

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA DETECÇÃO DE
***Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA**

ANDRÉIA FERREIRA DA SILVA

MANAUS

2016

ANDRÉIA FERREIRA DA SILVA

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA DETECÇÃO DE
***Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi

Co-Orientador: Dr. Luís André Moraes Mariúba

MANAUS

2016

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586p Silva, Andréia Ferreira
PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA DETECÇÃO DE
Escherichia coli ENTEROPATOGÊNICA / Andréia Ferreira Silva.
2016
88 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi
Coorientadora: Luís André Moraes Mariúba
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Synthetic Peptide . 2. EPEC. 3. BfpA . 4. Antibodie. I. Orlandi,
Patrícia Puccinelli II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS PARA DETECÇÃO DE
***Escherichia coli* ENTEROPATOGÊNICA**

Dissertação apresentada ao
Programa Multi-Institucional de Pós-
Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Amazonas
como parte do pré-requisito para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia.

APROVADA EM: 21 de novembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi, Presidente
Instituto de Leônidas e Maria Deane- ILMD/FIOCRUZ

Dra. Andréa Felix Listik, Membro
Universidade do Estado do Amazonas/UEA

Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, Membro
Instituto de Leônidas e Maria Deane- ILMD/FIOCRUZ

*“A Deus o maior e primeiro
cientista, construindo sua perfeita
obra sem revelar sua metodologia”.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A **Deus** que me permitiu essa longa caminhada, que me deu força a cada dia para realizar este trabalho;

Aos **meus amigos** que nunca me abandonaram sempre estiveram ao meu lado, me apoiando;

Ao **meu pai Oséas** e minha **avó Nazaré** (*in Memória*) que sempre estiveram torcendo por minhas conquistas;

As **minhas amigas Mayana Pardo, Paloma Inessa e Elizangela Farias** por todos os momentos em que pensamos em desistir tivemos muita fé e esperança;

Aos **minhas amigas Nonata Ferreira, Cintia Monteiro, Socorro Varela, Silvia Alencar**, e todos os outros amigos que direto ou indiretamente contribuíram para este momento;

A **minha orientadora Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi** por ter me aceitado na sua equipe de pesquisa. Obrigada pela sua orientação, dedicação, paciência e incentivo para a finalização deste projeto;

Ao **meu co-orientador Dr. Luiz André Mariúba**, por todo o apoio concedido, por sua ética e competência e sua grande colaboração para a finalização desta pesquisa;

Ao **Dr. Paulo Nogueira** pela colaboração nos conhecimentos que foram agregados nesta pesquisa;

Ao **Dr. Gilvan Silva** pelo grande incentivo para entrar na Pós-graduação e por seus ensinamentos jamais esquecidos;

Agradeço a toda a **equipe de laboratório** que de forma direta e indireta colaboraram para este trabalho em especial a **Paula Takita, Edilene Martins, Yuri Sebastião, Lucas Barbosa**;

A **Universidade Federal do Amazonas** e ao **Programa de Pós-Graduação Multidisciplinar em Biotecnologia – PPGBIOTEC** pelas oportunidades;

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas – FAPEAM** pela concessão da bolsa.

“Chegará o tempo em que o homem
conhecerá o íntimo de um animal e nesse dia todo
crime contra um animal será um crime contra a
humanidade”

