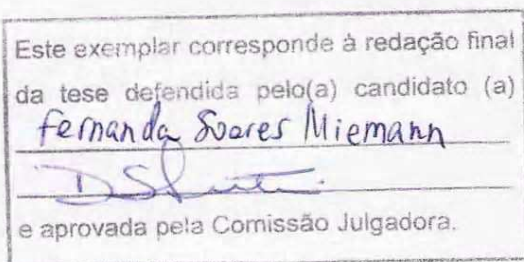


Universidade Estadual de Campinas



Fernanda Soares Niemann

“Caracterização da enterotoxina citotóxica termoestável
(ST-L) produzida por *Escherichia coli* isoladas de água de
consumo”



Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de
mestre em Genética e Biologia
Molecular na área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Campinas
2009

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

N555c	Niemann, Fernanda Soares Caracterização da enterotoxina citotóxica termoestável (ST-L) produzida por <i>Escherichia coli</i> isoladas de água de consumo / Fernanda Soares Niemann. – Campinas, SP: [s.n.], 2009. Orientador: Domingos da Silva Leite. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. <i>Escherichia coli</i>. 2. Toxinas termoestáveis. 3. Citotoxicidade. 4. Enterotoxinas. I. Leite, Domingos da Silva, 1960-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título. (rcdt/ib)
--------------	--

Título em inglês: Characterization of cytotoxic heat-stable enterotoxin (ST-L) produced by *Escherichia coli* isolated from drinking water.

Palavras-chave em inglês: *Escherichia coli*; Heat-stable toxins; Cytotoxicity; Enterotoxins.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Domingos da Silva Leite, Marcelo Palma Sircili, Cleide Catani.

Data da defesa: 16/12/2009.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 16 de dezembro de 2009

Banca Examinadora

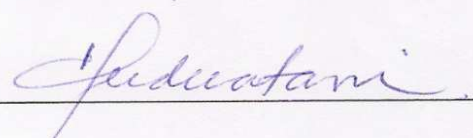
Dr. Domingos da Silva Leite (Orientador)



Dr. Marcelo Palma Sircili



Dra. Cleide Catani



Dra. Silvia Simi

Dr. Marcelo Brocchi

"O importante é o caminho e não somente o destino"

E "quando o mistério é impressionante demais,
a gente não ousa desobedecer."

Petit

Dedico este trabalho a Deus, a
minha mãe e minha irmã, que
incentivaram sempre a realização
deste sonho, e a todos que me
acolheram tão carinhosamente
em Campinas.

Agradeço...

A Deus que sempre está ao meu lado em todos os momentos da minha vida e que sempre me dá forças para continuar;

A minha família, mãe, irmã e pai, que compreenderam, apoiaram e aceitaram minha vontade de aprimorar meus conhecimentos;

As amizades que conquistei e quero levar para sempre na minha vida, e ao meu querido namorado, estas são pessoas que sempre me ofereceram um ombro amigo nos momentos difíceis e palavras de conforto, mas também muitos momentos felizes; as levo para sempre no meu coração;

Ao professor Domingos da Silva Leite pelo apoio para realização deste trabalho;

Ao professor Tomomasa Yano por acreditar em minha capacidade, pelo apoio, orientação e pela disponibilidade de materiais e de seu laboratório para os experimentos;

A todos os professores que disponibilizaram seus laboratórios para realização dos meus ensaios (professores Hernandes Fernandes, Silvia Gatti, Paulo Arruda, Áureo Yamada, Anete Pereira, Marcelo Brocchi) e todas muitas pessoas que me ajudaram em todos estes laboratórios para fazer os experimentos e tirando muitas dúvidas;

As pessoas que me acompanharam, conviveram e muito me ajudaram no laboratório de fatores de virulência bacterianos: Anne, Ana Carolina Lopes; Ana Carolina Teles, Rebeca, Ana Paula, Lucinha, Silvia Simi, Cláudio Amorim; Luciano, Rogério, Robert, Cátia, todos os estagiários e alunos de iniciação científica;

Aos técnicos: Sandra, Ana, Erivaldo, Paulinho, Juvani, Dani, Mirtis, Fabiana, Thaís e especialmente a Stelinha que sempre estavam dispostos para me ajudar;

Ao Márcio, biólogo do CBMEG, que muito ajudou para a realização dos experimentos de sequenciamento gênico;

À CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro; e o programa e funcionários da pós-graduação pela assistência;

...a todos o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS.....	XIII
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	XV
ABSTRACT	XVI
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
OBJETIVOS	10
MATERIAL E MÉTODOS.....	11
1. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA ST-L.....	11
1.1. Amostras bacterianas	11
1.2. Condições de cultivo	11
1.3. Método para a concentração da ST-L	11
1.4. Etapas cromatográficas para purificação da ST-L	12
1.4.1. Primeira etapa – cromatografia de exclusão molecular.....	12
1.4.2. Segunda etapa – cromatografia de fase reversa.....	12
1.5. Análises eletroforéticas.....	13
1.5.1. Eletroforese SDS-PAGE	13
1.5.2. Tricina SDS-PAGE	13
1.5.3. Coloração dos géis.....	14
1.5.4. Análise em eletroforese 2D.....	14
1.6. Determinação da concentração protéica	14
2. INFLUENCIA DE TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DA TOXINA ST-L	15
2.1. Teste de termoestabilidade.....	15
2.2. Efeito de proteases e pH na ST-L	15
2.3. Tratamento com solventes orgânicos.....	15
2.4. Atividade citotóxica na presença de periodato de sódio.....	16

2.5. Tratamento com agente redutor 2-mercaptoetanol	16
3. CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DA ST-L	16
3.1. Detecção de atividade citotóxica	16
3.1.1. Preparo da cultura celular	16
3.1.2. Teste de citotoxicidade em cultura de células.....	16
3.1.3. Determinação de CD ₅₀	17
3.1.4. Estudo da incorporação de vermelho neutro x viabilidade celular.....	17
3.1.5. Estudo da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH)	18
3.1.6. Estudo da ação da ST-L na respiração mitocondrial.....	18
3.1.7. Estudo da ação da ST-L no crescimento celular	19
3.2. Estudo de alteração de estruturas intracelulares	19
3.2.1. Coloração com azul de toluidina	19
3.2.2. Coloração com Feulgen	20
3.3 Detecção de atividades enterotóxicas	20
3.3.1 Teste de Camundongos recém-nascidos	20
3.3.2 Teste de alça ligada do intestino de coelhos	21
3.4. Detecção de atividade hemolítica.....	21
4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	22
4.1. Primers utilizados	22
4.2. Extração plasmidial	23
4.2.1. Confirmação da presença do gene no plasmídeo – eletroeluição.....	23
4.2.2. Cultivo bacteriano com antibióticos	24
4.2.3. Sequenciamento gênico	24
4.2.4. Protocolo para reação de sequenciamento.....	24
RESULTADOS.....	26
1. PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DA TOXINA ST-L	26
1.1 Amostras bacterianas	26
1.2 Condições de cultivo	26
1.3. Método para a concentração da ST-L	27
1.4. Etapas cromatográficas para purificação da ST-L.....	27
1.4.1. Primeira etapa – cromatografia de exclusão molecular.....	27

1.4.2. Segunda etapa – cromatografia de fase reversa.....	28
1.5. Análises eletroforéticas.....	29
1.5.1. Eletroforese SDS-PAGE.....	29
1.5.2. Tricina SDS-PAGE.....	29
1.5.3. Coloração dos géis.....	30
1.5.4. Análise em eletroforese 2D.....	30
2. INFLUENCIA DE TRATAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS SOBRE A ATIVIDADE BIOLÓGICA DA ST-L	
.....	30
2.1. Termoequilíbrio.....	30
2.2. Efeito de proteases e pH na estabilidade da ST-L	31
2.3. Tratamento com solventes orgânicos.....	31
2.4. Atividade tóxica na presença de periodato de sódio.....	31
2.5. Tratamento com agente redutor 2-mercaptoetanol	31
3. CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA.....	31
3.1. Detecção da atividade citotóxica.....	31
3.1.1. Teste de citotoxicidade em cultura de células.....	31
3.1.2. Determinação da CD50	32
3.1.3. Estudo da incorporação do Vermelho Neutro.....	32
3.1.4. Estudo da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH)	33
3.1.5. Estudo da ação da ST-L na respiração mitocondrial.....	33
3.1.6. Estudo da ação da ST-L no crescimento celular	34
3.1.7. Coloração com azul de toluidina	34
3.1.8. Coloração com Feulgen.....	35
3.2. Detecção de atividades enterotóxicas da ST-L	36
3.2.1. Teste de Camundongos recém-nascidos	36
3.2.2. Teste de alça ligada do intestino de coelhos	36
3.3. Detecção de atividade hemolítica.....	36
4. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR	36
4.1. Detecção do gene est através das técnicas da PCR	36
4.2. Extração plasmidial	37
4.3 Confirmação da presença do gene no plasmídeo - eletroeluição.....	37

4.4 Cultivo bacteriano com antibióticos	38
4.5 Sequenciamento gênico	38
4.6. Blastn - alinhamento de nucleotídeos com seqüências de nucleotídeos.....	39
4.7. Blastx - alinhamento de nucleotídeos com seqüências protéicas	41
DISCUSSÃO	42
CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Perfil cromatográfico da Superdex Peptide.....	28
Figura 2 – Perfil cromatográfico da Sephasil Peptide.....	29
Figura 3 – Gel de eletroforese 2D.....	30
Figura 4 – Efeito citotóxico da ST-L em diferentes linhagens celulares.....	32
Figura 5 – Determinação da CD ₅₀	32
Figura 6 – Efeito da ST-L sobre a viabilidade lisossomal.....	33
Figura 7 – Efeito da ST-L sobre a integridade das membranas celulares.....	33
Figura 8 – Efeito da ST-L sobre a viabilidade mitocondrial.....	34
Figura 9 – Efeito da ST-L sobre o crescimento celular.....	34
Figura 10 – Coloração com Azul de Toluidina em culturas celulares com ST-L.....	35
Figura 11 – Coloração com Feulgen em culturas celulares com ST-L.....	35
Figura 12 – Extração plasmidial da EC79.....	37
Figura 13 – Reação de PCR após eletroiluição.....	37
Figura 14 – Alinhamento no BlastN.....	39
Figura 15 – Alinhamento entre sequências de STa e a sequência consenso de ST-L.....	40
Figura 16 – Alinhamento no BlastX.....	41

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Relação dos <i>primers</i> utilizados no trabalho.....	22
Tabela 2 – Cultivo da EC79 em diferentes meios de cultura.....	26
Tabela 3 – Atividade citotóxica nas diferentes etapas de concentração proteica.....	27
Tabela 4 – Resultados para a pesquisa do gene <i>est</i> com diferentes <i>primers</i>	37
Tabela 5 – Resistência a antibióticos da amostra EC79.....	38
Tabela 6 – Sequências de STa utilizadas para o alinhamento com sequência EC79.....	41

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BHI	Infusão de cérebro e coração
CaCo-2	Células humanas de adenocarcinoma intestinal
CAYE	Caldo de casaminoácidos e levedura
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa
EAST1	Enterotoxina termoestável de <i>E. coli</i> enteroagregativa
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
HEp-2	Células de carcinoma de laringe humana
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
kDa	kiloDaltons
LB	Meio Luria Bertani
HT-29	Célula humanas de adenocarcinoma intestinal
LT	Toxina termolábil
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
MM	Meio mínimo
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
ST	Toxina termoestável
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	Caldo trípico de soja
Vero	Células de rim de macaco verde africano
2D	Eletroforese em duas dimensões

RESUMO

Estudos das propriedades de virulência de *Escherichia coli* associadas às infecções intestinais são importantes para compreender seus mecanismos diarreiogênicos. Em um trabalho anterior, realizado em nosso laboratório descrevemos um fator de virulência no sobrenadante de *E. coli* isoladas de água de consumo na cidade de Ouro Preto, MG, com atividades enterotóxica e citotóxica. Este fator foi denominado enterotoxina termo-estável ST-like (ST-L). A ST-L foi purificada a partir dos sobrenadantes de cultura de amostras de *E. coli* cultivadas em meio CAYE modificado, fracionado com sulfato de amônio e por ultrafiltração e concentrado por liofilização. Este material foi submetido às cromatografias de exclusão molecular e fase reversa, em sistema HPLC. A ST-L purificada mostrou, pela análise eletroforética em 2D, ponto isoeletrico (pI) em 6,19 e massa molecular de aproximadamente 2kDa. A atividade biológica pelos tratamentos com enzimas tripsina, proteinase K, ribonuclease ou pepsina. A citotoxicidade da ST-L manteve-se inalterada sob variações de pH (3 a 9) e tratamento com solventes orgânicos. A toxina resistiu ao aquecimento à 100°C mostrando ser termoestável. A caracterização biológica da ST-L mostrou que várias linhagens celulares foram sensíveis aos seus efeitos citotóxicos, sofrendo alterações celulares e nucleares, em até 24h, com a formação de vacúolos citoplasmáticos e morte celular, conforme verificado pelos testes de viabilidade celular dos lisossomos, mitocôndrias, membranas celulares e quantificação da população celular das linhagens HEp-2, Vero, CaCo-2 e HT-29. A ST-L não induziu acúmulo de fluídos no teste de alça ligada em intestino de coelhos induzindo, contudo, acúmulo de fluidos intestinais no teste de camundongos recém-nascidos (Dean). Foi possível determinar que a toxina ST-L encontra-se codificada num plasmídeo e apresenta uma região conservada de alta similaridade com *estA2*, o que justifica a presença de efeito enterotóxico no teste de Dean. No entanto, não foi possível determinar a região ativa para a atividade citotóxica da ST-L. Em função das características apresentadas sugere-se a toxina ST-L seja uma variante do grupo das enterotoxinas termoestáveis (ST) com atividade citotóxica produzida por *E. coli* diarreiogênicas.

ABSTRACT

Studies on the virulence properties of *Escherichia coli* associated with intestinal infections are important for the understanding of diarrheic diseases mechanisms. In a previous work we have described a factor presenting enterotoxic and cytotoxic activities in the culture supernatants of *E. coli* isolated from drinking water in the city of Ouro Preto, MG. This factor was called as thermo stable enterotoxin - like (ST-L) and it was purified from cultured supernatants produced with modified CAYE medium, fractionated with ammonium sulfate, being subsequently ultrafiltrated, subjected to molecular exclusion chromatography and then to reversed-phase chromatography in HPLC-system. The ST-L showed to be pure by the electrophoretic analysis in the bidimensional electrophoresis (2D), being the isoelectric point (pI) of 6.19 and the molecular mass of approximately 2kDa. The toxin can not be inactivated by enzymes like trypsin, proteinase K, ribonuclease or pepsin. The cytotoxic activity of ST-L does not change with pH variations (3 – 9), does not change after treatment with organic solvents and resists heating treatments of 100°C showing it to be heat-stable. Biological characterization of the toxin showed, through the tests of cell viability with the ST-L, that several cell lines were sensitive to the cytotoxin action, with major cellular and nuclear changes observed within 24 hour assays, presenting cytoplasmic vacuoles and cell death, what was verified by tests of cell viability of lysosomes, mitochondria, cell membranes and quantification of the cell population on cell lines like HEp-2, Vero, CaCo-2 and HT-29. The rabbits ileal intestinal loop tests, performed with the ST-L, did not show positive results, but the toxin acts by inducing intestinal fluid accumulation into the newborn mice test (Dean). Through molecular characterization tests, we found that the gene encoding for the toxin ST-L is in a plasmid and has a conserved region with high similarity to *estA2*, what justifies the presence of the positive enterotoxic result in the Dean test. However, it was not possible to determine the fragment responsible for cytotoxic activity of ST-L. According to the characteristics presented we suggest that the toxin-ST-L is a variant group of the heat-stable enterotoxin (ST) with cytotoxic activity produced by the diarrheagenic *E. coli*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A *Escherichia coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* que faz parte da microbiota intestinal do homem e de animais. Caracteriza-se por ser um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo que pode, no entanto, causar infecções intestinais (*E. coli* diarreiogênicas) e extraintestinais (ExPEC – *E. coli* patogênica extraintestinal), tanto nos animais como no homem (Russo & Johnson, 2006).

As amostras de *E. coli* associadas à infecção intestinal (*E. coli* diarreiogênicas) são classificadas de acordo com suas propriedades de virulência, interação com as células dos hospedeiros, sintomas clínicos, epidemiologia e sorotipos em seis bem definidas categorias (patotipos): *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC); e dentre os seis patotipos de *E. coli* diarreiogênicas os que estão relacionados pela produção de enterotoxinas são: ETEC e EAEC (Kaper & Nataro, 2004).

As ETEC são o grupo mais bem caracterizadas dentre os patotipos relacionados a gastroenterites em humanos e animais, por produzirem enterotoxinas, sendo responsáveis pela alta mortalidade infantil em países em desenvolvimento (Craviotto *et al.*, 1991) e também pela diarreia dos viajantes (Merbon *et al.*, 1976). Contaminação fecal de alimentos e água de consumo é a mais comum rota de infecção em humanos (Kuhnert *et al.*, 2000).

Por todo mundo, diarreias estão associadas com alta morbidade e mortalidade em crianças. Diarreia toxigênica secretória persiste como a primeira causa de morte em crianças nos países em desenvolvimento. O número de óbitos está estimado em mais de 2.5 milhões de crianças por ano, sendo o maior problema médico para militares em bases nestes países; e também são responsáveis por mais de 70% de casos de diarreias do viajante. A morbidade e mortalidade resultam de massiva secreção de fluídos intestinais que leva à desidratação, hipovolemia e morte. A porção proximal do intestino delgado é o primeiro alvo para os dois maiores agentes infecciosos implicados na diarreia toxigênica secretória (Thapar & Sanderson, 2004; Qadri, 2005).

Além do rotavírus, os maiores agentes causais de diarreias são *Vibrio cholerae* e *Escherichia coli* enterotoxigênica - ETEC (Thapar & Sanderson, 2004). Enterotoxinas ativam o mecanismo de segundo mensageiro para a sinalização intracelular e causam diarreia secretória. A infecção causa uma diarreia aquosa que pode estar associada com febre, dores abdominais e vômitos (Field, 2003).

ETEC é a bactéria mais comum que causa diarreia em todo mundo, anualmente afeta milhares de crianças com menos de cinco anos de idade em países em desenvolvimento causando 170.000 a 380.000 mortes anualmente, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2009).

Al-Majali e colaboradores (2000) descrevem em seu trabalho que em humanos, os sintomas clínicos da infecção por ETEC são idênticos aos da cólera, com severa desidratação; em adultos, não é comum a ocorrência da doença. Infecções por ETEC também são importantes causadores de doença em animais, especialmente porcos e bezerros. Infecções causadas por ETEC são uma das maiores causas de diarreia aguda em ruminantes durante a primeira semana de vida. Economicamente, colibaciloses entéricas por ETEC causam um importante efeito na indústria de suínos.

Estabelecido um contato com a célula do hospedeiro, as linhagens de ETEC podem produzir uma ou mais enterotoxinas termoestáveis ou termolábeis (ST/LT) com indução de secreção de fluidos e/ou inibição de absorção no intestino. Estes efeitos tóxicos são característicos da infecção por ETEC e implicados diretamente na manifestação da diarreia secretória. No entanto, em adição às toxinas clássicas ST e LT associadas como mediadores de diarreia por ETEC, um número de outras toxinas recentemente descritas estão sendo relacionadas à patogenicidade de ETEC: EAST1, EatA e ClyA.

