Green, M.J. and Buckley, J.T. Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.*, **169**: 2869-2871, 1987.
- Hueck, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **62**: 379-433, 1998.
- Iwanaga, T., Hoshi, O., Han, H., Takahashi-Iwanaga, H., Uchiyama, Y. and Fujita, T. Lamina propria macrophages involved in cell death (apoptosis) of enterocytes in the small intestine of rats. *Arch. Histol. Cytol.*, **57**: 267-276, 1994.
- James, J.M., Dibley, M., Burke, V., Robinson, J. and Gracey, M. Immunological cross-reactivity of enterotoxins of *Aeromonas hydrophila* and cholera toxin. *J. Bacteriol.*, **169**:2869-2871, 1987.

- Janda, J.M. & Brenden, R. Importance of *Aeromonas* bacteremia. *J. Infect. Dis.*, **155**: 589-591, 1987.
- Jonas, D., Walev, I., Berger, T., Liebetrau, M., Palmer, M. and Bhakdi, S. Novel path to apoptosis: small transmembrane pores created by staphylococcal α -toxin in T lymphocytes evoke internucleosomal DNA degradation. *Infect. Immun.*, **62**: 1304-1312, 1994.
- Keenan, K., Dharnack, D., Formal, S. and O'Brien, A. Morphologic evaluation of the effects of Shiga toxin and *Escherichia coli* Shiga-like toxin on rabbit intestine. *Am. J. Pathol.*, **125**: 69-80, 1986.
- Khalifa, S.G. *Aeromonas* epidemiological aspects and virulence factors. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina, 1989.
- Khurama, R. and Kumar, A. Prevalence of motile aeromonads in foods of animals origin. *J. Food Sci. Techn.*, **34**: 228-229, 1997.
- Kirov, S.M.; Ardestani, E.K. & Hayward L.J. The growth and expression of virulence factors at refrigeration temperature by *Aeromonas* strains isolated from foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **20**: 159-168, 1993.
- Kirov, S. M. The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, **20**: 179-198, 1993.
- Kitajima E.W., Dolder M.A.H, and Joazeiro P.P. Apostila de Microscopia Eletrônica de Varredura. Laboratório de Microscopia Eletrônica, IB. UNICAMP. 1999.
- Kluyver, A.J. & van Niel, C.B. Prospects for natural system of classification of bacteria. *Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II*. **94**: 369-403, 1936.
- Kochi, S.K. and Collier, R.J. DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp. Cell Sci.*, **208**: 296-302, 1993.
- Korostoff, J., Yamaguchi, N., Miller, M., Kieba, I. and Lally, E. Perturbation of mitochondrial structure and function plays a central role in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin-induced apoptosis. *Microbiol. Path.*, **29**: 267-278, 2000.

- Krovacek, K.; Huang, K.; Sternberg, S. & Svenson, S.B. *Aeromonas hydrophila* septicaemia in a grey seal (*Halichoerus grypus*) from the Baltic Sea: a case study. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect., Dis.* **21**: 43-49, 1998.
- Kuo, C., Wu, J., Tsai, P., Kao, F., Lei, H., Liu, M.T. and Liu, Y. Streptococcal pyrogenic exotoxin B induces apoptosis and reduces phagocytic activity in U937 cells. *Infect. Immun.*, **67**:126-130, 1999.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685, 1970.
- Levee, M., Dabrowska, M.I., Lelli, J.L. and Hinshaw, D.B. Actin polymerization and depolymerization during apoptosis in HL-60 cells. *Am. J. Physiol.* **271**: C1981-C1992, 1996.
- Lin, S.H., Shieh, S.D., Lin, Y.F., Debrauwer, E., van Landuyt, H.W., Gordts, B. and Boelaert, J.R. Fatal *Aeromonas hydrophila* bacteremia in hemodialysis patient treated with deferoxamine. *Am. J. Kidney Dis.*, **27**: 733-735, 1996.
- Lisanti, M.P., Caras, I.W., Davitz, M.A. and Rodríguez, B.E. A glycopospholipid membrane anchor acts as an apical targeting signal in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **109**: 2145-2156, 1989.
- Ljungh, A., Wretling, B. and Wadstrom, T. Evidence for enterotoxin and two cytolytic toxins in human isolates of *A. hydrophila*. In Toxin Animal, Plant and Microbiol: 947-960. Rosemberg, P (ed.). *Proceedings of International Symposium Held in San José*. Pergamon Press. Oxford, 1976.
- Ljungh, A., Popoff, A. and Wadstron, T. *Aeromonas hydrophila* in acute diarrhoeal disease: detection of enterotoxin and biotyping of strains. *J. Clin. Microbiol.*, **6**: 96-100, 1977.
- Ljungh, A., Wretling, B., and Mollky, R. Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **89**: 387-397, 1981.