LEONARDO DA VINCI

RESUMO

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) tem sido causa frequente de muitos casos de diarreia no Brasil e no mundo, além de ser um dos principais agentes responsáveis pelas taxas de mortalidade entre as crianças de 0 a 5 anos de idade. A EPEC causa uma lesão histológica nas microvilosidades dos enterócitos caracterizada pela formação de uma ultraestrutura em forma de pedestal. Um dos fatores de patogenicidade responsável é o complexo BfpA (*bundle forming pili*). A BfpA promove a adesão das cepas de EPEC denominadas como típicas. Diferentemente, algumas cepas de EPEC são desprovidas do Fator de Aderência de *Escherichia coli* -EAF (EPEC^{BfpA}) e tendem a provocar as lesões típicas de pedestal com mais lentidão e por isso são denominadas EPEC atípicas. Como a BfpA é uma proteína imunogênica e recentemente a incidência de EPEC^{BfpA} atípicas vem aumentando, acredita-se que a lesão por estas bactérias ocorra por outras vias tornando importante o desenvolvimento de estratégias para sua identificação. Neste estudo várias sequências antigênicamente preditas foram usadas para sintetizar peptídeos a fim de produzir anticorpos policlonais anti-BfpA em camundongos BALB/c visando a identificação específica da EPEC típica. Para alcançar os objetivos, inicialmente ferramentas de bioinformática de proteínas e de predição de epítomos B foram utilizadas para mapeamento de regiões antigênicas específicas para EPEC. Peptídeos sintéticos foram adquiridos para a imunização de camundongos Balb/c, afim de que antissoros fossem avaliados quanto a especificidade à EPEC. Como resultados foi possível a construção e síntese de seis peptídeos lineares de BfpA (P1-P6). O peptídeo P6 foi selecionado como produto deste estudo devido a habilidade de induzir a produção de anticorpos contra esta proteína e este soro reconhecer a proteína nativa em cepas de EPEC típica. Acredita-se que a caracterização funcional destes anticorpos permita o desenvolvimento de ferramentas para o diagnóstico específico das duas linhagens de EPEC visando a contribuição para estudos futuros sobre o controle do processo fisiopatológico no intestino.

Palavras-chave: Peptídeo Sintético; EPEC; BfpA; Anticorpos.

ABSTRACT

Escherichia coli (EPEC) was frequent cause of many cases of diarrhea in Brazil and around the world, and one of the main agents responsible for high mortality rates among children aged 0-5 years. EPEC is known to cause histological damage to the microvilli of enterocytes, characterized by the formation of a shaped support ultrastructure. One of the factors responsible for pathogenicity is complex BFP (bundle forming pili). The presence of genes BfpA promotes adhesion and consequently the injury of EPEC strains characterized as typical. Differently, some EPEC strains lack EAF (EPEC^{BfpA⁻}) causing lesions shaped as pedestal, but more slowly, called atypical EPEC. BfpA is known as immunogenic and recently the incidence of atypical (EPEC^{BfpA⁻}) is increasing, it is believed that these bacteria injury occurs through other means making it important to develop strategies for identifying. In this study several predicted peptide sequences were synthesized, to produce polyclonal antibodies and anti-EPEC -BfpA in BALB / c antibodies that are used to target specific identification of typical and atypical EPEC. To achieve the objectives of bioinformatics tools and prediction of protein epitopes immuneepitope B were used for antigenic regions specific mapping for the EPEC two phenotypes. Synthetic peptides were purchased to immunize Balb / C mice, so the antisera are evaluated for specificity EPEC. As results, it was possible to construct and synthesize six linear BfpA peptides (P1-P6). P6 peptide was selected as the product of this study due to its ability to induce the antibodies production against this protein and this serum recognize the native protein in typical EPEC strains. We believe that the functional characterization of these antibodies by developing new tools will help in the diagnosis of these two specific strains of EPEC and will contribute to studies involving these bacteria.

Keywords: Synthetic Peptide; EPEC; BfpA; Antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Saneamento básico: Distribuição mundial do saneamento básico em diferentes proporções, os indicadores deste mapa não indicam sua real expressão de melhorias. As cores correspondem as escalas de % da população Fonte: OMS, 2014...19
- Figura 2** - Taxa de Mortalidade: Proporção mundial da Taxa de Mortalidade infantil a cada 1000 habitantes. Fonte: OMS, 2014..... 20
- Figura 3** - Água tratada e saneamento Básico na região Norte: Número de municípios com a porcentagem de cobertura de água tratada (A) e saneamento básico (B), baseado em 100 municípios avaliados. Cada histograma corresponde as escalas de 20% da população que tem acesso ao saneamento básico e água tratada. Fonte: ANVISA, 2016. 21
- Figura 4** - Ultramicrofotografia de um Enterócito: Ultramicrofotografia de um enterócito mostrando várias *Escherichia coli enteropatogênicas* colonizando sobre a superfície epitelial Fonte: (ROTHBAUM E COLS, 1982). 26
- Figura 5**- Óbitos Notificados por estado: Número de óbitos infantis (masculinos e femininos) notificados, no ano selecionado e últimos nove anos precedentes. Fonte: SIM – Sistema de informações sobre mortalidade Dezembro de 2015..... 27
- Figura 6** - Óbitos por causas evitáveis no Amazonas: Óbitos por causas evitáveis em menores de 5 anos em hospitais e outros estabelecimentos de saúde no estado do Amazonas Fonte: MS/ SM/CGIAE- Sistema de informações sobre mortalidade- SIM Dezembro de 2014..... 27
- Figura 7** – Mecanismo de Aderência da EPEC: Primeiro contato da EPEC típica se fixando às microvilosidades por meio da (BfpA) formação de feixes de pili. Após o ocorrido, suas proteínas secretadas, como os receptores Tir são exportadas para o meio extracelular, desorganizando o citoesqueleto dos enterócitos e formando um pedestal, promovendo a destruição e perda localizada nas microvilosidades (DONNENBERG et al., 1997)..... 29
- Figura 8** - Ilha de Patogenicidade: Organização da ilha de patogenicidade LEE, responsável pela codificação de várias proteínas (GARMENDIA et al., 2005). 29
- Figura 9**- **A)** T3SS: Sistema de Secreção Tipo III Fonte: (Vieira et al., 2001) **B)** Seringa Molecular: Microscopia eletrônica do sistema de secreção penetrando a membrana da célula hospedeira (Vieira et al.,2009)..... 31
- Figura 10** - Desenho esquemático da proteína TIR: Desenho esquemático, representando dois domínios transmembranares que, ao entrar no citoplasma, iniciam um processo de fosforilação formando um gancho no interior da célula hospedeira para