A principal toxina termoestável (ST) pode ser dividida em dois grupos distintos pela estrutura, funcionamento e antigenicidade: STa (ou STI), solúvel em metanol e resistente a proteases; STb (ou STII) insolúvel em metanol e sensível a proteases. As toxinas têm diferentes alvos e em doses máximas de STa e STb há efeito sinérgico no acúmulo de fluido em modelo de alça ligada de porcos, sugerindo que elas têm diferentes mecanismos de ação (Peterson & Whipp, 1995).

Variações entre tamanhos das STas são observadas entretanto não há diferença no

mecanismo de ação das STas ou na sua atividade específica (Rao *et al.*, 1981; Saeed & Greenberg, 1985; Saeed *et al.*, 1986, 1987; Sears & Kaper, 1996). A toxina também é encontrada em outras espécies bacterianas como *Vibrio cholerae* (Takao *et al.*, 1985; Arita *et al.*, 1991; Yoshino *et al.*, 1993), *Vibrio mimicus* (Arita *et al.*, 1991), *Citrobacter* (Guarino *et al.*, 1987) e *Yersinia enterocolítica* (Takao *et al.*, 1984; Yoshino *et al.*, 1994; Yoshino *et al.*, 1995). Todas as sequências apresentam uma região conservada com os aminoácidos Cys-Cys-Asn-Pro-Ala-Cys, assim como presença de três pontes dissulfeto entre os seis resíduos de cisteínas encontrados nas sequências de STa (Takeda *et al.*, 1998).

A STa é um pequeno peptídeo, associado a infecções tanto em humanos como em animais; em humanos é o principal fator patogênico nas diarreias secretórias (Gianella, 1995). STb é associada principalmente a diarreia em bezerros e porcos recém-nascidos (Butler & Clarke, 1994; Sears & Kaper, 1996). Linhagens de ETEC isoladas de grandes e pequenos ruminantes produzem principalmente STa (Blanco *et al.*, 1988).

A toxina STa está bem classificada de acordo com o hospedeiro específico do qual a linhagem de ETEC foi isolada. STh são produzidas pelas linhagens de ETEC que infectam humanos enquanto STp são identificadas de linhagens isoladas de porcos, embora variantes de STp tenham sido encontradas em linhagens de origem bovina e humana (Nair & Takeda, 1998). Ambos os tipos são sintetizados como uma molécula pré-pró-peptídeo com 72 aminoácidos que é processada durante a sua exportação, sendo produzida a toxina ativa madura com 18 ou 19 aminoácidos. A sequência sinal Sec-dependente é removida durante a translocação através da membrana interna, ocorrendo a liberação do pró-peptídeo no espaço periplasmático, onde a isomerase formadora de pontes dissulfeto, DsbA, cataliza a formação de três pontes dissulfeto na região C-terminal e o pró-peptídeo depois é exportado completamente pela TolC, proteína transportadora da membrana externa. A pró-região é removida liberando uma pequena toxina madura. A formação das pontes dissulfeto na porção madura desta toxina confere a termoestabilidade (Yamanaka *et al.*, 1998; Nair & Takeda, 1998). A ligação da STa no domínio transmembrana do homotrimétrico receptor da guanilato ciclase C (GC-C), e a proteína ligada pela porção N-terminal glicolisa a proteína localizada na superfície apical dos enterócitos das vilosidades intestinais dos mamíferos, ativando o domínio das guanilato ciclases, com o resultado o aumento dos níveis intracelulares de guanosina

monofosfato cíclica – GMPc (Nair & Takeda, 1998; Vaandrager, 2002).

O aumento de GMPc induz a ativação do regulador de condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR) dos canais de cloreto, pela fosforilação da proteína quinase A dependente de GMPc, resultando no aumento de secreção de sais e água no lúmen intestinal e na interrupção da absorção de sódio e cloro nos canais apicais, conduzindo a diarreia secretória (Vaandrager, 2002). Há evidências para um segundo mecanismo de geração de GMPc em células humanas colonizadas. A STa pode mediar pelo inositol trifosfato-dependente a liberação de estoques de cálcio intracelular (Bhattacharya & Chakrabarti, 1998). A elevação dos níveis de cálcio induz a translocação da proteína quinase C do citoplasma para a membrana quando a guanilato ciclase comanda a produção de GMPc (Khare *et al.*, 1994; Ganguly *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 2005). Recentemente STa tem apresentado também a estimulação de secreção de bicarbonato independente de CFTR mas o mecanismo ainda não está bem definido (Sellers *et al.*, 2005).

A afinidade e densidade dos receptores para STa decrescem rapidamente com o aumento da idade (Cohen *et al.*, 1988; Al-Majali *et al.*, 1999). A etapa crucial para a patogenicidade das ETEC está vinculada à secreção de STa e à presença de receptores na superfície apical das células do epitélio intestinal (Al-Majali *et al.*, 2000).

O genoma da *E.coli* permite uma alta plasticidade para o ganho e perda de genes, e conseqüente virulência, com relativa frequência. Contribui para essa plasticidade o fato de muitos fatores de virulência em *E.coli* estarem localizados em elementos móveis como plasmídeos, fagos ou transposons (Muhdorfer & Hacker, 1994). Eles são muitas vezes agrupados em grandes blocos genéticos, chamados de ilhas de patogenicidade – PAI (Blum, *et al.*, 1994; Hacker *et al.*, 1997) e são caracterizadas por sequências flanqueadoras específicas (principalmente tRNA) conhecidas por ser pontos alvos de integração e excisão.

Muitos genes de virulência de ETEC estão localizados em plasmídeos. O gene da STa é parte de um transposon, o Tn1681, e o gene STb foi descrito como parte do transposon Tn4521. Nos estudos de Fekete *et al.* (2003) foi descrita a ligação dos genes *estA* e *estB* por um fragmento de aproximadamente 10kb designado TSL (toxin-specific locus). O TSL foi isolado de um plasmídeo de virulência pTC de uma linhagem 2173 de ETEC isolada de porcos e produtora de fímbria F18.

Quatro genes de STa (genes *estA*) já foram clonados e sequenciados: *estA1* (So & McCarthy, 1980; Sekizaki, *et al.*, 1985) de linhagem de *E.coli* isoladas de bovinos, suínos e aves; *estA2* (Guzman-Veduzco & Kupersztch, 1989) isolado de amostras humanas de Bangladesh, *estA3* (Stieglitz, *et al.*, 1988) de isolados humanos de Bangladesh e *estA4* (Rasheed, *et al.*, 1988) de linhagens humanas do México. Os quatro genes *estA* exibem uma ORF (*open reading frame*) para 72 aminoácidos, e quando atinge o espaço extracelular a toxina tem 18-19 aminoácidos (Aimoto, *et al.*, 1982, Stieglitz, *et al.*, 1988).

STb é normalmente associado com linhagens de ETEC isoladas de porcos mas também estão ligadas a isolados humanos (Lortie *et al.*, 1991; Okamoto *et al.*, 1993). O gene que codifica o STb, *estII*, codificam uma ORF para 71 aminoácidos que consistem em 23 resíduos que atuam como peptídeo sinal para o sistema Sec-dependente, com a remoção durante a translocação pela membrana interna liberando 48 resíduos para o periplasma. Uma vez no espaço periplasmático, DsbA forma quatro pontes dissulfeto em STb e depois o exporta por TorC (Foreman *et al.*, 1995; Nair & Takeda, 1998). STb se liga a sulfatida, um ácido glicosfingolipídico extensamente distribuído pela membrana. A secreção de fluídos ocorre depois da internalização da toxina pela via de ativação da toxina pertussis e ligação com a proteína reguladora de GTP. Isso resulta em um influxo de cálcio completo ao receptor dependente de ligante do canal de cálcio ativado por calmodulina dependente de proteína quinase II, com abertura dos canais iônicos intestinais, podendo ativar também a proteína quinase C e consequentemente CFTR (Dreyfus *et al.*, 1993; Sears & Kaper, 1996; Fujii *et al.*, 1997; Rousset *et al.*, 1998). Os aumentos dos níveis de cálcio também regulam as fosfolipases (A₂ e C) e causando a liberação de ácido araquidônico das membranas fosfolipídicas, induzindo a formação no intestino de prostaglandina E₂ e 5-HT, com a imediata liberação de água e eletrólitos pelas células intestinais (Hitotsubashi *et al.*, 1992; Harville & Dreyfus, 1995; Peterson & Whipp, 1995; Sears & Kaper, 1996; Dubreuil, 1997).

O patotipo EAEC (*E. coli* enteroagregativa) é reconhecido como um patógeno emergente que causa diarreia em crianças e adultos em todo o mundo. Sua principal característica é a capacidade de apresentar um padrão de aderência em células HEp-2 e HeLa, caracterizado pela presença de agregados bacterianos que aderem à superfície celular bem como à superfície da lamínula, em um arranjo semelhante a tijolos empilhados (Nataro *et al.*,

1987).

Savarino *et al.* (1991) identificaram uma proteína STa produzida por ETEC, designada EAST1 (enterotoxina termooestável de EAEC). A EAST1 é uma proteína de 38 aminoácidos que contém quatro resíduos de cisteína, diferentemente de STa que contém seis resíduos e é codificada pelo gene *astA*. Funcionalmente EAST1 é muito similar às STs de ETEC e é pouco caracterizada em termos de função e contribuição como mediador de doença por ETEC. Embora EAST1 tenha sido originalmente isolada de EAEC linhagem 17-2, foi identificada em outros patótipos de *E.coli*, incluindo ETEC de origem animal e humana (Yamamoto & Echeverria, 1996; Yamamoto & Nakazawa, 1997; Veilleux & Dubreuil, 2006). No entanto, a função de EAST1 mediando a diarreia permanece controversa; durante alguns estudos epidemiológicos a toxina foi implicada como mediadora da doença (Menard & Dubreuil, 2002; Veilleux & Dubreuil, 2006), em outro estudo, porém, a linhagem EAEC 17-2 não causou diarreia em estudos com voluntários humanos (Nataro *et al.*, 1995). Todavia, nos ensaios *in vivo* foi demonstrado que EAST1 isolado de EAEC pode induzir acúmulo de fluidos em teste de camundongo recém-nascido e em alça ligada de coelho. Além disso, EAST1 demonstrou atividade enterotóxica parcialmente termo resistente, podendo ser induzida por peptídeo sintético que consiste dos resíduos de aminoácidos 8-29 (Savarino *et al.*, 1991; Savarino *et al.*, 1993). EAST1 apresenta similaridades com STa: como na STa, as pontes dissulfeto conferem a resistência necessária para o funcionamento; a região funcional de STa e EAST1 demonstram 50% de similaridade; como a STa, EAST1 ativa a produção de GMPc e GC-C da superfície das células eucarióticas se apresentam como receptor para ambas as toxinas. Entretanto, anticorpos anti-STa não inibem a atividade enterotóxica de EAST1 (Savarino *et al.*, 1991; Savarino *et al.*, 1993; Menard *et al.*, 2004).

Em contraste a EAST1, as enterotoxinas termolábeis (LT) codificadas pelo operon *estAB* são um fator de virulência de ETEC com homologia com a toxina colérica (CT). A produção de LT induz diarreia. Testes para a verificação dos efeitos sinérgicos com as toxinas ST e EAST1, indicam que elas têm diferentes mecanismos de ação (Berberov *et al.*, 2004).

Os membros da família de enterotoxinas AB5 produzem a LT madura com 84kDa que é um pentâmero com cinco subunidades B de 11,6 kDa associadas a uma subunidade A de 28 kDa. A subunidade A consiste em dois domínios distintos ligados por uma ponte dissulfeto; o

domínio A1 possui atividade de ADP-ribosilase e NAD-glicohidrolase, ao passo que o fragmento A2 media a interação com a subunidade B para formar o complexo AB5 (Spangler, 1992).

As subunidades da toxina LT são translocadas pela membrana interna via Sec e depois é formada a estrutura AB5 no espaço periplasmático, processo dependente de DsbA. Através do sistema de secreção do tipo II passa pela membrana externa, e fica ligada ao lipopolissacarídeo (LPS) da superfície bacteriana, sendo associada com vesículas de membrana externa. A atividade da LT está principalmente associada às vesículas (Horstman & Kuehn, 2000; Horstman *et al.*, 2004). Alguns trabalhos têm sugerido que o conjunto vesícula e toxina sejam internalizados pela célula hospedeira, mas a presença de LPS e a ligação da subunidade B no receptor da superfície das células (Fukuta *et al.*, 1988; Horstman & Kuehn, 2002; Kesty *et al.*, 2004) é ainda um fator limitante. A subunidade B se liga a gangliosídeos na superfície da célula do hospedeiro e a subunidade A entra na célula induzindo o aumento de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). O aumento do AMPc leva a fosforilação de CFTR, resultando no aumento de secreção de fluídos e má absorção, sendo manifestada a diarreia (Spangler, 1992; Nataro & Kaper, 1998).

O tipo de receptor da superfície celular para a toxina LT pode se ligar dependendo da especificidade da subunidade B. Neste contexto, as LTs podem ser divididas em dois grupos: LTI e LTII. A toxina LTI é a mais bem relacionada com a CT com 75% de similaridade com a subunidade A e 77% com a subunidade B. Duas enterotoxinas LTII, LTIIa e LTIIb já foram isoladas e com atividade biológica parecida com LTI mas não imunologicamente. Enquanto a subunidade A de LTIIa e LTIIb são similares uma com a outra e CT e LTI, a subunidade B não é significativamente homóloga com a subunidade de CT ou LTI (Spangler, 1992). Estas diferenças nas sequências conferem a habilidade da subunidade B em se ligar a diferentes receptores gangliosídeos (Fukuta *et al.*, 1988).

Em adição às enterotoxinas descritas, diferentes toxinas estão recentemente sendo descritas, incluindo EatA, outra autotransportadora encontrada na *E.coli* H10407 e em muitos isolados clínicos de ETEC (Patel *et al.*, 2004). EatA possui homologia com o amplo grupo das autotransportadoras determinadas como autotransportadoras serina protease de *Enterobacteriaceae*, ou SPATEs, que têm sido implicadas como um fator de virulência agindo

como toxina e protease extracelular (Henderson *et al.*, 2004). De fato, EatA compartilha 85% de similaridade com SepA, uma SPATE de *Shigella flexneri* (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1995; Patel *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que EatA possui a mesma especificidade da SepA de conjugar nitroanilida a oligopeptídeos, e essa mutagenese sítio-dirigida dos resíduos predita para serinas proteases catalítica anulando a habilidade de EatA de clivar oligopeptídeos (Benjelloun-Touimi *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 2004). Os oligopeptídeos clivados pela EatA são identificados como substrato da catepsina G, uma serina protease que modula ou cliva uma diversidade de arranjos de produtos extracelulares incluindo proteoglicanos e receptores da superfície celular ativado por proteases, sugerindo que EatA pode iniciar uma função de virulência em ETEC por causar dano na superfície das células epiteliais (Patel *et al.*, 2004). Estudos *in vivo* em alça ligada de coelhos demonstraram pouco acúmulo de líquidos, sugerindo que a EatA não é o único fator necessário para a infecção, mas que pode agir acelerando a virulência de ETEC.

Semelhante a EatA, o preciso envolvimento de ClyA em ETEC para mediar a doença persiste como apenas uma especulação. ClyA também designada como HlyE e SheA, foi primeiramente identificada em *E.coli* K-12, mas também é encontrada em isolados clínicos incluindo linhagens de ETEC (Ludwig *et al.*, 1999). A expressão de ClyA é negativamente regulada pela H-NS e positivamente regulada pela SlyA, FNR e CRP (Oscarsson *et al.*, 1996; Westermarck *et al.*, 2000). De maneira confusa, as linhagens de *E.coli*, incluindo isolados de ETEC, possuem *clyA* mas não expressam ClyA em condições normais de crescimento em laboratório mas a expressão pode ser induzida quando o regulador positivo SlyA é adicionado, sugerindo que a expressão de ClyA pode estar ligado durante os processos infecciosos (Ludwig *et al.*, 2004). No entanto, ensaios *in vitro* demonstraram que a ClyA purificada pode causar hemólise em eritrócitos e ser citotóxico para macrófagos e cultura de células HeLa (Oscarsson *et al.*, 1999; Wai *et al.*, 2003).

Devido à ocorrência freqüente de diarreia em crianças em relação a outras doenças na cidade de Ouro Preto – Minas Gerais, Neves (2002) mostrou que 70% das amostras de água coletadas da cidade estavam contaminadas por coliformes fecais, além de outros agentes diarreogênicos. Em continuidade, Ribeiro (2006) estudou os fatores de virulência de 97

amostras de *E. coli* isoladas por Neves (2002) e observou em 40% destas amostras, onde apresentaram nos sobrenadantes de cultura um fator de virulência com atividade enterotóxica termoestável e atividade citotóxica, provocando a formação de agrupamentos celulares com desarranjo do citoesqueleto das células Vero, CHO e HeLa.

Em estudos genotípicos pela PCR, não foram encontrados entre as amostras de *E. coli* genes para enterotoxina termo-lábil (*eltI*, *eltII*), enterotoxina termoestável (*estA*, *estB*), Shiga-like toxins (*stx1* and *stx2*), fator necrosante citotóxico (*cnf1* and *cnf2*), toxina citoletal distensora (*cdtB*), EAST1 (*astA*), enterohemolisina (*enhly*), α -Hly (*hlyA*), plasmid-encoded toxin (*pet*) e proteína envolvida na colonização (*pic*) (Ribeiro, 2006).

De acordo com dados da literatura, existem três tipos reconhecidos de toxinas STs produzidas por *E. coli* diarreio gênicas: STa, STb e EAST1 (Kaper & Nataro, 2004), porém, não são conhecidas as atividades citopáticas (citotônica e citotóxica) da STa em células de cultivo.

A detecção biológica da STa se faz principalmente pelo teste de camundongos recém-nascidos (Dean *et al.*, 1972). Para a detecção biológica da STb, é feito ensaio em alça ligada de intestinos de leitões de quatro a seis semanas e de coelhos na presença de inibidor de protease (Okamoto, 1997).

É possível, portanto, que *E. coli* isoladas de água de consumo da região de Ouro Preto – Minas Gerais (Ribeiro, 2006) estão produzindo uma nova enterotoxina com atividade citotóxica. A caracterização intracelular e molecular desta enterotoxina poderá explicar o mecanismo de ação, bem como seu envolvimento na enteropatogênese da *E.coli*.

OBJETIVOS

O objetivo desta pesquisa foi purificar e caracterizar a enterotoxina-citotóxica termoestável, provisoriamente denominada de ST-like (ST-L), produzida por *E. coli* isoladas de água de consumo, visando esclarecimento da enteropatogenia, através das seguintes abordagens:

Objetivos específicos:

- 1) Purificação da ST-L;
- 2) Estudar a influência de tratamentos físico-químicos sobre a ST-L;
- 3) Determinar a citotoxicidade da ST-L em diferentes linhagens celulares e estudar as alterações intracelulares induzidas pela toxina;
- 4) Determinar a atividade enterotóxica da ST-L *in vivo*;
- 5) Caracterização molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Produção e purificação da ST-L

1.1. Amostras bacterianas

Para a realização deste trabalho foram utilizadas 39 amostras *E.coli* isoladas de água de consumo da cidade de Ouro Preto, MG, isoladas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ouro Preto, MG, no período de janeiro de 2002 a fevereiro de 2003.