- Ljungh, A., Eneroth, P. and Wadstrom, T. Cytotoxic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Toxicon*, **20**: 787-794, 1982.
- Ljungh, A. *Aeromonas* toxin and other virulence factors. *Experimentia*, **43**: 367-368, 1987.
- Luzzi I., Covacci A., Censini S., Pezzella C., Crotti D. and Facchini M. Detection of a vacuolating cytotoxin in stools from children with diarrhea. *Clin. Infect. Dis.*, **23**: 101-106, 1996.
- Majeed, K.N., Egan, A. and Mac Rae, I.C. Production of exotoxin from aeromonads at refrigeration temperatures. *Aust. Microbiol.*, **10**: 387-389, 1989.
- Majeed, K.N. and Macrae, I.C. Cytotoxic and haemagglutinating activities of motile *Aeromonas* species. *J. Med. Microbiol.*, **40**: 187-193, 1994.
- Mani, S., Sadigh, M. and Adriole, V.T. Clinical spectrum of *A. hydrophila* infections: report of 11 cases in community hospital and review. *Infect. Dis. Clin. Pract.*, **4**: 79-86, 1995.
- Marchetti, P., Hirsch, T. and Zamzami, N. Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J. Immunol.*, **157**: 4830-4836, 1996.
- Martins L.M., Falcón R.M. and Yano T., Incidence of toxic *Aeromonas* isolated from food and clinical cases. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, **32**: 237-242, 2002.
- Mayhew, T. M., Myklebust, R., Whybrow, A. and Jenkins, R. Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. *Histol. Histopathol.* **14**: 257-267, 1999.
- Mello, M.L. and Vidal, B.C. A reação de Feulgen. *Ciência e Cultura*, **30**: 665-676, 1978.
- Mello, M.L. and Vidal, B. *Práticas em Biologia Celular*, Edgard Blucher, **71**, Rio de Janeiro, 1980.
- Merien, F., Baranton, G. and Perolat, P. Invasion of Vero cells and induction of apoptosis in macrophages by pathogenic *Leptospira interrogans* are correlated with virulence. *Infect. Immun.*, **65**: 729-738, 1997.
- Merino, S.; Rubires, X.; Knochel, S. & Tomás, J.M. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int. J. Food Microbiol.*, **28**: 157-168, 1995

- Millership, S.E., Barer, M.R., Mulla, R.J and Maneck, S. Enterotoxic effects of *Aeromonas sobria* hemolysin in a rat jejunal perfusion system identified by specific neutralization with monoclonal antibody. *J. Gen. Microbiol.*, **138**: 261-267, 1992.
- Mitchell, D.B., Santone, K.S. and Costa, D. Evaluation of cytotoxicity in culture cells by enzyme leakage. *J. Tiss. Cult. Meth.*, **6**: 113-116, 1980.
- Mitra R., Figueroa-Arredondo P., Mukopadhyay A.K., Shimada T., Takeda Y., Berg D.E. and Nair G.B. Cell vacuolation, a manifestation of the El Tor hemolysin of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.*, **68**:1928-1933, 2000.
- Moon, H.W., Whipp, S.C. and Baetz, A.L. Comparative effects of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* on rabbit and swine small intestine. *Lab. Invest.* **25**: 133-140, 1971.
- Murakami, T., Inove, T., Kawakami, H., Takahashi, H. and Yasunaga, T. Hypercalcemia associated with *Aeromonas hydrophila* gastroenteritis. *Acta Paediatrica Japonica*, **37**: 192-195, 1995.
- O'Brien, A.D. and Holmes, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.*, **51**: 206-220, 1987.
- Palumbo, S.A., Bencivengo, M.M., DelCorral, F., Williams, A.C. and Buchanan, R.L. Characterization of *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *J. Clin. Microbiol.*, **8**: 195-199, 1989.
- Petit, P., Lecoœur, H., Zorn, E., Daguët, C., Mignotte, B. and Gougeon, M.L. Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J. Cell Biol.*, **130**: 157-167, 1995.
- Pierce, R.H., Campbell, J.S and Stephenson, A.B. Disruption of redox homeostasis in tumor necrosis factor-induced apoptosis in a murine hepatocyte cell line. *Am. J. Pathol.*, **157**: 221-236, 2000.