se conectar com a intimina. Fonte: Yu Lou, 2000.....	32
Figura 11 - Esquema da infecção da <i>E.coli</i> enteropatogênica: Esquema da infecção de EPEC promovida pela sucessão de proteínas extracelulares no primeiro estágio da infecção. 1°. As proteínas estabelecem contato com a célula. 2°. Filamentos de EspA transportam, através de sua estrutura, proteínas efetoras. 3°. Tirao entrar no citoplasma é fosforilada para atuar como integrina na superfície da membrana. 4°. Ocorre o contato íntimo formando o pedestal (adaptada de CLARKE et al., 2002)	33
Figura 12 - Esquema representativo da metodologia utilizada no trabalho.	41
Figura 13 - Análise da estrutura tridimensional da BfpA: (A) Análise da estrutura 3D obtida pelo programa PDB para seleção dos epítomos lineares; (B e C) Identificação dos epítomos na estrutura 3D da proteína BfpA obtida pelo programa Swiss PDB Viewer. Fonte: PDB (2016).	52
Figura 14 - Análise dos peptídeos: Análise da acessibilidade dos peptídeos identificados por coloração na superfície da proteína BfpA. Fonte: Software Swiss PDB Viewer (2016)	53
Figura 15 - Predição de epítomos utilizando os algoritmos disponíveis no “Immune epitope database and analysis resource” (IEDB).....	54
Figura 16 - Teste de reatividade dos peptídeos sintéticos por “dot blot”. (A) Reconhecimento pelo anti-soro <i>E.coli</i> EPEC; (B) Controle negativo, soro de camundongo saldável; (C) Controle negativo: controle do sistema.	55
Figura 17 - Teste de Adesão de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica: Foto representativa da aderência localizada apresentada por EPEC após 3 horas de interação com células HEp-2. (A) EPEC17 (E2348/69); (B) EPEC 23 (C275153); (C) EPEC 16 (Selvagem); (D) EPEC 04 (Selvagem).	57
Figura 18: Teste de Invasão de <i>Escherichia coli</i> após 3 horas de interação com células HEp- 2: Foto representativa de padrão de (A) Enteroinvasora - EIEC (ATCC 1381); (B) Enterotoxigênica - ETEC (ST8); (C) Enterohemorrágica - EHEC (EDL-933 171O157:H7).....	58
Figura 19: Avaliação do reconhecimento de anticorpos policlonais de peptídeos P3 e P6 contra proteínas nativas em amostras de diferentes tipos de bactérias <i>E. coli</i> por Citometria de Fluxo. (A) Analise por tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das amostras de bactérias por citometria de Fluxo; (B) Avaliação da porcentagem de marcação de Anti-Mouse Alexa Fluor 488 das amostras de soro contra extrato de bactéria; (C) contra Peptídeo; (D) histograma da média de intensidade de fluorescência – MIF.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações de plasma e Vermelho Congo adicionado ao LB líquido para o cultivo das cepas selecionadas.....	50
Tabela 2: Tabela com os peptídeos da proteína BfpA selecionados no programa Bepipred.	53
Tabela 3: Avaliação dos parâmetros “ β -turn”, acessibilidade, hidrofobicidade e antigenicidade no algoritmo IEDB para os epítomos de BfpA selecionados	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Anticorpos produzidos pelo modelo animal imunizado com P3 reconhecimento pela técnica de Elisa.....	56
Gráfico 2 - Anticorpos produzidos pelo modelo animal imunizado com P6 reconhecimento pela técnica de ELISA.....	56
Gráfico 3 - Reconhecimento dos antissoros P3 e P6 contra as cepas selecionadas. O eixo x do gráfico representa os controles e tratamento, o eixo y representa o percentual de reconhecimento medido em (%) de fluorescência.....	60
Gráfico 4 - <i>E. coli</i> EPEC 2348/69 cultivada por 5 horas contendo concentrações crescentes de plasma humano (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).....	61
Gráfico 5- <i>E. coli</i> EPEC 2348/69 cultivada por 16 horas contendo concentrações crescentes de plasma humano (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).....	61
Gráfico 6 - <i>E. coli</i> EPEC 2348/69 cultivada por 5 horas contendo concentrações crescentes de vermelho congo (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).....	62
Gráfico 7- <i>E. coli</i> EPEC 2348/69 cultivada por 16 horas contendo diferentes concentrações vermelho congo (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
'	Minutos
µl	Microlitros
A/E	<i>Attaching/ Effacing</i>
AA	Adesão Agregativa
AD	Adesão Difusa
AL	Adesão Localizada
ALL	Adesão Localizada Like
BfpA	<i>Bundle forming pili</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente DEC <i>E.coli</i> diarreogênicas
DII	Derwent Innovations Index
DO	Densidade Óptica
EAEC	<i>Escherichia coli enteroagregativa</i> EHEC <i>Escherichia coli enterohemorrágica</i> EIEC <i>Escherichia coli enteroinvasora</i>
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay EPEC <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica ETEC <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
h	Horas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana IEDB <i>Bepipred Linear Epitope Prediction</i> kDa
	Quilo Dalton
kg	Quilogramas
LB	Caldo Luria Bertani
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
LT	Toxina Termo Lábel
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
°C	Graus Ceusius
PAI	<i>Pathogenicity Island</i>

PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDB	<i>Protein Database Bank</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
Rpm	Rotações Por Minuto
SST3	Sistema de Secreção Tipo 3
ST	Toxina Termo Estável
STEC	<i>Escherichia coli produtora</i> de Shiga toxina STx Shiga Toxina
Tir	Receptor da Intimina-Translocado
UFC	Unidade Formadora de Colônia
V	Volume

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1. Doenças Diarreicas	19
1.2. <i>Escherichia coli</i> Diarreiogênica- DEC	21
1.2.1 Classificações dos Antígenos Lipopolissacarídeos (LPS) para a Detecção de DECs	23
1.3. Agentes Etiológicos Causadores de Doenças Diarreogênicas	23
1.3.1. <i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC) como Causadora de Diarreia Infantil	25
1.3.2. Epidemiologia da EPEC no Brasil	26
1.4. Fatores de Virulência da EPEC	28
1.4.1. Sistemas de Secreção do Tipo III (SST3) e suas Proteínas Efetoras	30
1.4.2. Lesão <i>attaching and effacing</i> A/E	32
1.4.3. Ferramentas de Diagnósticos Realizados em <i>E. coli</i> Enteropatogênica.	33
1.4.4. Levantamento de Patentes	35
1.4.5. Produtos Comerciais	38
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVO GERAL	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Desenho Experimental	41
4.1.1 Moldes da Estrutura 3D das Proteínas BfpA	41
4.1.2 Acessibilidade de Epítomos nas Proteínas BfpA	42
4.1.3 Desenho e Seleção dos Peptídeos Sintéticos	42
4.1.3.1 Previsão <i>Beta Turn</i> ou Conformação Chou e Fasman	43
4.1.3.2 Emini - Escala de Acessibilidade de Superfície	43
4.1.3.3 Karplus e Schulz - Escala de Flexibilidade	43
4.1.3.4 Kolaskar e Tongaonkar - Escala de Antigenicidade	43
4.1.3.5 Escala Hidrofilicidade	43
4.1.3.6 BepiPred - Predição Linear em Epítomos de Células B	44
4.2 Sintetização dos Peptídeos	44
4.2.1 Acoplamento dos Peptídeos	44
4.3 Comitê de Ética Animal	44
4.4 Produção do Antissoro	45
4.5 Seleção dos Peptídeos Sintéticos por Dot Blot	45