Como controles positivos nos ensaios biológicos foram usados as linhagens de *E. coli* toxigênica B41 – STa⁺ humana (Yano *et al.*, 1995), *E.coli* toxigênica ETEC 23 – STa⁺ animal (cedida pelo professor Dr. Luiz Rachid Trabulsi, laboratório de bacteriologia – USP) e como controle negativo a *E. coli* K-12. As linhagens foram mantidas em LB (Luria Broth) com glicerol a -80°C.

1.2. Condições de cultivo

Para a produção da toxina ST-L utilizamos a bactéria EC79 isolada por Neves (2002). Esta foi cultivada em diferentes meios de cultura, para verificar o melhor meio para a produção da toxina em estudo: meio LB sem e com suplementação de NaCl, Meio Mínimo sem e com glicose 10%, meio Muller Hinton (Difco), meio TSB (Difco) com e sem suplementação de 0,6% de extrato de levedura, meio BHI (Difco), meio CAYE (Takeda *et al.*, 1979) com e sem a suplementação de NaCl e com suplementação ou ausência de íons (Fe, Mn e Mg) e meio mínimo modificado por Staples *et al.* (1980).

Foi verificada a melhor temperatura de cultivo (32°C, 37°C ou 42°C), cultivo sem ou com agitação (120 rpm), tempo de cultivo (de 8 a 36 horas de incubação) e pH do meio (de 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0) ajustada com HCl ou NaOH antes que a linhagem fosse semeada.

1.3. Método para a concentração da ST-L

A amostra EC79 foi cultivada em meio CAYE com 0,5% de NaCl sem a presença dos

íons , pH 8,5 por 24 horas a 37°C com agitação. Após o período de cultivo a cultura bacteriana foi centrifugada a 10.000xg, durante 20 minutos. O sobrenadante de cultura foi submetido a precipitação com 80% de sulfato de amônio (Merck) a 4°C por no mínimo seis horas e em seguida o material foi centrifugado a 10.000xg por 20 minutos.

O precipitado foi ressuspensionado em água MilliQ e dialisado contra água por 48 horas em membrana de diálise MWCO 1 (Spectra/Por CE) e posteriormente submetido a ultrafiltração em sistema Centricon MWCO 3kDa (Amicon) e o material não retido na membrana foi liofilizado (Liofilizador Savant, Savant Instruments Inc) e este usado para os processos cromatográficos. Em todas as etapas para concentração da toxina foram utilizados testes citotóxicos com culturas de células Vero e HEp-2 e enterotóxico em camundongos recém-nascidos para certificação do efeito biológicos.

1.4. Etapas cromatográficas para purificação da ST-L

1.4.1. Primeira etapa – cromatografia de exclusão molecular

Utilizamos a coluna Superdex Peptide HR 10/30 (GE Bioscience) de exclusão molecular no sistema HPLC (AKTA-HPLC, GE Bioscience), equilibrada com o tampão acetato de amônio pH 5,7 a 0,1M aplicando-se a toxina bruta (menor que 3kDa liofilizado), que foi ressuspensionada em água MilliQ e acrescido 10% de 2-mercaptoetanol e aquecido por 15 minutos a 100°C antes das cromatografias. Utilizou-se 0,1mL de amostra com fluxo de 1mL/min, leitura em 220nm e coletou-se 1mL/tubo. As frações coletadas foram liofilizadas e ressuspensionadas em tampão PBS pH 7,4 para os testes biológicos em cultura de células Vero e HEp-2 e em camundongo recém-nascido. A fração com atividade citotóxica foi armazenada a -20°C.

1.4.2. Segunda etapa – cromatografia de fase reversa

O pico obtido na cromatografia anterior, com efeito citotóxico foi concentrado por evaporação à vácuo (SpeedVac Eppendorf) e submetido à coluna cromatográfica de fase reversa Sephasil Peptide C₁₈ 5µ ST 4.6/250 (GE Bioscience) em sistema HPLC. A coluna foi equilibrada com acetato de amônio pH 5,7 a 0,1M. A eluição foi realizada usando o mesmo

tampão e fazendo gradiente linear de 0 a 100% com acetonitrila 80%. Foi aplicado um volume de 0,1mL com fluxo de 2mL/min e leitura em 220 e 280nm, seguindo o método de Aimoto *et al.* (1982), com modificações.

As frações cromatográficas com atividade citotóxica coletadas foram armazenadas a -20°C.

1.5. Análises eletroforéticas

1.5.1. Eletroforese SDS-PAGE

As eletroforeses em gel de SDS-PAGE (gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) foram realizadas como descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis de separação de 15% e tampão de corrida contendo Tris-HCl 0.025M, pH 8,3, glicina 0,1M e SDS 0,12%. Para a estimativa do peso molecular foi utilizado um padrão com pesos moleculares conhecidos (Invitrogen). O padrão de peso molecular e as amostras foram misturados separadamente em tampão de amostra (v/v) constituído de Tris-HCl 0,125, pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,02% e aquecidos a 100°C por 5 minutos antes da aplicação no gel. A eletroforese foi conduzida a uma corrente elétrica constante de 100 mA.

1.5.2. Tricina SDS-PAGE

As eletroforeses em gel de Tricina SDS-PAGE foram realizadas como descrito por Schägger e Jagow (1987). Foram utilizados géis de separação 49,5%T3%C e tampão ânodo contendo Tris-HCl 0,2M, pH 8,9 e tampão catodo contendo Tris-HCl 0,1M pH 8,25, Tricina 0,1M, SDS 0,1%. Para a estimativa do peso molecular foi utilizado padrão de pesos moleculares conhecidos (GE Bioscience). O padrão de peso molecular e as amostras foram misturados em tampão de amostra (v/v) constituído de Tris-HCl 0,125M, pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,02%, sendo aquecidos a 100°C por 5 minutos antes da aplicação no gel. A eletroforese foi conduzida a uma corrente elétrica constante de 30mA.

1.5.3. Coloração dos géis

Os géis foram corados por impregnação com prata seguindo método de Poehling & Neuhoﬀ (1981). Primeiramente o gel foi imerso em solução fixadora (etanol 50%, ácido acético glacial 12%), por no mínimo 60 minutos e, posteriormente, lavado em etanol 50% por três vezes em intervalos de 20 minutos. A seguir o gel foi imerso numa solução de pré-tratamento de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,02%) durante 1 minuto e lavado 3 vezes com água destilada. A impregnação com prata foi realizada usando uma solução com AgNO_3 0,2% e formaldeído 0,075%, por 20 minutos, sendo lavado novamente por 3 vezes com água destilada, efetuando-se a revelação com solução de Na_2CO_3 6%, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,4% e formaldeído 0,05%. A revelação foi interrompida com a solução de etanol 50% e ácido acético glacial 12%.

Utilizou-se também o método de coloração por Comassie Blue Coloidal G250 (Serva) segundo método do fabricante.

1.5.4. Análise em eletroforese 2D

A ST-L foi submetida a eletroforese bidimensional em sistema focalizador de proteínas Ettan IPGphor (GE Healthcare), através da utilização de fitas com pH definido entre 3 e 10 (IPG strips) seguindo as instruções do fabricante. A focalização foi feita em concentrações de 2 μg da toxina purificada, sendo conduzidas através do controlador Ettan IPGphor software system, até atingir um total de 30.000 VH^{-1} acumulados no processo. A segunda etapa da eletroforese foi conduzida com as fitas focalizadas sobre SDS-PAGE a 15% (Laemmli, 1970), sendo os géis corados com nitrato de prata, segundo descrito no item anterior. As imagens obtidas dos géis foram capturadas através do sistema Scanner III (GE Healthcare), sendo analisadas pelo software ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare).

1.6. Determinação da concentração protéica

A determinação da concentração de proteínas foi realizada por absorbância segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando o kit Bradford (Bio-Rad) contendo a solução de Bradford concentrada (coomassie brilliant blue G-250, 25% de metanol e 50% de

ácido fosfórico) e utilizou-se insulina (Sigma) para a elaboração da curva padrão, variando sua concentração entre 0,01 a 1 mg/mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e de acordo com as recomendações do fabricante.

2. Influencia de tratamentos físico-químicos sobre a atividade biológica da toxina ST-L

2.1. Teste de termoestabilidade

No ensaio de termoestabilidade o sobrenadante da cultura bacteriana e a ST-L purificada foram submetidos às temperaturas de 65°C (30 minutos) e 100°C (30 minutos) e armazenamento por um mês a baixas temperaturas (-70°C, -20°C e 4°C) e em seguida analisado a atividade citotóxica residual em células Vero e HEp-2.

2.2. Efeito de proteases e pH na ST-L

A ST-L purificada foi tratada com as enzimas proteolíticas: tripsina, proteinase K, ribonuclease e pepsina (100µg/mL) a 37°C por 60 minutos. Após o período de incubação as enzimas foram inativadas a temperatura de 60°C por uma hora, exceto a pepsina que foi inativada com pH neutro.

O efeito do pH na atividade citotóxica da ST-L foi verificada em diferentes pHs (3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9) por 30 minutos e sendo em seguida o pH corrigido com HCl ou NaOH para pH 7.4.

Após cada tratamento a toxina foi analisada a atividade citotóxica residual em teste em cultura de células Vero e HEp-2.

2.3. Tratamento com solventes orgânicos

A ST-L liofilizada foi ressuspendida com 90% de etanol, metanol e acetona separadamente, por 1 hora a 4°C. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante e o precipitado foram evaporados a vácuo, ressuspendidos em

água MilliQ e verificado quanto a presença de atividade biológica em cultura de células Vero e HEp-2.

2.4. Atividade citotóxica na presença de periodato de sódio

A ST-L foi tratada com periodato de sódio (2 mM) a 37°C por 30 minutos, segundo a metodologia de Bhuiyan *et al.* (1995), sendo, em seguida, analisada a atividade biológica em cultura de células Vero e HEp-2 .

2.5. Tratamento com agente redutor 2-mercaptoetanol

A proteína foi tratada com 2-mercaptoetanol 18 mM (Sigma) por 30 minutos a 37°C segundo Barnes *et al.* (1997), sendo em seguida examinada a atividade biológica.

3. Caracterização da atividade biológica da ST-L

3.1. Detecção de atividade citotóxica

3.1.1. Preparo da cultura celular

Suspensões celulares ($2,5 \times 10^4$ células/mL) de células epiteliais de rim de macaco verde africano (Vero), carcinoma de laringe (HEp-2), adenocarcinoma de cólon humano (CaCo-2) e adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) no meio MEM (meio mínimo essencial de Eagle) ou RPMI (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma) e foram distribuídas em placas de 96 cavidades (0,1 mL da suspensão celular por cavidade). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5 % CO₂ (Jouan Instruments Co. França) por 24h para formação da monocamada celular.

3.1.2. Teste de citotoxicidade em cultura de células

O meio de cultura das microplacas com as células Vero e HEp-2 foi removido e alíquotas de 100 µL do meio MEM foram adicionadas às placas. Alíquotas de toxina ST-L foram adicionadas em duplicata, em diluições seriadas na razão dois. As microplacas foram

incubadas a 37°C e 5% de CO₂ e as leituras dos resultados foram feitas 4, 8, 12, 24, 48 e 72 horas após a incubação, com o auxílio de microscópio invertido (Axiovert-Zeiss). Foi utilizadas linhagens produtoras de STp (ETEC 23) e STh (B41) como controle.

3.1.3. Determinação de CD₅₀

A CD₅₀ (dose citotóxica 50%) da ST-L foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Borenfreund & Puerner (1984) teste foi realizado em triplicatas em cultura de células Vero e HEp-2. As células foram tratadas com diferentes concentrações da toxina por um tempo pré-determinado e depois coradas com corante vermelho neutro por 3 horas; após este tempo rapidamente fixadas com uma solução de formol e cloreto de cálcio e posteriormente com uma solução de etanol e ácido acético por 15 minutos. Os resultados foram obtidos por espectrofotometria com absorbância a 540 nm.

3.1.4. Estudo da incorporação de vermelho neutro x viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado nas linhagens celulares Vero, HEp-2, CaCo-2 e HT-29, segundo a metodologia descrita por Borenfreund & Puerner (1984). Utilizou-se 2 CD₅₀ da toxina que foi aplicada à cultura celular em vários intervalos de tempo: 0, 3, 6, 9, 16 e 24 horas, e posteriormente o meio de cultura foi removido dos orifícios das placas. Após estes períodos as células foram lavadas com PBS pH 7,4 e posteriormente foi adicionada a cada cavidade 0,2 mL de meio MEM contendo 50 µg mL⁻¹ de vermelho neutro, um corante vital. A microplaca foi incubada durante 3 horas a 37°C para absorção do vermelho neutro pelos lisossomos das células viáveis. Após esse tempo, as células foram lavadas rapidamente com solução de 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, e a microplaca foi mantida durante 15 minutos a temperatura ambiente para liberação do corante incorporado e, em seguida realizada leitura a 540 nm em espectrofotômetro (Titerk Multiskan, model 340). Como branco da reação foram utilizadas células não tratadas com a toxina e sem a adição do corante vermelho neutro. Células normais,

ou seja, sem a adição de citotoxinas, com adição de vermelho neutro, serviram como controle positivo da reação (células viáveis) e para controle negativo da viabilidade da cultura de células foi utilizado SDS a 10%.

A cinética da viabilidade celular após o tratamento com os materiais analisados foi expressa como o percentual de células viáveis em relação ao controle celular (células não tratadas) em função do tempo de ensaio.

3.1.5. Estudo da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH)

Para o estudo da integridade da membrana celular a LDH foi medida espectrofotometricamente, acompanhando-se a catálise da redução de piruvato a lactato, através da medida do desaparecimento de NADH (Mitchell *et al.*, 1980). O consumo de NADH foi acompanhado pela sua absorção específica a 340nm, em intervalos de 30 segundos, durante 3 minutos (total de sete leituras). As células de cultura cultivadas em monocamada (Vero, HEp-2, CaCo-2 e HT-29) foram lavadas com PBS e, em seguida, adicionado meio MEM com a 2 CD₅₀ da toxina em diferentes intervalos de tempo: 0, 3, 6, 9, 16 e 24 horas. Após cada um dos intervalos, o meio de cultura foi coletado separadamente em tubos, mantidas em banho de gelo e centrifugados a 1000xg por 5 minutos. A reação catalisada pela LDH foi acompanhada em cubetas descartáveis, pela adição de alíquotas do meio de tratamento em 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 contendo NADH (2,5mg/mL) e piruvato de sódio (1mg/mL), em espectrofotômetro a 340 nm. O cálculo da variação média da absorbância foi feito substituindo-se os valores de absorbância entre 2 intervalos de tempo de 60 segundos, por exemplo, $A_{90s} - A_{30s}$, determinando-se assim a média (M) dos 4 intervalos de leituras. A atividade da LDH foi determinada pela fórmula: Unidades LDH/mL = $M (abs) \times D \times F$, onde D = fator de diluição (10.000); F = fator de temperatura a 30°C, 1,16 (Mitchell *et al.*, 1980).

3.1.6. Estudo da ação da ST-L na respiração mitocondrial

A ação da ST-L na respiração mitocondrial das células de cultura foi avaliada seguindo-se a metodologia de Borenfreund *et al.* (1988). Uma alíquota de 2 CD₅₀ da ST-L em meio

MEM foi aplicada às células Vero, HEp-2, HT-29 e CaCo-2, crescidas em placas de 96 cavidades, com 0,2mL de suspensão celular/cavidade, na concentração de 10^4 células/mL em estufa a 5% de CO₂ a 37°C, nos mesmos intervalos no ensaio anterior. O meio foi descartado após os intervalos de tempo e adicionado o MTT na concentração de 0,1mg/mL em MEM, e incubado por 3h a 37°C. As células foram lavadas com PBS 0,05M e a seguir adicionado 0,2mL da solução de extração (1:24 de HCl 1N e isopropanol), deixando a placa por 10 minutos à temperatura ambiente. Como controle negativo foi utilizado células sem adição de toxina, mas com solução de extração (SDS 10%). A leitura do material foi realizada em espectrofotômetro (Titerk Multiskan, model 340) no comprimento de onda de 570nm.

3.1.7. Estudo da ação da ST-L no crescimento celular

O ensaio foi realizado seguindo a metodologia proposta por Saotome *et al.* (1989) onde a cultura celular Vero, HEp-2, HT-29 e CaCo-2, em placas de 96 poços com semiconfluência foi tratada com 2 CD₅₀ da ST-L nos intervalos de 0, 3, 6, 9, 16 e 24 horas. O meio de cultivo foi retirado e as células fixadas com glutaraldeído 25% por 20 minutos, sendo em seguida lavados com água e depois corados com 0,4% de cristal violeta em metanol por 30 minutos. As células foram novamente lavadas para retirar o excesso de corante não incorporado pelas células e estas foram lisadas para liberar o corante com SDS 1% por 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Titerk Multiskan, model 340) em 590 nm e os ensaios foram realizados em duplicatas. Utilizados controle positivo PBS e controle negativo triton x-100.

3.2. Estudo de alteração de estruturas intracelulares

3.2.1. Coloração com azul de toluidina

As células HEp-2 foram crescidas sobre lamínulas, em placas de 24 concavidades, onde em cada concavidade foram adicionadas 10^4 células/mL. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37°C. Alíquotas de 2 CD₅₀ da ST-L foram aplicadas nas células e as placas retornaram à estufa. Após 6 horas de tratamento, as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas em uma solução de formaldeído a 10% em PBS por 1 hora. As lamínulas foram então

lavadas com água destilada e coradas segundo a metodologia de Mello & Vidal (1980) utilizando azul de toluidina a 0,0025% em tampão Mc Ilvane a pH 4,0. Após 15 minutos de coloração, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com água destilada para a retirada do excesso de corante, secas ao ar e diafanizadas em xilol. As lamínulas foram montadas sobre lâminas utilizando-se bálsamo do Canadá. Neste ensaio foram utilizadas duplicatas do controle negativo (PBS) e do tratamento.

3.2.2. Coloração com Feulgen

As células HEp-2 tratadas com o 2 CD₅₀ da ST-L durante 6 horas foram fixadas com formaldeído 4% (v/v) em PBS 10 mM pH 7,4 e submetidas à reação de Feulgen, como descrito por Mello & Vidal (1978). O material foi lavado com PBS e hidrolisado com HCl 4N à temperatura ambiente, durante 45 minutos. Posteriormente as lamínulas foram lavadas várias vezes com água destilada e tratadas com o reativo de Schiff, nas mesmas condições de temperatura, durante 45 minutos. Após este 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 bálsamo do Canadá. As análises microscópicas foram realizadas através de microscopia óptica (Axioskop Zeiss). Neste ensaio foram utilizadas duplicatas do controle e do tratamento.

3.3 Detecção de atividades enterotóxicas

3.3.1 Teste de Camundongos recém-nascidos

A atividade enterotóxica da toxina ST-L foi analisada pelo teste de camundongos recém-nascidos baseando-se na técnica descrita por Dean *et al.* (1972). Camundongos recém-nascidos de 2 a 4 dias de idade foram inoculados oralmente com 0,1mL da ST-L (sobrenadante da cultura aquecido e não aquecido e toxina purificada aquecida) com solução azul de Evans a 2%. Após 3 horas, os animais foram sacrificados com vapor de halotano e o intestino foi retirado com pinça. A relação entre o peso do intestino pelo peso da carcaça total (I/C), quando

igual ou superior a 0,08 foi considerado como resultado positivo.