- Popoff, M. & Véron, M. A taxonomic study of the *Aeromonas hydrophila*- *Aeromonas punctata* group. *J. Gen. Microbiol.*, **94**: 11-22, 1976.
- Popoff, M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. In: Genus III *Aeromonas*. Kluwer and van Niel. 1936. 398^{AL}. Krieg N.R., Holt J.G., eds. Vol.1. Baltimore, MD, Williams & Wilkins: 545-548. 1984.
- Potomski, J., Burke, V., Watson, I. and Gracey, M. Purification of cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas sobria* by use monoclonal antibodies. *J. Med. Microbiol.*, **23**: 171-177, 1987.
- Report of the AVMA, Panel on Euthanasia. *JAVMA* 218 (5): 669-696. 2001.
- Ribardo, D.A., Kuhl, K.R., Boldogh, I., Peterson, J.W., Houston, C.W. and Chopra, A.K. Early cell signaling by the cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* in macrophages. *Microb. Path.*, **32**: 149-163, 2002.
- Rose, J.M., Houston, C.W. and Kurosky, A. Bioactivity and immunological characterization of cholera toxin cross-reactive cytolytic enterotoxin from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **57**: 1165-1169, 1998b.
- Rose, J.M., Houston, C.W., Coppenhaver, D.H., Dixon, J.D. and Kurosky, A. Purification and chemical characterization of cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by human isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.*, **57**: 1170-1176, 1998a.
- Sayal, S.C.; Singh, S.J. and Sen, P.C. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila* and *Plesiomonas shigelloides*. *J. Med. Microbiol.*, **8**: 195-199, 1975.
- Schiavano, G.F., Bruscolini, F., Albano, A. and Brandi, G. Virulence factors in *Aeromonas* spp. and their association with gastrointestinal disease. *Microbiol. Pavia.*, **21**: 23-30, 1998.
- Sears, C. and Kaper, J.B. Enteric bacterial Toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol.Reviews.* **60**: 167-215, 1996.
- Seidler, R.J., Allen, D.A., Lockman, H., Colwell, R.R., Joshep, S.W. and Daily, O.P. Isolation enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in driving operation. *Appl. Envir. Microbiol.*, **39**: 1010-1018, 1980.

- Sgonc, R., Boeck, G., Dietrich, H., Gruber, J., Recheis, H. and Wick, G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Gen.*, **10**: 41-42, 1994.
- Souza W., Haddad A., Sesso A., Attias M., Farina M., Meirelles M.N., Silveira M., Benchimol M., Soares M.J., Barth O.M., Machado R.D. and Souto-Padrón T. Técnicas básicas de Microscopia Eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia. Rio de Janeiro: 1-179. 1998
- Stevens, D.L. Superantigens: their role in infections diseases. *Immunol. Invest.*, **26**: 275-281, 1997.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Constantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.*, **273**: 28549-28552., 1999.
- Thelesman, M. and Ljungh, A. Membrane-damaging and cytotoxic effects on human fibroblasts of α - and β -hemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* **34**: 949-956, 1981.
- Thompson, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**:1456-1461,1995.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Anal. Biochem.*, **119**: 115-119, 1979.
- Vadivelu, J., Puthucheary, S.D., Phipps, M. and Chee, Y.W. Possible virulence factors involved in bacteraemia caused by *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.*, **42**: 171-174,1995.
- Wadstrom, T., Ljungh, A. and Wretling, B. Enterotoxin, haemolysin and cytotoxic protein in *Aeromonas hydrophila* from human infections. *Pathol. Microbiol. Scand.*, **84**: 112-114, 1976.

- Weinrauch, Y. and Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**:155-187, 1999.
- Wong, C.Y., Mayrhofer, G., Heuzenroeder, M.W., Arkinson, H.M., Quinn, D.M. and Flower, R.L. Measurement of virulence of aeromonads using a suckling mouse model of infection. *FEMS Immun. Med. Microbiol.*, **15**: 233-241, 1996.
- Wretling. B., Molley, R. and Wadstrom, T. Separation of two haemolysins from *Aeromonas hydrophila* by isoelectric focusing. *Infect. Immun.*, **4**: 503-507, 1971.
- Xin J.; Fergunson M.R.; Popov V.L.; Houston C.W.; Peterson J.W. & Chopra A.K. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: deveploment of transposon and isogenic mutans. *Infect. Immun.*, **66**: 3501-3509, 1997.
- Xin-Jing, X.; Fergunson M.R.; Popov V.L.; Houston C.W.; Peterson J.W. and Chopra A.K. Role of a cytotoxic enterotoxin in *Aeromonas*-mediated infections: development of transposon and isogenic mutans. *Infect. Immun.*, **66**: 3501-3509, 1997.
- Yamazaki, Y., Tsuruga, M., Zhou, D., Fujita, Y., Shang, X., Dang, Y., Kawasaki, K. and Oka, S. Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp. Cell Biol.*, **259**: 64-78, 2000.
- Zimmermann, O.E.R. Die baktererien unserer trink- und nutzwaser. *Ber Naturwiss. Ges. Chemnitz.*, **11**: 86, 1890.
- Zuñiga, J., Tur Mari, J., Milocco, S and Piñero, R. Ciencia y tecnología en protección y experimentación. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Madrid, España: 385-419, 2001.
- Zychlinsky, A. Programmed cell death in infectious diseases. *Trends Microbiol.*, **1**:114-117, 1993.