4.6	Procedimentos de Imunização em Camundongos com Peptídeo Sintético	45
4.6.1	Grupos Experimentais	45
4.6.2	Indução para Produção de Anticorpo	46
4.7	Ensaio Imunoenzimático	46
4.7.1	ELISA Indireto (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)	46
4.8	Seleções das Cepas Padrões para o Teste de Adesão	47
4.9	Cultivos de Células HEp- 2	47
4.9.1	Inoculo Bacteriano	48
4.9.2	Ensaio de Adesão e Invasão <i>in vitro</i> às Células HEp- 2	48
4.10	Indução do Inoculo Bacteriano com Vermelho Congo e Plasma Humano	49
4.11	Citometria de Fluxo	50
5.	RESULTADOS	52
5.1.	Análise da Estrutura 3D	52
5.2.	Predições dos Epítomos Lineares	53
5.2.1	Triagem de Peptídeos Sintéticos	54
5.2.2	Avaliação da Resposta Humoral em Camundongos	55
5.2.3	Avaliação da Capacidade de Reconhecimento do Soro antiP3	56
5.2.4	Análises de Estimulação da Produção de BfpA em Cultura <i>in vitro</i>	60
6	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÃO	67
	PERSPECTIVAS FUTURAS	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	80

INTRODUÇÃO

Dentre os problemas de saúde pública enfrentados por países em desenvolvimento, as doenças diarreicas destacam-se por atingir principalmente crianças entre 0 a 5 anos (OMS, 2016). Os fatores que contribuem para o aumento das doenças diarreicas são a falta de saneamento básico, má manipulação dos alimentos e a falta de água potável. A segunda edição do relatório da OMS para prevenir doenças em ambientes saudáveis, indica que o aumento do saneamento e da água potável vem contribuído para a redução dos casos de diarreia. Atualmente são registrados mundialmente cerca de 530.000 casos de diarreia por ano, sendo que 1.400 casos ocorrem em crianças menores de 2 anos de idade (UNICEF, 2016).

A *Escherichia coli* é uma bactéria comum do trato gastrointestinal de humanos e animais, porém algumas cepas são capazes de causar infecções por possuírem fatores de virulência (PAWŁOWSKA E SOBIESZCZAŃSKA, 2016; SILVA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2004). Estas cepas virulentas adquiriram diferentes formas de causar infecções através de seus mecanismos de patogenicidade. Essas *Escherichia coli* patogênicas são conhecidas como *E.coli* diarreogênicas ou DEC (NATARO E KAPER, 1998).

Atualmente as DECs são classificadas em seis categorias, no entanto o diagnóstico bioquímico tradicional não possibilita a distinção entre elas, necessitando serem submetidas a técnicas mais específicas. A DEC enteropatogênica (EPEC) é um desses patógenos responsáveis pela infecção gastrointestinal em crianças e também em animais (RIBEIRO et al., 2015). A infecção causada pela EPEC típica promove a destruição das microvilosidades dos enterócitos gerando um aspecto de pedestal, conhecida como *attaching* e *effacing* (PAWŁOWSKA E SOBIESZCZAŃSKA, 2016; NATARO E KAPER, 1998). Este processo fisiopatológico é mediado por proteínas secretadas pelo sistema de secreção tipo 3 (SST3), são codificadas no plasmídeo EAF cuja principal proteína é a BfpA que tem um papel central na lesão (FRANZOLINI et al., 2005).

Esta pesquisa teve o objetivo de produzir anticorpos para a detecção da proteína específica BfpA encontradas em EPEC típica. Como alternativa para obtenção das sequências gênicas, os peptídeos foram sintetizados a partir de algoritmos de predição, seleção e simulação da interação dos epítomos na ferramenta de bioinformática

Immuneepitope. O desenvolvimento de anticorpos específicos em camundongos Balb/c foi avaliado em testes imunológicos de alta sensibilidade e especificidade à EPEC.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1. Doenças Diarreicas

As doenças diarreicas são consideradas um problema de saúde pública (BÜHLER et al., 2014). Atingem principalmente crianças de 0 a 5 anos, especialmente aquelas que vivem em países em desenvolvimento com precárias instalações sanitárias, escassez de água potável e práticas de higiene inadequadas, que ajudam na transmissão efetiva da EPEC (UNICEF/OMS, 2009).