3.3.2 Teste de alça ligada do intestino de coelhos

Para os testes de alça ligada de intestino de coelho foram utilizados dois coelhos albinos jovens pesando de 1,8 kg a 2,0 kg, alimentados 24 horas antes do teste apenas com solução de glicose a 10%. Os animais foram anestesiados e analgesiados com Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina (Rompum - Roche) por via intramuscular. Após tricotomia e anti-sepsia, procedeu-se a incisão cirúrgica. Foram feitas alças intestinais de cinco ou dez centímetros de comprimento começando na partes proximais do íleo e separadas por interalças de cinco centímetros. As alças foram inoculadas com sobrenadante da cultura filtrado, toxina bruta (material liofilizado menor que 3kDa ressuspendido em PBS) e toxina purificada. Os animais foram mantidos em jejum por 18 horas e sacrificados com injeção de 1mL de pentabarbúrico a 25% por via endovenosa. A cavidade abdominal foi aberta novamente e o intestino retirado e examinado para a verificação da ocorrência de dilatação intestinal em decorrência do acúmulo de líquidos em sua luz, sendo feitas medições do volume de líquido acumulado em cada alça e o comprimento da mesma. O coeficiente RIL (volume do conteúdo da alça/comprimento em cm) foi considerado positivo com valores superiores a 1 mL/cm (Blanco & Blanco, 1993).

3.4. Detecção de atividade hemolítica

Foi utilizado o método em microplacas descrito por Bhakdi *et al.* (1986). Alíquotas de 50 µL de sobrenadante de cultura e toxina purificada foram diluídas sucessivamente na razão dois, em PBS 0,15M. Alíquotas de 50 µL de suspensão a 1% dos eritrócitos de humano e de cavalo, previamente lavados três vezes em PBS 0,15M, foram adicionadas a cada orifício contendo a toxina e o efeito foi determinado visualmente após 60 minutos de incubação em banho de água a 37°C e após 24h a 4°C. O experimento foi realizado em triplicata.

4. Caracterização molecular

4.1. *Primers* utilizados

Foram utilizados vários *primers* (ver Tabela 1) na tentativa de detectar regiões do gene da toxina termoestável de *E.coli* (baseados nos genes completos depositados no banco de dados GeneBank), para a detecção do gene *est* (toxina termoestável) e suas variantes *estA1* (STa isolado de animais), *estA2* (STa isolado de humanos), *estA3* (STa isolado de humanos), *estB* (STb isolado de suíno) e *ast* (EAST1 – ST isolada de linhagem de *E.coli* enteroagregativa), que apresentam região de anelamento distinta do *primer* utilizado anteriormente por Ribeiro (2006); verificado nos programas ClustalW e BioEdit. Os *primers* seqA, seqB, seqC e seqD foram desenhados a partir da sequência M18345 (gene *estA2*) no programa Gene Runner para serem utilizados nas reações de sequenciamento e as outras sequências usadas para a PCR.

Tabela 1 – Relação dos *primers* utilizados no trabalho

	Sequência 5'-3' (“f” <i>forward</i> e “r” <i>reverse</i>)	Tamanho Amplificado	Referência
<i>est</i>	f ATT TTT CTT TCT GTA TTG TCT T r CAC CCG GTA CAA GCA GGA TT	190bp	López-Saucedo <i>et al.</i> , 2003
<i>estA 1</i>	f TCT TTC CCC TCT TTT AGT CAG r ACA GGC AGG ATT ACA ACA AAG	166 bp	Hammermueller, <i>et al.</i> , 1995
<i>estA 2</i>	f TCT TTC CCC TCT TTA GTC AG r ACA GGC CGG ATT ACA ACA AAG	166bp	Osek, 2001
<i>estA 3</i>	SThIB f AGT GGT CCT GAA AGC ATG STh5 f TCA CCT TTC CCT CAG GAT STh7 f AAC CAG TAG AGT CTT CAA AAG STh2 r CAA CAA AGC AAC AGG TAC STh6 r TAC AAG CAG GAT TAC AAC AC	~ 110bp	Bölin <i>et al.</i> , 2006
<i>estB</i>	f GCC TAT GCA TCT ACA CAA TC r TGA GAA ATG GAC AAT GTC CG	278bp	Osek, 2001
<i>ast 1</i>	f TAT CCC CCT TTG GTG GTA r CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGA	111bp	Huang, <i>et al.</i> , 2007
seqA	StF4 – 5' CGCTCAGGATGCTAAACC 3' StR1 – 5' CACCCGGTACAAGCAGGATT 3'	159bp	este estudo
seqB	StF3 – 5' GACGTGTTTCGGAGGTAAT 3' StR2 – 5' CACGGCGCACACAAATAT 3'	286bp	este estudo
seqC	StF2 – 5' GTTTGCGCAATCGTTCTG 3' StR3 – 5' CAGCCTCCACAGTTGAAGA 3'	358bp	este estudo
seqD	StF1 – 5' CCCC GCCCTAAAACATAA 3' StR4 – 5' ACGAATTCCCCTGTGTCC 3'	544bp	este estudo

4.2. Extração plasmidial

Para verificar se o gene em estudo estava localizado em um plasmídeo foi realizada uma extração de DNA plasmidial por lise alcalina, segundo protocolo da Qiagen (com modificações). As bactérias foram cultivadas em meio LB a 37°C por 16 horas, em seguida centrifugadas a 14.000xg e o sobrenadante descartado. O precipitado formado foi ressuspensionado com o auxílio de vórtex com tampão Tris-HCl 50mM, EDTA 10mM (pH 8,0) e RNase 100µg/mL. Em seguida foi adicionado NaOH 200mM com SDS 1% e os tubos agitados por inversão e incubando a temperatura ambiente por 5 minutos, colocando-se em seguida acetato de potássio 3M pH 5,5 e incubando por 15 minutos em geladeira. Após este período os tubos foram centrifugados a 14.000xg durante 10 minutos a temperatura ambiente e coletado o sobrenadante em novo tubo, se acrescentado isopropanol e novamente centrifugado por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se etanol 70%, agitando-se os tubos por inversão seguida por centrifugação a 14°C por 5 minutos. O etanol foi descartado e o DNA foi seco completamente para ser ressuspensionado em água. A extração foi analisada em gel de agarose 0,8% com 80V por 2 horas na cuba de eletroforese horizontal. O gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado em transiluminador UV.

4.2.1. Confirmação da presença do gene no plasmídeo – eletroeluição

Para a confirmação da presença do gene *est* nos plasmídeos em estudo as bandas foram recortadas do gel de agarose e, para a extração do DNA realizou-se a técnica de eletroeluição descrita por Maniatis *et al.* (1989). As bandas cortadas foram colocadas em um saco de diálise com tampão EDTA 0,02M e ácido bórico 0,88M (TEB) selado nas extremidades e colocado em cuba de eletroforese horizontal no sentido paralelo dos eletrodos, aplicando-se 7,5 V/cm por 60 minutos. Após este período, reverteu-se a polaridade por 20 segundos e o tampão TEB contendo o DNA plasmidial foi retirado do saco de diálise. O DNA foi extraído do tampão com fenol/clorofórmio (1:1) e precipitado com etanol 100% *overnight* a 4°C. O DNA resultante foi utilizado para a realização da reação de PCR com o primer *est*.

4.2.2. Cultivo bacteriano com antibióticos

A bactéria em estudo EC79 foi cultivada em meio LB sólido com streptomicina 50µg/mL, kanamicina 50 µg/mL, tetraciclina 50 µg/mL e ampicilina 60 µg/mL separadamente, para verificar a presença de resistência a antibióticos. Os clones obtidos foram submetidos à extração plasmidial.

4.2.3. Sequenciamento gênico

Os próximos ensaios foram realizados com a colaboração com o laboratório de biologia molecular de plantas no CBMEG – Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética – Unicamp. Para o sequenciamento utilizou-se o material obtido da extração plasmidial que apresentou resistência à ampicilina e o amplificado resultante do PCR obtido com os primers *est*, seqA, seqB, seqC e seqD. Após o sequenciamento os resultados foram disponibilizados no site <http://bmp.cbmeg.unicamp.br/YA> para as posteriores análises.

4.2.4. Protocolo para reação de sequenciamento

Para a realização do sequenciamento foi necessário realizar uma reação de PCR utilizando o tampão “Save Money” (Tris-HCl 1M pH 9 e MgCl₂ 1M). Para preparar o pré-mix (para o PCR) foi usado o tampão “Save Money”, “Big Dye”, *primer* (apenas um dos pares para cada reação do *primer* – uma reação senso e outra antisenso) e DNA, para um volume final da reação de 20µL.

O programa para reação de PCR usada foi de um ciclo de 96°C por 1 minuto e 30 segundos, 25 ciclos de 96°C por 12 segundos, 50°C por 6 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a realização da PCR fez-se a purificação do DNA obtido, acrescentando-se a reação (na placa de 96 poços) etanol absoluto que foi homogeneizado e deixado a temperatura ambiente por 15 minutos. O material foi posteriormente centrifugado por 45 minutos a 4000xg a 20°C, em seguida descartado os sobrenadantes e adicionou etanol 70%, e novamente centrifugando a 4000xg por 10 minutos a 20°C. Foi retirado o sobrenadante, deixado secar completamente e acrescentado formamida. O DNA foi então desnaturado por 5 minutos a 96°C e colocado no seqüenciador capilar ABI Prism 3700 da Perkin-Elmer.

Os resultados foram alinhados no programa Bioedit 7.0 e Cromas Pro, as sequências obtidas e a sequência consenso confrontadas com o Blastn e Blastx pelo endereço <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

RESULTADOS

1. Produção e purificação da toxina ST-L

1.1 Amostras bacterianas

Das 39 amostras de *E.coli* utilizadas para testes citotóxicos em Vero e HEp-2, todas apresentaram efeito e a amostra EC79 apresentou melhor recíproca de titulação em meio LB (4) após 24 horas de inoculação, sendo adotada para os experimentos posteriores.

1.2 Condições de cultivo

Para a produção da ST-L usou-se CAYE suplementado com 2,5% de NaCl a 37°C com agitação, pH 8,5 e 24 horas de cultivo. Estas condições apresentaram melhor condição para a produção de toxina, verificada em Vero e HEp-2, demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Cultivo da EC79 em diferentes meios de cultura

Meios de cultivo bacteriano	Titulação do efeito citotóxico*
Meio Mínimo	-
Meio Mínimo + Glicose	-
Meio Mínimo + Sais	-
Muller Hinton	2
TSB	2
TSB + 0,6% extrato de levedura	2
BHI	2
Meio LB	4
Meio LB + NaCl	2
Meio CAYE	4
Meio CAYE + NaCl	8
Meio CAYE + NaCl + Fe, Mn, Mg	4
Meio Mínimo segundo Staples <i>et al.</i> 1980	-

*O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou efeito citotóxico em cultura de células Vero e HEp-2.

1.3. Método para a concentração da ST-L

Conforme mostra a Tabela 3, utilizando diferentes frações precipitadas com sulfato de amônio do sobrenadante de cultura e ultrafiltração com membrana de 3kDa pode-se verificar a maior atividade citotóxica utilizando a fração correspondente a 80% de saturação e com ultrafiltração (após a precipitação).

Tabela 3 – Atividade citotóxica nas diferentes etapas de concentração

Fração selecionada	Título de citotoxicidade*
Sobrenadante de cultura	8
20% de saturação	2
40% de saturação	2
60% de saturação	2
80% de saturação	64
100% de saturação	2
Ultrafiltrado maior 3kDa	2
Ultrafiltrado menor 3kDa	64

*O título expresso é a recíproca da maior diluição que causou efeito citotóxico em cultura de células Vero e HEp-2.

1.4. Etapas cromatográficas para purificação da ST-L

1.4.1. Primeira etapa – cromatografia de exclusão molecular

O perfil cromatográfico da primeira etapa de purificação está representado na Figura 1. A fração com atividade biológica está presente no material coletado entre 23 e 24 mL de eluição na coluna Superdex Peptide HR 10/30. Esta fração apresentou atividade citotóxica em cultura de células Vero e HEp-2 e enterotóxica em teste de Dean. Leitura em 220 nm.

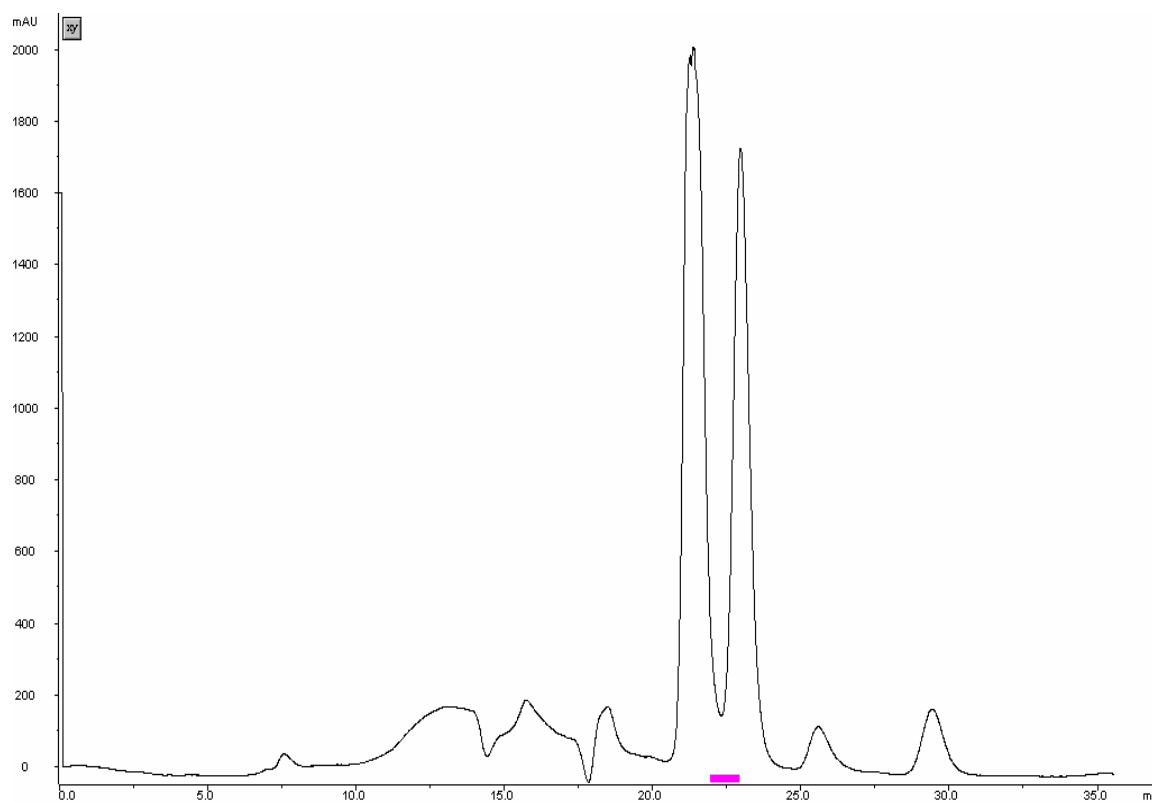


Figura 1 – Perfil cromatográfico em coluna Superdex Peptide utilizando o tampão acetato de amônio 0,1M pH 5,7 com fluxo 1mL/min. Fração entre 23 a 24 mL com atividade citotóxica e enterotóxica. Leitura 220nm.

■ Fração com atividade biológica

1.4.2. Segunda etapa – cromatografia de fase reversa

O perfil cromatográfico da segunda etapa de purificação está representado na Figura 2. A fração com atividade biológica está presente no material coletado com 77% do gradiente (aproximadamente 60% de acetonitrila) na coluna Sephasil Peptide C₁₈ 5μ ST 4.6/250. Esta fração apresentou atividade citotóxica em cultura de células Vero e HEp-2. Leitura em 280m.

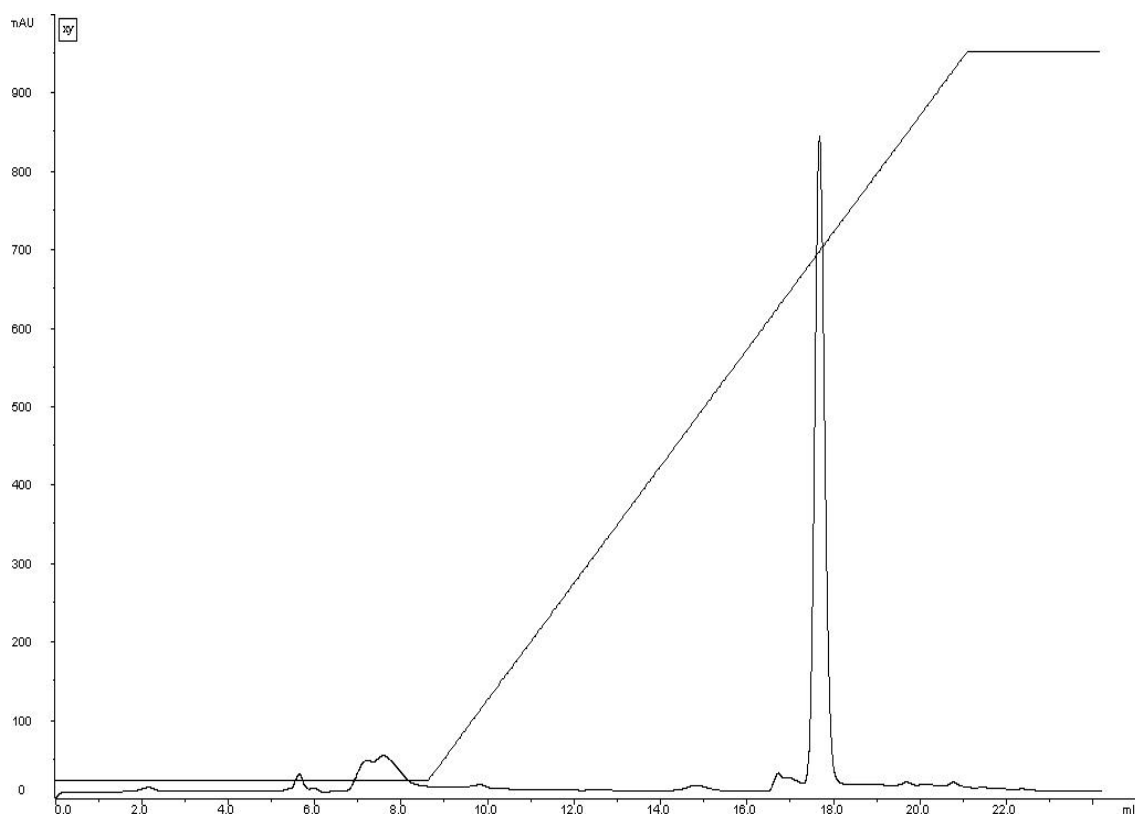


Figura 2 - Perfil cromatográfico em coluna Sephasil Peptide C₁₈ com tampão acetato de amônio 0,01M pH 5,7 e gradiente de 0 a 100% com acetonitrila 80% e fluxo de 2mL/min, demonstrando a fração com atividade citotóxica. Leitura 280nm.

— Fração com atividade biológica

1.5. Análises eletroforéticas

1.5.1. Eletroforese SDS-PAGE

Em cada etapa da purificação da proteína ST-L, foram realizados análises eletroforéticas pela metodologia de SDS-PAGE (15%) na presença ou não de uréia 6M, infelizmente este método não apresentou resultado considerável para visualização das bandas das proteínas presentes no material analisado.

1.5.2. Tricina SDS-PAGE

A metodologia proposta por Schägger e Jagow (1987) de um gel de Tricina SDS-PAGE (49,5%T3%C), também não foi eficiente, já que não foi possível visualizar no gel bandas do

material purificado.

1.5.3. Coloração dos géis

As colorações com Nitrato de prata e Comassie coloidal apresentaram baixa eficácia para a visualização do material analisado.

1.5.4. Análise em eletroforese 2D

A ST-L purificada pela análise eletroforética 2D mostrou apenas um spot, com ponto isoelétrico (pI) em 6,19 e massa em torno de 2kDa, conforme análise no programa ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare).

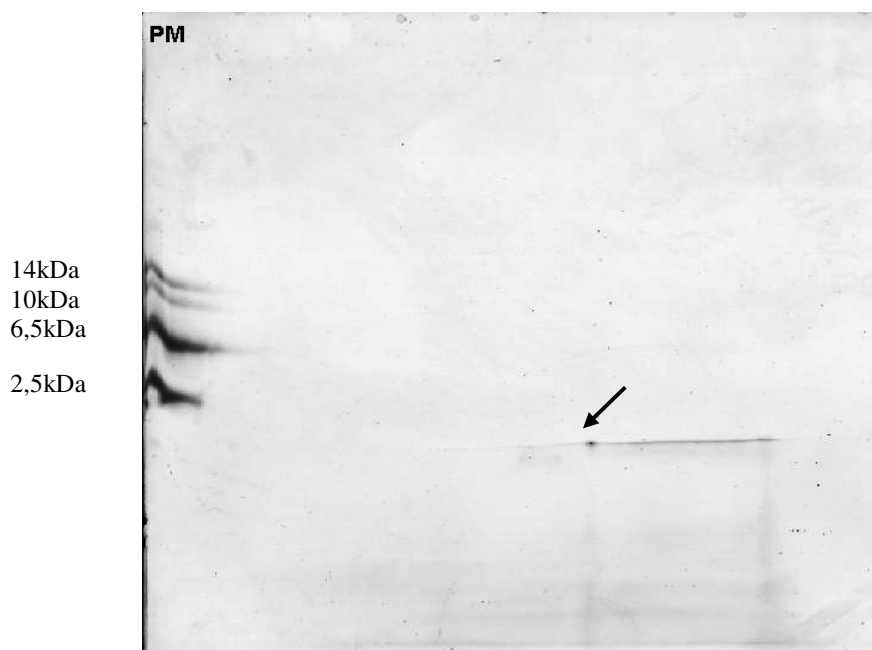


Figura 3 – Gel de eletroforese 2D apresentando apenas um spot (seta) e o padrão de peso molecular (PM).

2. Influencia de tratamentos físico-químicos sobre a atividade biológica da ST-L

2.1. Termoestabilidade

O material se mostrou termoestável a 65°C e 100°C (30 minutos), não ocorrendo uma

diminuição dos efeitos em culturas de células quando analisadas atividade citotóxica em células Vero e HEp-2. O mesmo resultado foi encontrado no material armazenado em baixas temperaturas (-70°C, -20°C e 4°C).

2.2. Efeito de proteases e pH na estabilidade da ST-L

A atividade citotóxica da ST-L não sofreu alteração pelas enzimas proteolíticas, tripsina, proteinase K e Ribonuclease A, assim como tratamento da toxina com vários pH's.

2.3. Tratamento com solventes orgânicos

Os solventes orgânicos tais como etanol, metanol e acetona não afetaram a atividade citotóxica da ST-L.

2.4. Atividade tóxica na presença de periodato de sódio

A ST-L tratada com periodato de sódio também não perdeu a atividade biológica em células.

2.5. Tratamento com agente redutor 2-mercaptoetanol

Quando examinada a atividade biológica da ST-L tratada com 2-mercaptoetanol verificamos a presença do efeito característico desta toxina.

3. Caracterização biológica

3.1. Detecção da atividade citotóxica

3.1.1. Teste de citotoxicidade em cultura de células

As análises microscópicas mostram na Figura 4 alterações morfológicas em células Vero, HEp-2, CaCo-2 e HT-29 tratadas com a toxina ST-L de *E.coli* que ocorrem no citoplasma, onde observa-se diminuição do volume citoplasmático que, aparentemente, leva à perda da junção entre as células, arredondamento celular e descolamento da monocamada. Verificado que as amostras produtoras de STp e STh se mostraram negativas para o teste.

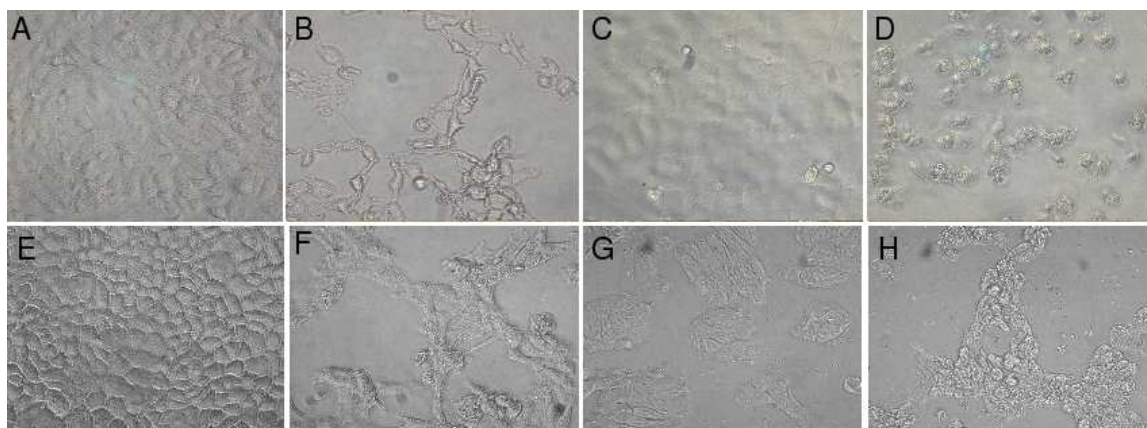


Figura 4 – Efeito citotóxico em culturas celulares Vero (B), HEp-2 (D), CaCo-2 (F) e HT-29 (H), após 24 horas de incubação com ST-L. Controles celulares Vero(A), HEp-2 (C), CaCo-2 (E) e HT-29 (G) sem a toxina ST-L. Aumento 200x.

3.1.2. Determinação da CD50

As células HEp-2 apresentaram 50% de morte celular com aproximadamente 17 μ g/mL da ST-L purificada em 18 horas de experimento, já para a linhagem Vero foram necessários 125 μ g/mL, como pode ser visualizado na Figura 5.

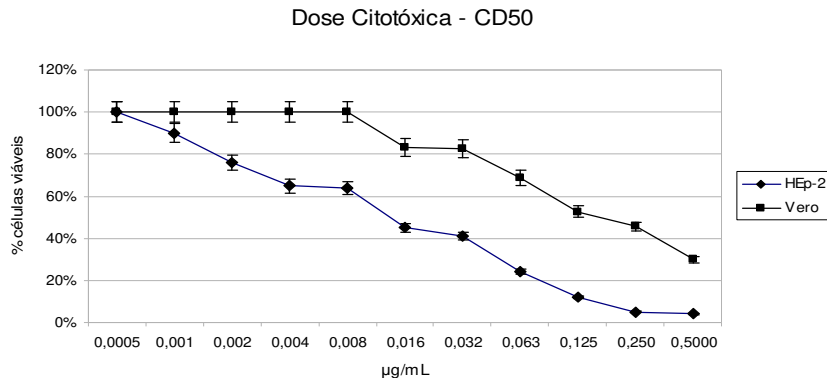


Figura 5 – Teste de CD₅₀ em cultura de células HEp-2 e Vero após 18 horas de inoculação com ST-L em diferentes concentrações. Os resultados mostram a porcentagem de células viáveis após o tratamento.

3.1.3. Estudo da incorporação do Vermelho Neutro

A Figura 6 mostra os resultados obtidos no teste de viabilidade celular que se apresentou comprometida a partir das primeiras horas de teste, principalmente na cultura de células HEp-2, restando aproximadamente 50% de células viáveis a partir de 9 horas de

incubação com a toxina, enquanto para a cultura de Vero a viabilidade diminuiu a 50% somente após 24h de ensaio. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

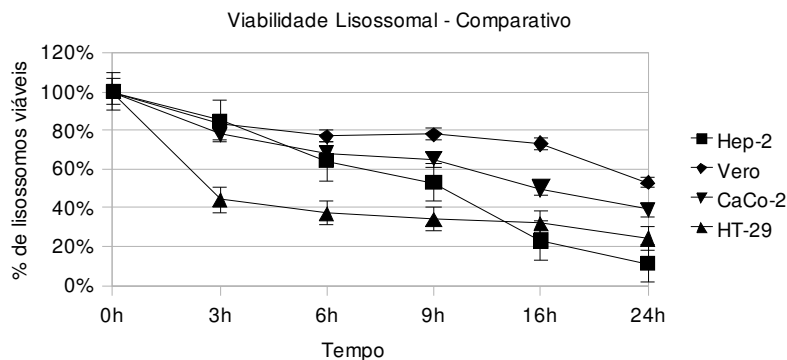


Figura 6 – Cinética da viabilidade lisossomal em HEp-2, Vero, CaCo-2 e HT-29 tratadas com a ST-L. A viabilidade foi expressa como o percentual de células sobreviventes à ação da citotoxina nos diferentes tempos pré-determinados.

3.1.4. Estudo da liberação de Lactato Desidrogenase (LDH)

As alterações na integridade das membranas celulares foram medidas pela liberação de LDH em células de culturas. Observamos na Figura 7 que houve injúria nas membranas celulares causada pela ST-L com aumento da liberação da lactato desidrogenase no meio nas quatro linhagens analisadas.

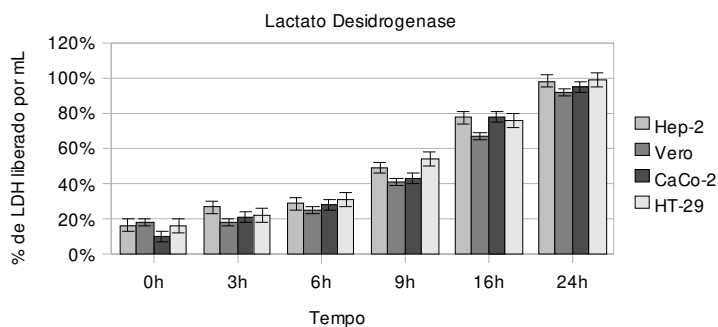


Figura 7 – Teste de verificação da integridade das membranas celulares. O resultado foi expresso como o percentual de LDH liberado por mL comparados com o controle positivo (Triton-X100).

3.1.5. Estudo da ação da ST-L na respiração mitocondrial

Quando a ST-L foi aplicada às células HEp-2 e CaCo-2 estas apresentaram perda de viabilidade mitocondrial, chegando, após 3 horas de ensaio, cerca de 50% de viabilidade. Vero e HT-29 após de 24 horas perderam 60% da viabilidade da população celular, como

visualizado na Figura 8.

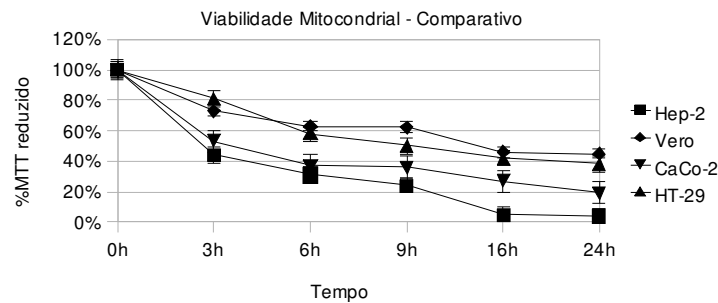


Figura 8 – Viabilidade mitocondrial de culturas celulares frente a toxina ST-L. A viabilidade foi expressa como o percentual de células sobreviventes à ação da citotoxina.

3.1.6. Estudo da ação da ST-L no crescimento celular

A atuação da ST-L no crescimento celular foi observada pela técnica de coloração com cristal violeta. Este ensaio demonstrou na Figura 9 que as diferentes culturas celulares analisadas tiveram uma grande diminuição do número de células em relação ao tempo de experimento quando tratadas com a toxina.

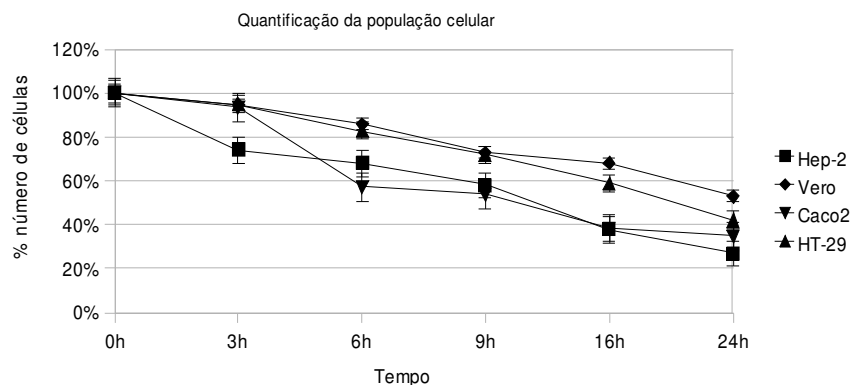


Figura 9 – Quantificação celular com diminuição em razão do tempo de incubação com a ST-L. A viabilidade foi expressa como o percentual de células sobreviventes à ação da citotoxina.

3.1.7. Coloração com azul de toluidina

Através deste ensaio foram observadas algumas das alterações causadas pelo efeito citotóxico. Verificamos que a toxina ST-L causou alterações morfológicas, observando intensa condensação nuclear em algumas células, perda das junções intercelulares, seguida do

descolamento da monocamada celular visualizada na Figura 10.

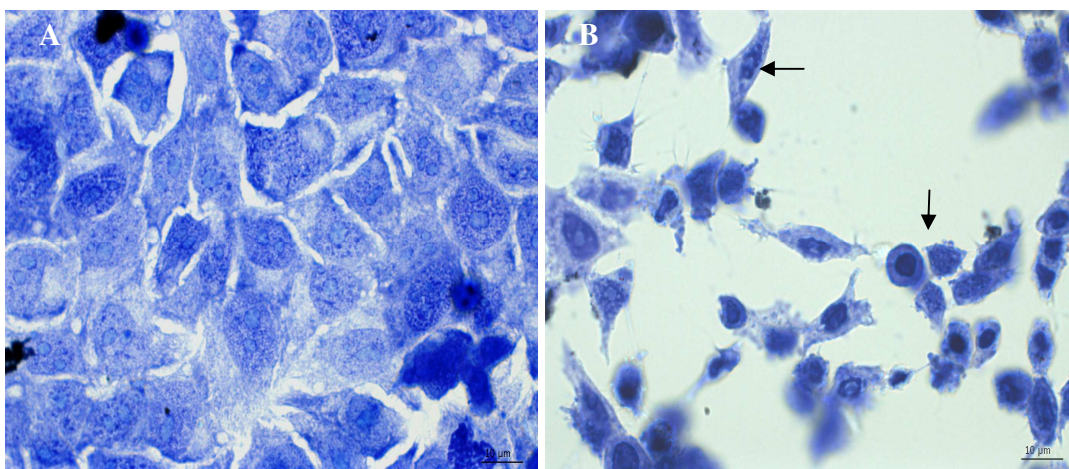


Figura 10 – Efeitos citotóxicos induzidos pela ST-L em cultura de células HEp-2 tratadas com a coloração de Azul de Toluidina. (A) controle: células HEp-2. (B) células após seis horas após o tratamento com ST-L. As setas apontam para a condensação nuclear e significativa diminuição do volume celular. Escala 10µm.

3.1.8. Coloração com Feulgen

Este ensaio demonstrou alterações na morfologia nuclear causadas pela ST-L e a formação de corpos apoptóticos após 6 horas de experimento verificado na figura 11.

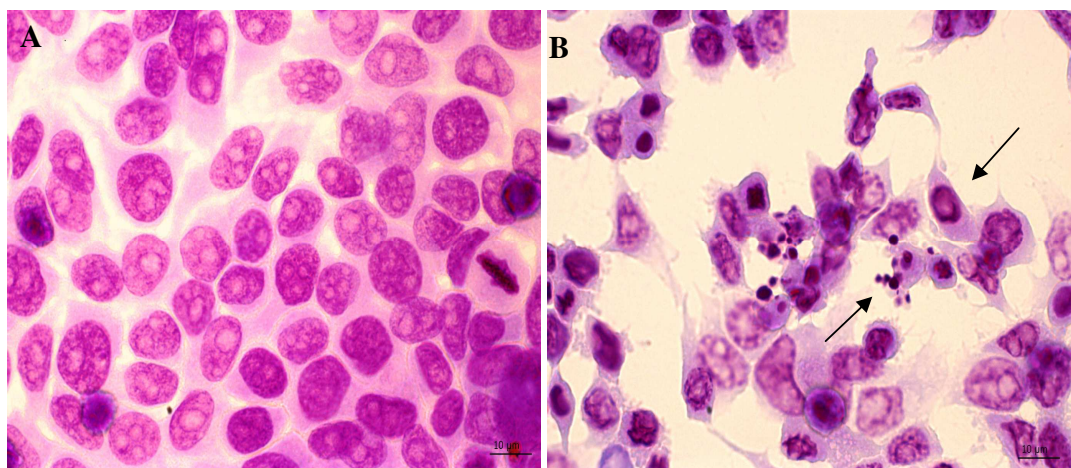


Figura 11 – Visualização da cultura de células HEp-2 com a coloração de Feulgen. (A) controle celular e (B) cultura de células HEp-2 com alterações nucleares causadas pela toxina ST-L. Seis horas após o tratamento, observa-se condensação da cromatina e fragmentação nuclear com formação de corpos apoptóticos e núcleos picnóticos (setas). Escala 10µm.

3.2. Detecção de atividades enterotóxicas da ST-L

3.2.1. Teste de Camundongos recém-nascidos

O teste foi realizado com o sobrenadante total, com a fração do sobrenadante menor que 3kDa (obtido por ultrafiltração), e com a ST-L purificada, aquecidos ou não por 30 minutos. Os três materiais testados ocasionaram acúmulo de fluídos superiores a 0,08, indicando atividade enterotóxica mesmo quando aquecidos.

3.2.2. Teste de alça ligada do intestino de coelhos

Os ensaios foram realizados com o sobrenadante, material menor que 3kDa (obtido por ultrafiltração) e ST-L purificada. Todos os materiais testados tiveram resultados negativos.

3.3. Detecção de atividade hemolítica

Os eritrócitos humanos e de cavalo não apresentaram hemólise após o tratamento com o sobrenadante de cultura e a ST-L, o que demonstra que a toxina não possui atividade hemolítica.

4. Caracterização molecular

4.1. Detecção do gene *est* através das técnicas da PCR

A fim de encontrar similaridade com a sequência já conhecida da toxina ST (Takeda *et al.*, 1979; Sekiaki *et al.*, 1985; Dallas *et al.*, 1990) e suas variantes *estA2* e *estA3*, buscamos na literatura primers já utilizados para a detecção pelo teste da PCR, onde obtivemos resultados positivos para alguns dos *primers* utilizados.