Segundo a OMS, 2,5 milhões de pessoas ainda não possuem o saneamento adequado, infelizmente a má qualidade da água atinge as classes menos favorecidas, onde os serviços de saneamento básico ainda estão sendo melhorados (OMS, 2014) (**Figura 1**).

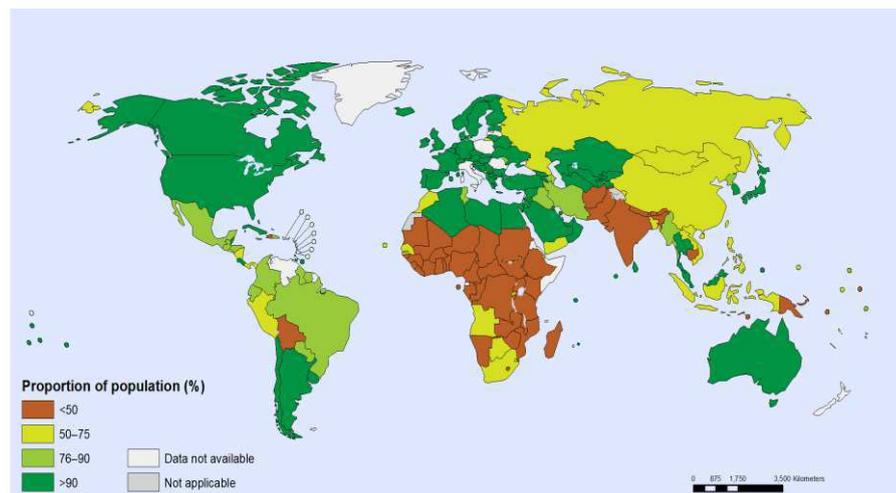


Figura 1 – Saneamento básico: Distribuição mundial do saneamento básico em diferentes proporções, os indicadores deste mapa não indicam sua real expressão de melhorias. As cores correspondem as escalas de % da população Fonte: OMS, 2014.

Atualmente, são registrados mundialmente cerca de 760.000 casos de diarreia por ano, segundo a UNICEF 2016 é a segunda causa de morte mais comum entre crianças. Em 2013, 6,3 milhões de crianças foram a óbito por causa da diarreia antes de seu quinto ano de vida (**Figura 2**). Apesar do número expressivo de óbitos a taxa de mortalidade vem reduzindo gradativamente em todo mundo, em razão do plano de ação global integrado para a prevenção e controle de pneumonia e diarreia (GAPPD) (UNICEF, 2016).

O Brasil, segundo os dados da OMS, enquadra-se no grupo de países onde 76 a 90% da população tem acesso a qualidade de saneamento. No entanto, estes dados são superestimados e se baseiam na água tratada, pois na região Norte o saneamento básico não

atinge mais do que 10% população, como foi verificado no “Ranking do Saneamento em 2014” realizado anualmente pelo “Instituto Trata Brasil” que é uma Organização da Sociedade Civil de Interesse Público (OSCIP). Formado por empresas preocupadas em saneamento básico, o Instituto “Trata Brasil” vem realizando estudos desde 2007 sobre a situação do saneamento básico e da proteção dos recursos hídricos do país (OMS, 2014).

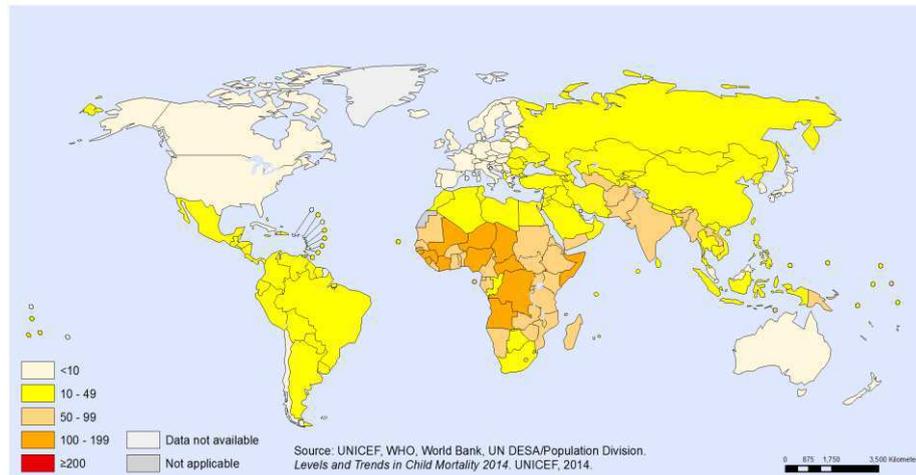


Figura 2- Taxa de Mortalidade: Proporção mundial da Taxa de Mortalidade infantil a cada 1000 habitantes. Fonte: OMS, 2014.