Tabela 4 - Resultados para a pesquisa do gene *est* com diferentes *primers*

Gene pesquisado	Origem	Amplificação pelo PCR
<i>est</i>	animais e humanos	+
<i>estA1</i>	Animais	-
<i>estA2</i>	Humanos	+
<i>estA3</i>	Humanos	+
<i>estB</i>	Animais	-
<i>ast</i>	EAEC	-

4.2. Extração plasmidial

Para verificar se o gene em estudo estava localizado no plasmídeo foi realizada uma extração de DNA plasmidial. A extração foi analisada em gel de agarose 0,8% com 80V por 2 horas, observada na Figura 12.

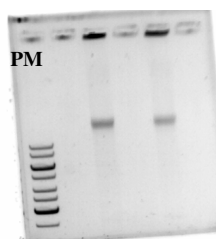


Figura 12 – Extração do plasmídeo da EC79, em gel de agarose (experimento feito em duplicata), PM padrão de peso molecular de 1kb.

4.3 Confirmação da presença do gene no plasmídeo - eletroeluição

Para a confirmação da presença do gene no plasmídeo em estudo a banda foi recortada do gel de agarose. O DNA resultante foi utilizado para a realização da reação de PCR com o primer *est* (Figura 13).

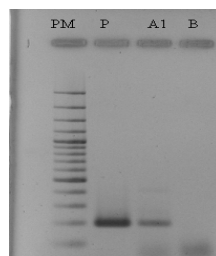


Figura 13 – Gel de agarose a 2% com as reações de PCR realizadas com o plasmídeo isolado por eletroeluição. (PM -peso molecular de 100pb, P – controle positivo para a PCR *E.coli* B41, A1 - EC79 e B - Branco) Amplificado com 200pb.

4.4 Cultivo bacteriano com antibióticos

A bactéria EC79 foi cultivada em meio LB sólido com antibióticos, separadamente e os resultados obtidos estão expressos na Tabela 5.

Tabela 5 – Resistência a antibióticos da amostra EC79

Antibiótico	Crescimento
Streptomicina	+
Ampicilina	+
Kanamicina	-
Tetraciclina	+

4.5 Sequenciamento gênico

Os resultados do sequenciamento dos amplicons oriundos da amostra deste estudo foram alinhados nos programas Bioedit 7.0 e Chromas Pro, obtendo-se desta forma uma sequência consenso, que foi confrontada com a base de dados Blastn e Blastx.

```
5'ATTTTGATTTATAATATTCGTGGACGACCGTGTTTCGGAGGTAGtATGAAAAAATCAAT
ATTATTTATTTTCTTTCTGTAATATCTTTTTCACCTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAGC
AGGGTCTTCAAAGAAAAAATTACACTAGAATCGAAAAAATGTAACATTGTAAAAAA
AATAATGAAAGTAGTCCTGAAAGCATGAATAGTAGCAATTACTGCTGTGAATTGTGTTG
TAATCCTGCTTGTAACGGGTGCTATTAATAATATAAAGGGAATAAACAGTTCCCTTTAT
ATTTGTGTGCGCCGTGGCTGGCGCTGTTCTTCACTGGTGGGAGGCTGAAGAACGACT
AAGAGGTGAAAGTCCTCCACACACCCGGGGAGGGGAAGTGTTAGCGGAAGGCAAGG
GGATCTACCCACGTAATAGGACCGGGGAAATTTCGGAA 3'
```

4.6. Blastn - alinhamento de nucleotídeos com seqüências de nucleotídeos

A seqüência gênica da amostra deste estudo apresentou alta identidade com as seqüências de nucleotídeos de *est* já descritas, principalmente com a seqüência da *estA2* (96%) descrita por Guzman-Veduzco & Kupersztoch (1989). A seguir é apresentado o alinhamento realizado no Blastn (banco de dados) com a seqüência de *estA2*:

```
>gi|145862|gb|M18345.1|ECOESTA2A E.coli estA2 gene encoding heat-stable enterotoxin A2 (STa2)
protein, complete cds
Length=549

Score = 531 bits (588), Expect = 1e-147
Identities = 431/446 (96%), Gaps = 6/446 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 ATTTTGATTTATAATATTCGTGGACGACCGTGTTTCGGAGGTAGTATGAAAAATCAATA 60
      |||
Sbjct 106 ATTTTGATTTA-AATATTCGTGGACGAC-GTGTTTCGGAGGTAAATATGAAAAATCAATA 163

Query 61 TTATTTATTTTCTTTCTGTAATATCTTTTCACCTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAGCA 120
      |||
Sbjct 164 TTATTTATTTTCTTTCTGTAATATCTTTTCACCTTTCGCTCAGGATGCTAAACCAGCA 223

Query 121 GGGTCTTCaaaagaaaaaattacactagaatcgaaaaaatgtaacattgtaaaaaaaT 180
      |||
Sbjct 224 GGGTCTTCAAAAGAAAAAATTACACTAGAATCGAAAAAATGTAACATTGTAAAAAAAAT 283

Query 181 AATGAAAGTAGTCCTGAAAGCATGAATAGTAGCAATTACTGCTGTGAATTGTGTGTAAT 240
      |||
Sbjct 284 AATGAAAGTAGTCCTGAAAGCATGAATAGTAGCAATTACTGCTGTGAATTGTGTGTAAT 343

Query 241 CCTGCTTGTACCGGGTGCTATTAATAATATAAAGGGAATAACAGTTCCTTTATATTT 300
      |||
Sbjct 344 CCTGCTTGTACCGGGTGCTATTAATAATATAAAGGGAATAACAGTTCCTTTATATTT 403

Query 301 GTGTGCGCCGTGGCTGGCGCTGTTCTTCACTGGTGGGAGGCTGAAGAACGACTAAGAGGT 360
      |||
Sbjct 404 GTGTGCGCCGTGGCTGGCGCTGTTCTTCACTGT-GGAGGCTGAAGAACGACTAAGAGGT 462

Query 361 GAAAGTCCTCCACACACCCGGGAGGGGAAGTGTAGCGGAAGGCAAGGGGAT-CTACCC 419
      |||
Sbjct 463 GAAAGTCCTCCACACACCCGGTGAGGGGAAGTGTAGCGGAAGGCAAGGTGATCCTACCC 522

Query 420 ACGTAATA-GGAC-CGGGGAAATTG 443
      |||
Sbjct 523 ACGTAATATGGACACAGGGGAATTG 548
```

Figura 14 – Resultado obtido no banco de dados do Blastn com a seqüência consenso obtida do sequenciamento do amplicons da amostra EC79. ID: F3ZCDYFS014

Outras seqüências também apresentaram identidade significativa com o nosso material no Blastn e foi realizado o alinhamento para a verificação da similaridade entre as seqüências.

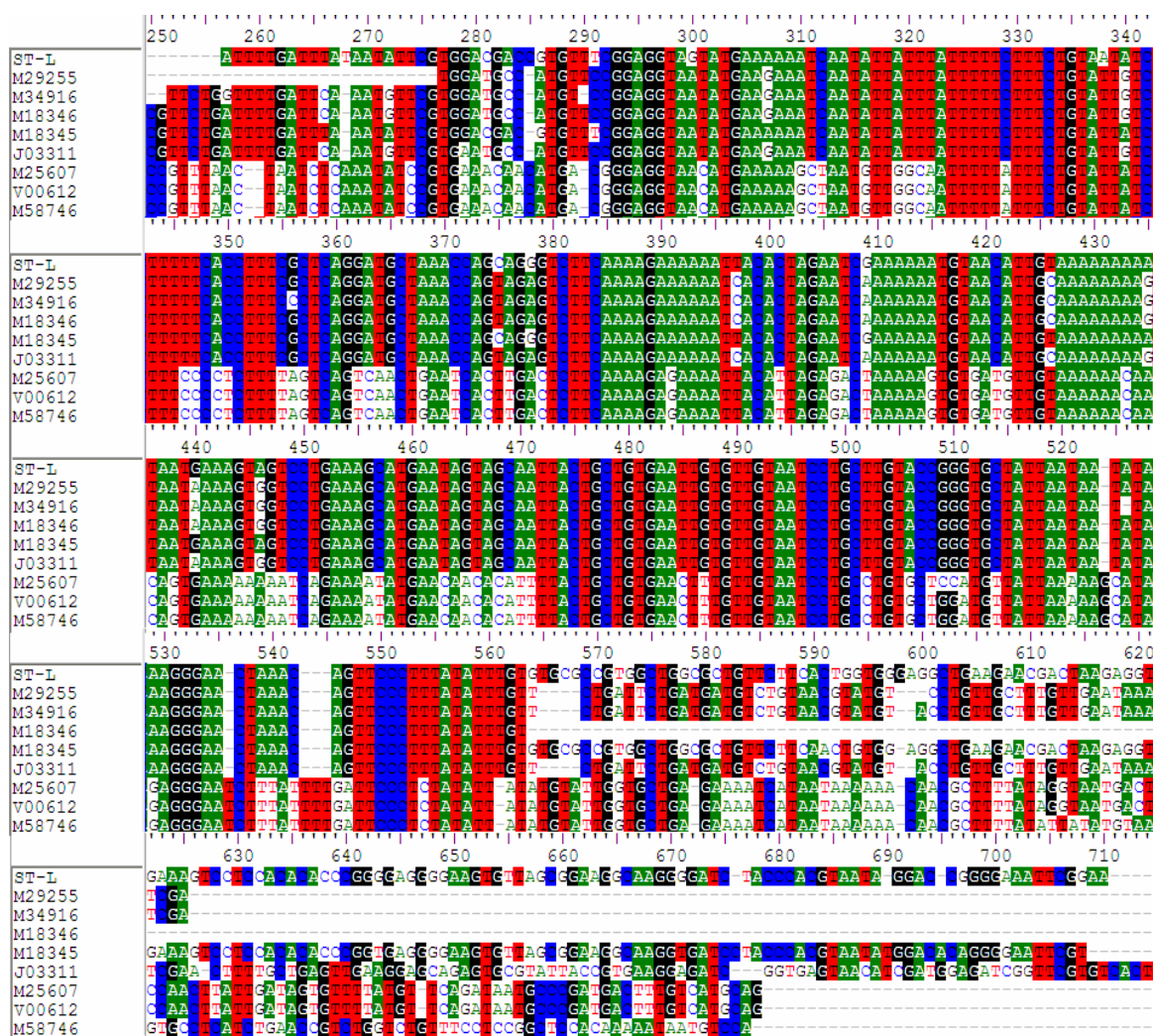


Figura 15 – Alinhamento das sequências depositadas no NCBI (ver tabela 6) para os segmentos gênicos referentes da proteína termooestável de *E.coli* (STa) com o consenso – ST-L gerado a partir do sequenciamento dos amplicons do PCR com o primers *est* e seqA-D para a EC79. Realizado no programa BioEdit 7.0.

Tabela 6 – Sequências utilizadas para o alinhamento com a sequência consenso da EC79

Nº acesso no NCBI	Gene	Tamanho da sequência (bp)	Isolado	Referência
M29255	<i>estA</i>	336	Humanos (Índia)	Dwarakanath, <i>et al.</i> , 1989
M34916	<i>estA</i>	360	Humanos (Bangladesh)	Moseley, <i>et. al.</i> , 1983
M18346	<i>estA3</i>	403	Humanos (Bangladesh)	Stieglitz, <i>et. al.</i> , 1988
M18345	<i>estA2</i>	549	Humanos (Bangladesh)	Guzman-Veduzco & Kupersztch, 1989
J03311	<i>estA4</i>	962	Humanos (México)	Rasheed, <i>et. al.</i> , 1988
M25607	<i>estA1</i>	658	Suínos, Bovinos e Aves	Sekizaki, <i>et. al.</i> , 1985
V00612	<i>estA1</i>	658	Suínos (EUA)	So & McCarthy, 1980
M58746	<i>estA</i>	667	Humanos (EUA)	Dallas, 1990

4.7. Blastx - alinhamento de nucleotídeos com seqüências protéicas

A sequência gênica da amostra deste estudo também apresentou alta identidade com as seqüências das proteínas ST já descritas, principalmente com a sequência da *estA2* (Guzman-Veduzco & Kupersztch, 1989) – 98%. Abaixo é apresentado a Figura 16 com o alinhamento realizado no Blastx com a sequência da toxina STa2:

```
>sp|Q47185.1|HST2 ECOLX RecName: Full=Heat-stable enterotoxin A2; Short=STA2; Flags:
Precursor
gb|AAA23729.1| heat-stable enterotoxin A2 precursor
emb|CAI30514.1| heat-stable toxin [Escherichia coli]
Length=72

Score = 122 bits (305), Expect = 2e-26
Identities = 71/72 (98%), Positives = 72/72 (100%), Gaps = 0/72 (0%)
Frame = +1

Query 46 MKKSILFIFLSVISFSPFAQDAKPAGSSKEKITLESKKCNIVKKknesspesmnsnYCC 225
          MKKSILFIFLSV+SFSPFAQDAKPAGSSKEKITLESKKCNIVKKkNESSPESMNSSNYCC
Sbjct 1  MKKSILFIFLSVLSFSPFAQDAKPAGSSKEKITLESKKCNIVKKkNESSPESMNSSNYCC 60

Query 226 ELCCNPACTGCT 261
          ELCCNPACTGCT
Sbjct 61  ELCCNPACTGCT 72
```

Figura 16 – Resultado obtido no banco de dados do Blastx com a sequência consenso obtida do sequenciamento do amplicon com o primer *est*. ID: F3ZHC3N701S

DISCUSSÃO

O estudo da enteropatogenicidade de *Escherichia coli* vem sendo realizado por vários pesquisadores no mundo, e muitos trabalhos como a revisão de Kaper & Nataro (2004) e de Turner *et al.*, (2005), demonstram que vários mecanismos de virulência diarreio gênicos desta bactéria têm sido esclarecidos.

Ribeiro (2006) estudando as propriedades de virulência diarreio gênicas em 97 amostras de *E. coli* isoladas de água de consumo da cidade de Ouro Preto, MG, observou, através de ensaios em camundongos recém-nascidos, que sobrenadantes das culturas de 40% das amostras continham uma enterotoxina que também apresentavam atividade citotóxica em células Vero. Essa toxina presente no sobrenadante de cultura era resistente ao aquecimento e ainda encontrava-se em frações menores que 10kDa, em ensaios utilizando ultrafiltração em membrana PM – 10 (Amicon, Millipore). No entanto, as amostras de *E. coli* produtoras dessas atividades biológicas não possuíam os genes para enterotoxinas termoestáveis (STa, STb e EAST1), assim como para as enterotoxinas termoestáveis de menor peso molecular conhecidas na literatura de *E. coli* associadas a diarreio gênese, descritas na revisão de Kaper & Nataro (2004).

Para o estudo da toxina foi necessária a reativação da produção da ST-L, já que as amostras não produziam mais a toxina. Para a reativação foram analisados vários estoques de todas as amostras utilizadas no trabalho anterior (Ribeiro, 2006) semeando-as em vários meios como meio mínimo, Miller Hinton, caldo triptona soja, caldo LB, caldo de infuso cérebro-coração e CAYE. Trabalhos anteriores como de Alderete & Robertson (1978); Fontes *et al.*, (1980); Iwanaga *et al.*, (1986) e Staples *et al.*, (1980), descrevem a necessidade de se recorrer a vários métodos de cultivo para aperfeiçoar o processo de produção de toxinas bacterianas.

No processo de recuperação da atividade biológica, fizemos uma suplementação do meio CAYE com várias concentrações de NaCl, na presença ou ausência de íons (Fe, Mn e Mg). O melhor resultado encontrado foi a retirada dos íons e a suplementação com 0,5% NaCl. Das 39 amostras cultivadas, apenas uma não apresentou efeito em cultura de células Vero após 48 horas de aplicação do sobrenadante aquecido a 100°C por 30 minutos, mostrando

que realmente o método é eficaz para a reativação a produção da ST-L. Entre estas, a amostra EC79 apresentou o maior título do efeito (1/8) com tempo de aplicação de 24 horas sendo adotada para a produção, purificação e testes da toxina.

Na literatura não foi encontrado relatos de uma enterotoxina termoestável (STa) com atividade citotóxica, em especial produzida por *E.coli*, a nossa intenção inicial foi a de purificar e caracterizar essa toxina. A princípio os processos adotados para a purificação da ST-L seguiram os protocolos de purificação de outras enterotoxinas termoestáveis conhecidas (Aimoto *et al.*, 1982; Alderete & Robertson, 1978; Takeda *et al.*, 1979; Okamoto, 1997). Para a purificação desta nova enterotoxina termoestável, que denominamos provisoriamente de enterotoxina termoestável-like (ST-L) utilizamos o fracionamento em sistema de ultrafiltração Amicon (Millipore), seguida de cromatografia em sistema HPLC.

Durante o processo de concentração do material para a purificação foi observado que o efeito citotóxico estava presente em várias frações da ultrafiltração. Uma das hipóteses sugeridas foi à formação de agregados, à medida que se aumenta a concentração do sobrenadante da cultura, dificultando sua passagem através das membranas. Segundo Creighton *et al.*, (1978) e Jaenicke, (1987) a restituição das proteínas se faz principalmente pela formação de agregados protéicos, que ocorrem principalmente pelas interações não covalentes intermoleculares e as intramoleculares que estabilizam a molécula. A agregação é significativamente dependente de concentração, sendo minimizada em baixas concentrações protéicas.

Por este motivo modificamos a forma de concentração do sobrenadante utilizando precipitação com sulfato de amônio. Este processo é amplamente utilizado para a obtenção de proteínas em grande escala para a purificação de várias toxinas e enzimas de diferentes espécies bacterianas, como uma forma simples de concentração destas do meio de cultura (Barnes *et al.*, 1997).

A precipitação com sulfato de amônio como único método para a concentração do sobrenadante da cultura bacteriana mostrou-se inviável, possivelmente pela toxina em estudo agrupar-se a outras proteínas produzidas pela bactéria. Entretanto, quando adotado após o mesmo, a ultrafiltração como uma segunda etapa para obtenção do material concentrado e utilizando o material não retido na membrana (3kDa) liofilizado para realizar as etapas

cromatográficas.

Muitos trabalhos evidenciaram vários métodos para uma efetiva purificação de toxinas produzidas por diferentes linhagens de *E.coli*, dentre eles Dubreuil *et al.*, (1991) (STb de isolados de suínos); Staples *et al.*, (1990) (STh de linhagem isolada de humanos); Saeed *et al.*, (1983) (STp de linhagens isoladas de bovinos); Savarino *et al.*, (1993) (que purificou a EAST 1 de *E.coli* agregativa); Takeda *et al.*, (1979) (ST de amostra intestinal de humanos).

Na tentativa de estabelecer um processo adequado de purificação para a ST-L, foram utilizadas várias colunas cromatográficas, como troca iônica (Mono S, Mono Q, DEAE, SP) que efetuam o processo de purificação de acordo com as diferentes cargas aniônicas e catiônicas das moléculas da amostra analisada e sua interação com a resina. A eluição ocorreria devido a competição pelos sítios ativos no gradiente com o tampão de maior força iônica. Também foram utilizadas colunas de interação hidrofóbica (Hiprep pheny high sub 16/10, Phenyl high sub, Phenyl high performance, Phenyl fast flow e Octyl fast flow) com diferentes grupos funcionais (phenyl, octyl) presentes na resina, e que interagem principalmente com moléculas que possuem caráter hidrofóbico, a eluição ocorre pela utilização de um tampão com alta concentração de sais para a solubilização do composto. Todas as técnicas experimentadas são amplamente utilizadas e bem descritas (Collins, 2006, Janson & Ryden 1998). No entanto não apresentaram resultados satisfatórios (dados não apresentados). Em todos os casos citados acima o cromatograma apresentou um resultado semelhante, com apenas um pico cromatográfico eluído antes do gradiente, o que sugere que a molécula estudada não interagiu com nenhuma das resinas utilizadas. O fato poderia ser explicado pela pequena massa molecular do composto, que apresentaria cargas insuficientes para interação com as colunas utilizadas.

Baseados em estudos anteriormente realizados por Azzoni *et al.*, (2002) e no trabalho realizado em nosso laboratório por Martins, *et al.*, (2007); utilizamos a coluna de afinidade com íon metálico imobilizado – IMAC (Qiagen), tendo como ligante à matriz íon cúprico, que tem afinidade pela cauda imidazólica de histidinas e cisteínas expostas. Tendo por base este princípio, aplicamos a toxina ST-L na coluna IMAC e observamos dois picos cromatográficos, um inicial e maior, antes do início do gradiente, representando o material sem afinidade com o cobre, o qual não apresentou atividade biológica quando aplicado em células Vero e HEp-2, e

um segundo pico menor, obtido dentro do gradiente, que apresentou atividade na cultura de células. Infelizmente, observamos que a interação da proteína com o cobre era extremamente difícil de ser desfeita, o que impossibilitou a continuidade da utilização desta coluna para o processo de purificação da ST-L (dados não demonstrados).

Em colunas de exclusão molecular (Sephadex G-75, HipPrep Sephacryl S-100, Superdex Peptide – GE) o resultado também não foi satisfatório, possivelmente pelo fato da toxina em estudo apresentar facilidade de agregação, não havendo separação efetiva. Na tentativa de separar estes prováveis agregados protéicos usou-se um agente redutor, o 2-mercaptoetanol, composto largamente empregado para descomplexar proteínas, agindo em pontes dissulfeto, formadas entre dois resíduos de cisteína. Saeed *et al.*, (1983) relatam que o tratamento de proteínas com 100mM de 2-mercaptoetanol a 37°C por 1 hora causa a inativação das cistinas. Dreyfus *et al.*, (1983) descreve a utilização de fase móvel com 10mM de Tris-HCl e cloreto de sódio 200mM (pH 7,5) em coluna de gel filtração (Bio-Gel P-6) para prevenir agregação da STa consigo mesma e com outros polipeptídeos. Desta forma o perfil cromatográfico apresentou uma separação dos compostos do material bruto (menor que 3kDa). Foi realizada uma segunda etapa cromatográfica em fase reversa para efetivar a purificação da proteína, sendo que a metodologia usada foi uma adaptação do método empregado por Aimoto *et al.*, (1982) para a purificação da toxina termoestável isolada de humanos. Este processo apresentou resultado satisfatório, visualizado pelo perfil cromatográfico da coluna Sephasil Peptide C₁₈, onde a toxina foi eluída com um pico cromatográfico no gradiente com acetonitrila (77%). Este material apresentou atividade citotóxica após a sua aplicação em cultura de células.

A capacidade da toxina ST-L se desagregar e apresentar um novo perfil em coluna de exclusão molecular reforça a semelhança desta com as toxinas termoestáveis, relatadas na revisão de Hasegawa & Shimonishi (2005), que apresentam resíduos de cisteína em uma região conservada entre diferentes toxinas termoestáveis conhecidas.

Na tentativa da visualização da pureza do material obtido no pico cromatográfico das colunas das duas etapas cromatográficas, foram utilizadas análises eletroforéticas (SDS-PAGE e Tricina SDS-PAGE), ambos com alta concentração de acrilamida, com a utilização ou não de uréia e cloreto de sódio na amostra. E a coloração com prata, pois este é um método sensível

que detecta proteínas em baixa concentração. Infelizmente não foi possível a visualização de banda protéica no tamanho esperado para a ST-L; mesmo com uma concentração de prata cinco vezes maior (1%) conforme descrito por Dubreuil *et al.*, (1991), que também trabalhavam com uma toxina de baixo peso molecular. Uma explicação para o fato seria a pequena concentração de proteínas, insuficiente para sua observação no gel, ou que esta não conseguiu entrar na malha do gel pela sua alta facilidade agregativa em solução. Na tentativa de visualizar a toxina purificada na eletroforese, foi realizado a carboximetilação e alquilação para evitar a formação dos possíveis agregados ou ainda a resistência da toxina aos corantes utilizados, o que já foi reportado por Alderete & Robertson (1978), que também avaliavam uma toxina termoestável de *E.coli*. Felizmente conseguimos obter, embora em pequena quantidade, uma ST-L eletroforeticamente com alto grau de pureza, comprovada quando analisada em eletroforese 2D, onde verificamos a presença de um único “spot” de proteína.

A ST-L purificada apresentou ponto isoelétrico (pI) de 6.19 e massa em torno de 2kDa. Dreyfus *et al.*, (1983) estudaram as propriedades físico-químicas da enterotoxina termoestável produzida por *E. coli*, isoladas de diferentes origens e observaram que os pIs das STs variavam somente entre 3,88 a 4,08. Nossos dados sugerem mais uma vez que a ST-L difere em estrutura química de outras enterotoxinas termoestáveis (STs) conhecidas.

Para a quantificação da concentração da ST-L, seguiu-se a metodologia de Bradford (1976). A obter melhores resultados na realização da curva padrão, foi necessário utilizar um peptídeo de baixo peso molecular, a insulina, que apresenta um peso de aproximadamente 6kDa ao invés da comparação com a curva padrão de albumina bovina (BSA), mais comumente utilizada. Não foram encontrados resultados quantitativos de toxina (dados não apresentados), possivelmente porque a ST-L possui baixo peso molecular o que inviabilizou a comparação com a curva de BSA.

A exposição das enterotoxinas de *E. coli* (Dubreuil *et al.*, 1991), *K. pneumoniae* (Klipstein & Engert, 1976), e *E. cloacae* (Klipstein & Engert, 1976) a temperaturas de 100°C por 30 minutos não inibe sua atividade biológica. Quando a toxina ST-L foi aquecida a 60 ou 100°C por 30 minutos, também foi observada termoestabilidade similar. As toxinas termolábeis (LT) de *E. coli* são sensíveis ao tratamento com ácidos (Mitchell *et al.*, 1974), porém a STb de *E. coli* é resistente a pH ácidos, e não a pH alcalinos (Dubreuil, 1999). Nossos

resultados mostraram que a toxina ST-L de *E.coli* é estável em pH ácido e em pH neutro-alcalino assim como após tratamento com agente redutor. A atividade biológica da STb de ETEC é sensível ao tratamento com tripsina (Fujii *et al.*, 1991), assim como a citotoxina de *E. cloacae* descrita por Barnes *et al.*, (1997). Entretanto, nenhuma das enzimas proteolíticas testadas inibiu a atividade biológica da ST-L, sugerindo que o peptídeo não possua os sítios de clivagem para as enzimas testadas ou porque as enzimas testadas se tratavam de endopeptidases e assim como nas STas já descritas, a estabilidade da molécula impediu a atividade destas enzimas.

A atividade citotóxica também não foi alterada após tratamento com solventes orgânicos, como o metanol e acetona além de solúvel nestes compostos, o que demonstra mais uma vez a similaridade com as STas. Alderete & Robertson (1979) descreveram que a solubilidade em acetona sugere caráter hidrofóbico da molécula de ST.

A oxidação por periodato de sódio é amplamente utilizada para a determinação de carboidratos (Alderete & Robertson, 1978; Bhuiyan *et al.*, 1995). Quando a ST-L foi submetida ao tratamento com esse agente, verificou-se que não houve alteração na atividade citotóxica, o que sugere que a molécula não seja composta por açúcares, assim como a STa isolada por Alderete & Robertson (1978).

As atividades citotóxicas da ST-L foram avaliadas em diferentes células para verificar se a toxina atua em linhagens celulares de diferentes origens. Em células Vero, começamos a visualizar o efeito, em microscópio invertido, após aproximadamente 6 horas da aplicação da toxina; em outras linhagens como HEp-2, CaCo-2 e HT-29 os efeitos iniciaram-se após 4 horas de incubação com a toxina, apresentando seus efeitos citotóxicos até 24 horas após, como pode ser visualizado na figura 4. Outras linhagem como CHO, HeLa, NCI, FEG, MDK também apresentaram efeitos citotóxicos com a toxina ST-L em até 24 horas (dados não apresentados).

Demonstrada a suscetibilidade de várias linhagens celulares a ST-L, utilizamos as linhagens Vero, HEp-2 e duas linhagens intestinais: CaCo-2 e HT-29 para a realização dos testes de viabilidade, objetivando a confirmação e a caracterização do efeito induzido pela toxina estudada. Testes de viabilidade celular realizados como o corante supra vital Vermelho Neutro em culturas de células mostraram o comprometimento celular provocado pela toxina,

com uma queda significativa das células viáveis a partir de poucas horas após a inoculação da ST-L, principalmente nas células HEp-2, enquanto que as células Vero precisam de concentrações maiores da ST-L para atingir a mesma porcentagem de sobrevivência celular, resultado demonstrado na figuras 5 e 6.

Foi empregado o teste da lactato desidrogenase, figura 7, o qual demonstra a presença desta enzima no meio extracelular, indicando a presença de danos ocorridos nas membranas celulares eucarióticas e o teste de MTT, figura 8, o qual verifica a integridade mitocondrial. Através destas análises foi observada uma queda significativa das células viáveis quando comparadas com as células controle. O teste de liberação de LDH realizado com células HEp-2 demonstrou a capacidade da toxina ST-L de *E.coli* em lisar as membrana. destas células *in vitro*. O comprometimento das mitocôndrias, o que levaria a um estresse oxidativo gerado pela produção de radicais negativos dentro da célula, foi demonstrado pelo teste de MTT, revelando que a toxina purificada causou a perda da funcionalidade e da atividade mitocondrial. Os testes de coloração diferencial demonstraram, nas figuras 10 e 11, uma expressiva modificação morfológica celular e nuclear causada pela ST-L sobre as células de cultura. Estes ensaios confirmam a perda de viabilidade das culturas celulares após a aplicação da toxina, apresentando efeito citotóxico, fato ainda não descrito para nenhuma outra toxina STa descrita para *E.coli*.

Para a confirmação e comparação com outras enterotoxinas conhecidas, foi efetuado teste de PCR com *primers* específicos para ST, STa, STb, STh, STp, diferentes dos usados no trabalho anterior por Ribeiro (2006). Sabendo que as toxinas termoestáveis apresentam similaridade nas seqüências de aminoácidos, e para escolha dos primers, foi realizado o alinhamento destes com o gene completo de *est* (M25607) para que estes apresentassem pontos distintos de anelamento em toda extensão do gene; para isto foi utilizado o programa ClustalW e BioEdit (dados não apresentados) dando preferência para a região gênica que sintetiza a molécula madura de ST, que apresenta uma região conservada com a presença de resíduos de cisteína que formam posteriormente pontes dissulfeto que oferecem a estabilidade necessária para a molécula (Creighton, 1978; Jaenicke, 1987), e que também é a região receptora no sitio de ação da toxina no hospedeiro. Os resultados do PCR foram confirmados pelo sequenciamento gênico, e a seqüência obtida da amplificação com a amostra em estudo

apresentou alta identidade (96%) com as sequências já conhecidas de ST, em especial STa2, toxina isolada de humanos por Aimoto *et al.*, (1982). Confirmamos também que assim como o gene *estA* o gene codificante da toxina ST-L está presente no plasmídeo da bactéria, e apresenta genes de resistência a antibióticos (ampicilina, streptomina e tetraciclina) fato também encontrado nas toxinas termoestáveis de *E.coli* (Harnett & Gyles, 1985; Echeverria *et al.*, 1985). Mas não foi possível determinar apenas pelo sequenciamento a região gênica que apresenta a atividade citotóxica para a ST-L.

Os ensaios biológicos de alça ligada em coelhos demonstraram resultados negativos para acúmulo de fluídos e efeitos histológicos e em microscopia eletrônica de varredura (dados não mostrados) com a ST-L em 18 horas de inoculação. Este teste foi realizado conforme protocolo utilizado por Blanco & Blanco (1993) e por Moon *et al.*, (1971) que descreve que as vilosidades se apresentavam indiferenciadas e sem efeito comparadas com os controles com tampão fosfato. Entretanto, Kamaras e Murrell em 2001, que realizaram ensaios com STa em tempos inferiores de inoculação (de 2 a 6 horas), revelaram que os enterócitos do duodeno e jejuno em apenas 2 horas e no íleo, após 4 horas, apresentaram algum dano nas extremidades das vilosidades intestinais. Provavelmente a ST-L também tenha a necessidade de ensaio com menor tempo de incubação com a toxina para demonstrar resultados positivos. Takeda *et al.*, (1979) realizaram testes de alça ligada de ratos, demonstrando que a STa apresenta acúmulo de líquidos em 3 horas de ensaio e ocorre decréscimo do acúmulo após 5 horas de ensaio.

Assim, os resultados demonstram que a toxina em estudo apresenta algumas regiões de similaridade com as STs já conhecidas, principalmente com a STa2, o que é confirmado nos testes de atividade *in vivo*, pois a ST-L é positiva nos testes em camundongos recém-nascidos em três horas, assim como a STa. Além disso, a massa molecular em torno de 2kDa e seu pI sugerem que esta enterotoxina deva ser diferente das descritas, e, ainda, podemos ressaltar que as três formas de enterotoxinas termoestáveis, produzidas por *E. coli* diarreio gênicas não têm atividade citotóxica, assim como a apresentada pela ST-L descrita neste estudo.

Portanto é de grande importância uma análise estrutural deste peptídeo para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nas atividades biológicas apresentadas por esta toxina: enterotoxicidade e citotoxicidade.

CONCLUSÃO

A toxina ST-L produzida por *Escherichia coli* isoladas de água de consumo apresenta atividade enterotóxica, por teste de camundongos recém nascidos, porém sem atividade em ensaio de alça ligada de intestino de coelhos em 18 horas;

A toxina ST-L termoestável é também resistente a diferentes pHs, a tratamento a diferentes enzimas proteolíticas, periodato de sódio e também resistente e solúvel em solventes orgânicos;

A ST-L purificada pela eletroforese em 2D mostrou ser uma toxina de peso molecular de aproximadamente 2kDa e com pI de 6,19;

Quanto aos efeitos citotóxicos, verificamos que a toxina causou lesão na membrana celular, comprometimento mitocondrial, diminuição da quantidade de células e perda de viabilidade lisossomal, bem como alterações morfológicas e nucleares visualizadas por testes colorimétricos;

Estudos moleculares mostraram sua semelhança com a região conservada entre as toxinas termoestáveis, no entanto não foi possível pelos estudos moleculares determinar a região ativa para atividade citotóxica na molecular da ST-L;

A ST-L é uma enterotoxina com atividade citotóxica que difere das enterotoxinas termoestáveis descritas até o momento, sendo um possível fator de virulência para *Escherichia coli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aimoto, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Hara, S., Takeda, T., Takeda, Y., Miwatani, T. Amino-acid sequence of a Heat-Stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Eur J Biochem – FEBS**. 129: 257-263. 1982.
- Alderete, J. F. and Robertson, D. C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 19: 1011-1020, 1978.
- Al-Majali, A.M., Robinson, J.P., Asem, E., Lamar, C., Freeman, M.J. and Saeed, A.M. (1999) Use of flow cytometry to measure the interaction between *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) and its intestinal receptor in mice. **J. Immunol. Methods** 222, 65-72, 1999.
- Al-Majali, A.M.; Asem, E.K.; Lamar, C.H.; Robinson, P.; Freeman, M.J.; Saeed, A.M. Characterization of the interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn calves. **FEMS Imm Med Microb** 28: 97-104, 2000.
- Al-Majali, A.M., Ababneh, M.M., Shorman, M., Saeed, A.M. Interaction of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) with its putative receptor on the intestinal tract of newborn kids. **FEMS Immunol Med Microbiol** 49: 35–40. 2007.
- Arita, M.; Honda, T.; Miwatani, T.; Takeda, T.; Takao, T.; Shimonishi, Y. Purification and characterization of a heat-stable enterotoxin of *Vibrio mimicus*. **FEMS Microbiol Letters** 79: 105–10, 1991.
- Azzoni, A.R., Kusnadi, A.R., Miranda, E.A. and Nikolov, Z.L., Recombinant aprotinin produced in transgenic corn seed: extraction and purification studies, **Biotechnol. Bioeng.**, 80: 268-276, 2002.
- Barnes, A.I. Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. **Can J Microbiol.** 43 :729-733, 1997.
- Benjelloun-Touimi, Z.; Sansonetti, P.J.; Parsot, C. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. **Mol Microbiol** 17: 123–135, 1995.
- Benjelloun-Touimi, Z.; Si Tahar, M.; Montecucco, C.; Sansonetti, P.J.; Parsot, C. SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. **Microbiology** 144: 1815–1822, 1998.

- Berberov, E.M.; Zhou, Y.; Francis, D.H.; Scott, M.A.; Kachman, S.D.; Moxley, R.A. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. **Infect Immun.** 72: 3914–3924, 2004.
- Bhadki, S. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. **Infect Immun.** 52: 63-69, 1986.
- Bhattacharya, J. & Chakrabarti, M.K. Rise of intracellular free calcium levels with activation of inositol triphosphate in a human colonic carcinoma cell line (COLO 205) by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Biochim Biophys Acta.** 1403: 1–4, 1998.
- Blanco, J.; Gonzalez, E.A.; Garcia, S.; Blanco, M.; Reguerio, B.; Bernardez, I. Production of toxin by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-Western Spain). **Vet Microbiol** 18: 297–311 1988
- Blanco, J.; Blanco, M. *Escherichia coli* enterotoxigênicos y verotoxigênicos de origen humano y bovino. In Patogêneses, epidemiologia y diagnóstico microbiológico. Ed. Servicio de Publicaciones Diputación Provincial, Lugo, Espanha, 1993. p.117.
- Bölin, I., Wiklund, F., Qadri, F., Torres O., Bourgeios, A. L., Savarino, S., Svennerholm A. Enterotoxigenic *Escherichia coli* with Sth and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. **J. Clin. Microbiol.** 44:3872-3877, 2006.
- Borenfreud, E. and Puerner, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. **J.Tis. Cult.Meth.** 9:7-9, 1984.
- Borenfreud, E.; Babich, H.; Martin-Alguacil, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays – the Neutral Red (NR) and Tetrazolium MTT tests. **Toxic in vitro.** 2(1):1-6, 1988.
- Bhuiyan, S.H.; Rahman, H.; Haider, K. Study of hemagglutinating property of enteroinvasive *Escherichia coli* from various geographical locations. **JPN J Med Sci Biol.** 48: 193-198, 1995.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. and Hacker, J. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. **Infect. Immun.** 62: 606-614, 1994.
- Bradford, M.M. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72: 248-254, 1976.

- Butler, D.G. & Clarke, R.C. Diarrhea and dysentery in calves. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans (Gyles CL,ed), pp. 91–116. CAB International, Walingford, UK, 1994.
- Cohen, M.B., Guarino, A., Shukla, R. and Giannella, R.A. Age-related differences in receptors for the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the small and large intestine of children. **Gastroenterology** 94: 367-373, 1988.
- Collins, C. Fundamentos de cromatografia. Editora Unicamp. ISBN 8526807048. 456 páginas, 2006.
- Cravioto, A.; Tello, A.; Navarro, A.; Ruiz, J.; Villafan, H.; Urbe, F.; Eslava, C. Association of *Escherichia coli* HEP-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. **Lancet**. 337: 262-264, 1991.
- Creighton, T. Experimental studies of protein folding and unfolding. **Prog Bioph Mol Biol**. 33: 231-297, 1978.
- Dallas, W.S. The Heat-Stable toxin I gene from *Escherichia coli* 18D. **J Bacteriol**. 172:9, 5490-5493. 1990.
- Dean, A. G., Ching, Y., Willians, R. G. and Harden, L. B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.** 125: 4007-4011, 1972.
- Dreyfus, L. A., Frantz, J. C. and Robertson, D. C. Chemical properties of heat-stable enterotoxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of different host origins. **Infect. Immun.** 42: 539-548, 1983.
- Dubreuil, J.D.; Fairbrother, J.M.; Lallier, R.; Larifiere, S. Production and purification of heat-stable enterotoxin b from a porcine *Escherichia coli* strain. **Infect Immun.** 59: 198–203, 1991.
- Dubreuil, J.D. *Escherichia coli* STb enterotoxin. **Microbiology**. 143: 1783–1795, 1997.
- Dubreuil, J.D. *Escherichia coli* STb toxin and prostaglandin production. **Microbiology** 145: 1507–1508, 1999.
- Echeverria, P., Seriwatana, J., Tylor, D.N., Tyrapat, C. and Rowe, B. *Escherichia coli* contains plasmids coding for heat-stable, other enterotoxins and antibiotic resistance. **Infect. Immun.** 48: 843-846, 1985.

- Fekete, P.Z.; Schneider, G.; Olask, F.; Blum-Oehler, G.; Hacker, J.H.; Nagy, B. Detection of a plasmid-encoded pathogenicity island in F18 enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli* from weaned pigs. **Int. J. Med. Microb.** 293: 287-298, 2003.
- Field, M., Graf, L. H. Jr., Laird, W. J., Smith, P. L. Heatstable enterotoxin of *Escherichia coli*: In vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75:2800–2804, 1978.
- Field, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **Journal of Clinical Investigation.**, 111:931-943, 2003.
- Fontes, C.F.; Ricci, L.C.; Oliveira, M.S.; Gatti, M.S.V. ;Castro, A.F.P. Evaluation of a defined medium for the production of both thermolabile (LT) and thermostable (ST) enterotoxins of *Escherichia coli*. **Med Microb Imm**, 171: 43-51, 1982.
- Fujii, Y. Purification and characterization of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **J Bacteriol.**173: 5516-5522, 1991.
- Fujii Y, Nomura T, Yamanaka H & Okamoto K. Involvement of Ca(21)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **Microbiol Immunol.** 41: 633–636, 1997.
- Fukuta, S.; Magnani, J.L.; Twiddy, E.M.; Holmes, R.K.; Ginsburg, V. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. **Infect Immun.** 56: 1748–1753, 1988.
- Ganguly, U.; Chaudhury, A.G.; Basu A.; Sen, P.C. STa-induced translocation of protein kinase C from cytosol to membrane in rat enterocytes. **FEMS Microbiol Lett.** 204: 65–69, 2001.
- Giannella RA. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins, guanylin, and their receptors: what are they and what do they do? **J Lab Clin Med.** 125(2):173–181, 1995.
- Guarino, A.; Capano, G.; Malamisura, B.; Alessio, M.; Guandalini, S.; Rubino, A. Production of *Escherichia coli* STa-like heat-stable enterotoxin by *Citrobacter freundii* isolated from humans. **J Clin Microbiol.** 25: 110–4, 1987.
- Guerrant, R. L., Hughes, J. M., Chang, B., Robertson, D. C., Murad, F. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. **J. Infect. Dis.** 142:220–228, 1980.
- Gupta, D.D.; Saha, S.; Chakrabarti, M.K. Involvement of protein kinase C in the mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) in a human colonic carcinoma cell line, COLO-205. **Toxicol Appl Pharmacol.** 206: 9–16, 2005.

- Guzman-Verduzco, L. and Kupersztoch Y. Rectification of two *Escherichia coli* Heat-Stable enterotoxin allele sequences and lack of biological effect of changing the carboxy-terminal tyrosine to histidine. **Infect Immun.** 57: 645-648. 1989.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. and Tschape, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Mol. Microbiol.** 23: 1089-1097, 1997.
- Hammermueller, J., Kruth, S., Prescott, J., Gyles C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Can J Vet Res**, 59: 265-270. 1995.
- Harnett, N. M. and Gyle, C. L. Enterotoxin plasmids in bovine and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* of O groups 9, 20, 64, and 101. **Can J Comp Med.** 49: 79-87. 1985.
- Hasegawa, M. and Shimonishi Y. Recognition and signal transduction mechanism of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and its receptor, guanylate cyclase C. **J Peptide Res.** 65:261–271, 2005.
- Harville, B.A. & Dreyfus, L.A. Involvement of 5-hydroxytryptamine and prostaglandin E2 in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B. **Infect Immun.** 63: 745–750, 1995.
- Henderson, I.R.; Navarro-Garcia, F.; Desvaux, M.; Fernandez, R.C.; Ala'Aldeen, D. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. **Microbiol Mol Biol Rev.** 68: 692–744, 2004.
- Hitotsubashi, S.; Fujii, Y.; Yamanaka, H.; Okamoto, K. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **Infect Immun** 60: 4468–4474, 1992.
- Horstman, A.L.; Kuehn, M.J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. **J Biol Chem.** 275: 12489–12496, 2000.
- Horstman, A.L.; Bauman, S.J.; Kuehn, M.J. Lipopolysaccharide 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid (Kdo) core determines bacterial association of secreted toxins. **J Biol Chem** 279: 8070–8075, 2004.
- Huang, D.B.; Mohamed, J.; Nataro, J.P.; DuPont, H.L.; Jiang, Z.; Okhuysen, P.C. Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. **J Med Microbiol.** 56: 1386-1392, 2007.
- Iwanaga, M.; Yamamoto, K.; Higa, N.; Ichinose, Y.; Nakasone, N.; Tanabe, M. Culture conditions for stimulation cholerae toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. **Microb Immun.** 30(11):1075-1083, 1986.

- Jaenicke, R. Folding and association of protein. **Porg Bioph Mol Biol.** 49: 117-237, 1987.
- Janson, J. & Rydén, L. Protein Purification : Principles, High-resolution Methods, and Applications, 2nd Edition. Janson. ISBN: 0471186260, 695 páginas, 1998.
- López-Saucedo, C., Cerna, J.F., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., Tarr, P.I., Estrada-García, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis** 9: 127-131, 2003.
- Kamaras, J.; Murrell, W.G. The effect of bacterial enterotoxins implicated in sids on the rabbit intestine. **Pathology.** 33: 187-196, 2001.
- Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Rev Microb.** 2:123-140, 2004.
- Kesty, N.C.; Mason, K.M.; Reedy, M.; Miller, S.E.; Kuehn, M.J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. **EMBO J** 23: 4538–4549, 2004.
- Khare, S.; Wilson, D.M.; Tien, X.Y.; Wali, R.K.; Bissonnette, M.; Brasitus, T.A. Protein kinase C mediates the calcium-induced activation of rat colonic particulate guanylate cyclase. **Arch Biochem Biophys.** 314: 200–204, 1994.
- Klipstein, F.A.; Engert, R.F. Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. **Infect Immun.** 13:1307-1314, 1976a.
- Klipstein, F.A.; Engert, R.F. Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. **Infect Immun.** 13:373-381, 1976b.
- Konowalchuck, J., Speirs, J. I. and Stavric, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 18: 775-779, 1977.
- Kuhnert, P.; Boerlin, P.; Frey, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microb Rev.** 24:107-117, 2000.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685, 1970.
- Lortie, L.A.; Dubreuil, J.D.; Harel, J. Characterization of *Escherichia coli* strains producing heat-stable enterotoxin b (STb) isolated from humans with diarrhea. **J Clin Microbiol** 29: 656–659, 1991.

- Ludwig, A.; Bauer, S.; Benz, R.; Bergmann, B.; Goebel, W. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. **Mol Microbiol** 31: 557–567, 1999.
- Ludwig, A.; von Rhein, C.; Bauer, S.; Huttinger, C.; Goebel, W. Molecular analysis of cytolysin A (ClyA) in pathogenic *Escherichia coli* strains. **J Bacteriol** 186: 5311–5320, 2004.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.
- Martins, L.M.; Catani, C.F.; Falcon, R.M.; Carbonell, G.V.; Azzoni, A.A.; Yano, T. Induction of apoptosis in Vero cells by *Aeromonas veronii* biovar sobria vacuolating cytotoxic factor. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 49: 197–204, 2007.
- Mello, M. L. S. and Vidal, B. C. Práticas de biologia celular. Edigard Blucher, In Appendix, 71, Rio de Janeiro, 1980.
- Menard, L.P. & Dubreuil, J.D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit Rev Microbiol** 28: 43–60, 2002.
- Menard, L.P.; Lussier, J.G.; Lepine, F.; Paiva de Sousa, C.; Dubreuil, J.D. Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. **Protein Expr Purif.** 33: 223–231, 2004.
- Mitchell, D. B., Santone, K. S. and Acosta, D. Evaluation of cytotoxicity in cultured cells by enzyme leakage. **J.Tis. Cult. Methods** 6: 113–116, 1980.
- Moon, H.W.; Whipp, S.C.; Baetz, A.L. Comparative effects of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* on rabbit and swine small intestine. **Lab Invest.** 25(2):133–140. 1971.
- Moseley, S.L., Hardy, J.W., Huq, M.I., Echeverria, P., Falkowi, S. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a Heat-Stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect Immun** 39: 1167–1174. 1983.
- Muhldorfer, I. and Hacker, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. **Microb. Pathogen.** 16:171–181, 1994.
- Nair, G.B. & Takeda, Y. The heat-stable enterotoxins. **Microbial Path.** 24: 123–131, 1998.
- Nataro, J.P., Seriwatana, J., Fasano, A., Maneval, D.R., Guers, L.D., Noriega, F., Dubovsky, F., Levine, M., Moris, J.G.Jr. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. **Infect. Immun.** 63:

4721-4728, 1995.

Nataro, J.P. & Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev** 11: 142–201, 1998.

Neves K. O., Lanna M. C. S., Siqueira J. M. F., Rocha W. D., Dutra A., Oliveira I. C., Vilano G.S. Estudo microbiológico da água de consumo de bairros periféricos de Ouro Preto e diarreia infantil. In: Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia - Ecotoxicologia e os novos desafios no monitoramento ambiental, 7 e Reunião da Setac Latino-Americana, 5, Vitória, Anais, 1, 2002.

Okamoto, K. and Takahara M. Synthesis de *Escherichia coli* heat-stable Stp a as pre-pro form and role of the pro sequence form in secretion. **J Bacteriol.** 172: 5260-5265, 1990.

Okamoto, K.; Fujii, Y.; Akashi, N.; Hitotsubashi, S.; Kurazono, H.; Karasawa, T.; Takeda, Y. Identification and characterization of heat-stable enterotoxin II-producing *Escherichia coli* from patients with diarrhea. **Microbiol Immunol.** 37: 411–414, 1993.

Okamoto, K. Studies on structure and mechanism of action of heat-stable enterotoxins. **Jap. J. Bacteriol.** 52: 553-566, 1997.

Oscarsson, J.; Mizunoe, Y.; Uhlin, B.E.; Haydon, D.J. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the slyA gene product. **Mol Microbiol.** 20: 191–199, 1996.

Oscarsson, J.; Mizunoe, Y.; Li, L.; Lai, X.H.; Wieslander, A.; Uhlin, B.E. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. **Mol Microbiol** 32: 1226–1238, 1999.

Osek, J. Multiplex polymerase chain reaction assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **J Vet Diagn Invest** 13:308-311, 2001.

Patel, S.K.; Dotson, J.; Allen, K.P.; Fleckenstein, J.M. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun.** 72: 1786–1794, 2004.

Peterson, J.W. & Whipp, S.C. Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect Immun** 63: 1452–1461, 1995.

Poehling, H.M. & Neuhoff, V. Visualization of proteins with a silver “stain:” A critical analysis. **Electrophoresis** 2: 141–147, 1981.

Qadri, F.; Svennerholm, A.; Faruque, A.S.G.; Bradley, S. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin Microb Rev.** 18(3):465-483, 2005.

- Rasheed, J.K., Guzman-Verduzco, L., Kupersztoch, Y. Hyperproduction of heat-stable enterotoxin (STA4) of *Escherichia coli* and analysis of the unusual electrophoretic behavior of reduced and alkylated forms of STAS. **Microb Pathog**, 5: 333-343. 1988.
- Rao, M.C.; Guandalini, S.; Smith, P.L.; Field, M. Mode of action of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: tissue and subcellular specificities and role of cyclic GMP. **Biochimica et Biophysica Acta** 632: 35-46, 1981.
- Ribeiro, D. A. *Escherichia coli* isoladas de água de consumo: caracterização fenotípica e genotípica das propriedades de virulência. Dissertação de Mestrado em C.P.Gem Genética e Biologia Molecular, IB/UNICAMP, 2006.
- Rousset, E.; Harel, J.; Dubreuil, J.D. Sulfatide from the pig jejunum brush border epithelial cell surface is involved in binding of *Escherichia coli* enterotoxin b. **Infect Immun**. 66:5650-5658, 1998.
- Russo, T.A.; Johnson, J.J. Extraintestinal isolates of *Escherichia coli*: identification and prospects for vaccine development. **Exp Rev Vac**. 5(1):45-54, 2006.
- Schägger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100kDalton. **Anal. Biochem**. 166: 368-379, 1987.
- Saeed, A.M.K.; Sriranganathan, N.; Cosand, W.; Burger, D. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin from bovine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun**. 40: 701-707. 1983.
- Saeed, A.M. & Greenberg, R.N. Preparative purification of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Anal Biochem** 151: 431-437, 1985.
- Saeed, A.M.; Magnuson, N.S.; Gay, C.C.; Greenberg, R.N.. Characterization of heat-stable enterotoxin from a hypertoxigenic *Escherichia coli* pathogenic for cattle. **Infect Immun** 53: 445-447, 1986.
- Saeed, A.M.; McMillian, R.; Huckelberry, V.; Abernathy, R.; Greenberg, R.N. Specific receptor for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) may determine susceptibility of piglets to diarrheal disease. **FEMS Microbiol Lett** 43: 247-251, 1987.
- Saotome, K.; Morita, H.; Umeda, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injectoin drugs. **Toxic in vitro**. 3(4):317-321, 1989.
- Savarino, S.J.; Fasano, A.; Watson, J.; Martin, B.M.; Levine, M.M.; Guandalini, S.; Guerry, P.

- Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc Natl Acad Sci USA.** 90:3093–3097, 1993.
- Sears, C.L. & Kaper, J.B. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microb. Rev.** 60(1): 167-215, 1996.
- Sellers, Z.M.; Childs, D.; Chow, J.Y.C.; Smith, A.J.; Hogan, D.L.; Isenberg, J.I.; Dong, H.; Barret, K.E.; Pratha, V.S. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* stimulates a non-CFTR-mediated duodenal bicarbonate secretory pathway. **Am J Physiol Gastrointest.** 288(4): 654-663, 2005.
- Sekiaki, T., Akashi. H. and Teakado. N. Nucleotide sequences of the genes for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I of bovine, avian, and porcine origins. **Am J Vet Res** 46: 909-912, 1985.
- So, M. & McCarthy, B. J. Biochemistry nucleotide sequence of the bacterial transposon Tn1681 encoding a heat-stable (ST) toxin and its identification in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Proc Nat Acad Sci USA.** 77: 4011-4015. 1980.
- Spangler, B.D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol Rev.** 56: 622–647, 1992.
- Staples, S.J.; Asher, S.; Giannella, R. Purification and characterization heat-stable enterotoxin produced of by a strain of *Escherichia coli* pathogenic for man. **J.Biolog Chemist.** 255(1):4716-4721, 1980.
- Steele, D. (2009). Homepage da Organização Mundial de Saúde (WHO) http://www.who.int/vaccine_research/diseases/e_e_coli/en/. Acessado dia 19 de dezembro de 2009.
- Stieglitz, H.; Cervantes, L., Robledo, R., Fonseca, R., Covarrljbias, L., Bolivar, F., Kupersztoch, Y. Cloning, sequencing and expression in ficoll-generated minicells of an *Escherichia coli* Heat-Stable enterotoxin gene. **Plasmid.** 20: 42-53. 1988.
- Takao, T.; Tominaga, N.; Shimonishi, Y.; Hara, S.; Inoue, T.; Miyama, A. Primary structure of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. **Biochem Biophys Re Commun.** 125: 845–51, 1984.
- Takao, T.; Shimonishi, Y.; Kobayashi, M. Amino acid sequence of heat stable enterotoxin produced by *Vibrio cholerae* non-O1. **FEBS Letters.** 193: 250–4, 1985.
- Takeda, Y., Takeda, T., Yano, T., Yamamoto, K., Miwatani, T. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect Immun,** 23, 978-985, 1979.

- Thapar, N. & Sanderson, I.R. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. **The Lancet**. 363:641-653, 2004.
- Turner, S.M.; Scott-Tucker, A.; Cooper L.M.; Henderson, I.R. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett**. 263: 10–20, 2006.
- Vaandrager, A.B. Structure and function of the heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C. **Mol Cell Biochem**. 230:73-83, 2002.
- Veilleux, S. & Dubreuil, J.D. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. **Vet Res** 37: 3–13, 2006.
- Wai, S.N.; Lindmark, B.; Soderblom, T.; Takade, A.; Westermarck, M.; Oscarsson, J.; Jass, J.; Richter-Dahlfors, A.; Mizunoe, Y.; Uhlin, B.E. Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin. **Cell** 115: 25–35, 2003.
- Westermarck, M.; Oscarsson, J.; Mizunoe, Y.; Urbonaviciene, J.; Uhlin, B.E. Silencing and activation of ClyA cytotoxin expression in *Escherichia coli*. **J Bacteriol** 182: 6347–6357, 2000.
- Yamamoto, T. & Echeverria, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. **Infect Immun**. 64: 1441–1445, 1996
- Yamamoto, T. & Nakazawa, M. Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. **J Clin Microbiol**. 35: 223–227, 1997.
- Yamanaka, H.; Nomura, T.; Fujii, Y.; Okamoto, K.; Need for TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein, in the secretion of heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. **Microb Pathog**. 25: 111–120, 1998.
- Yano, T. Determination of the efficiency of K99-F41 fimbrial antigen vaccine in newborn calves. **Braz J Med Biol Res**. 28: 651-654, 1995.
- Yoshino, K.; Miyachi, M.; Takao, T. Purification and sequence determination of heat-stable enterotoxin elaborated by a cholera toxin-producing strain of *Vibrio cholerae* O1. **FEBS Letters** 326: 83–86, 1993.
- Yoshino, K.; Huang, X.; Miyachi, M. Amino acid sequence of a novel heat-stable enterotoxin produced by a *yst* gene-negative strain of *Yersinia enterocolitica*. **Lett Peptide Sci**. 1: 95–105, 1994

Yoshino, K.; Takao, T.; Huang, X. Characterization of a highly toxic, large molecular size heat-stable enterotoxin produced by a clinical isolate of *Yersinia enterocolitica*. **FEBS Letters**. 362: 319–322, 1995.