Baseados no Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento do Ministério das Cidades a mais nova avaliação realizada nas 100 maiores cidades do país confirmou a falta de saneamento nas cidades da região Norte, tais como Belém 12,70%, Porto Velho 31,43% e Ananindeua (PA) 26,89% (**Figura 3**) (ANVISA, 2016).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), dispõe da resolução RDC N° 216/2004, sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Medidas Sanitárias com a Alimentação, a fim de evitar qualquer contaminação biológica, física e química (ANVISA, 2016). Além da fiscalização pela ANVISA, existem medidas preventivas nas áreas endêmicas como levantamentos dos dados epidemiológicos. O monitoramento baseia-se em relatórios semestrais registrado na rede pública de saúde, a fim de evitar novos surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

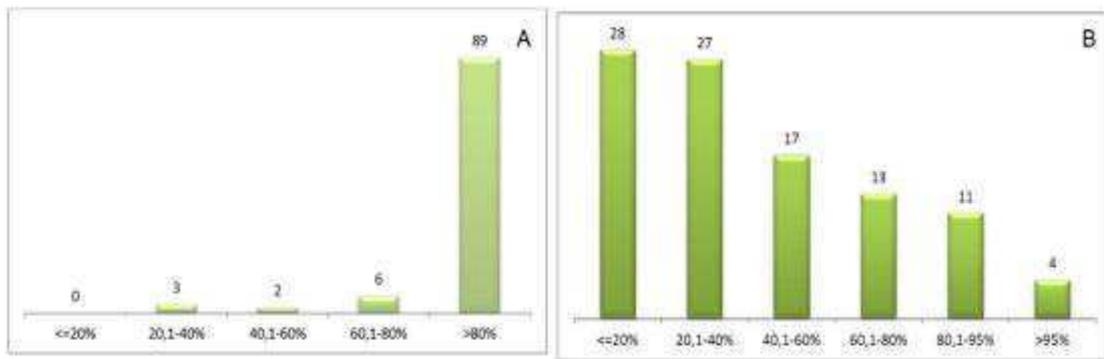


Figura 3 – Água tratada e saneamento Básico na região Norte: Número de municípios com a porcentagem de cobertura de água tratada (A) e saneamento básico (B), baseado em 100 municípios avaliados. Cada histograma corresponde as escalas de 20% da população que tem acesso ao saneamento básico e água tratada. Fonte: ANVISA, 2016.

1.2. *Escherichia coli* Diarreio gênica- DEC

O agente etiológico *E.coli* é uma bactéria comum do trato gastrointestinal de humanos e animais, porém algumas cepas possuem fatores de virulência que conferem a este patógeno a habilidade de causar infecções, sendo estes classificados como bactérias patogênicas intestinais (RODRIGUES et al., 2008, SILVA et al., 2014;).

Descoberta em 1885, a bactéria *E. coli* foi denominada *Bacillus coli comune*. Posteriormente, foi renomeada para homenagear seu descobridor Theodore Escherich Chen (FRANKEL, et al.,1998). É um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, que pertence à família *Enterobacteriaceae*. O potencial das cepas em causar infecções pode variar de acordo com os fatores de virulência específicos para cada patógeno entérico, por isso as *E.coli* patogênicas são conhecidas como *E. coli* diarreio gênicas ou DECs (NATARO E KAPER, 1998).

O grande espectro de mecanismos fisiopatológicos e o tipo de diarreia exigiram a classificação das DECs em patótipos, separados em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC) (NATARO E KAPER, 1998). Esses patógenos entéricos são difíceis de serem diagnosticados por métodos bioquímicos. A utilização de marcadores moleculares, assim como as técnicas imunológicas, são métodos que não estão acessíveis a todos na saúde pública. Desta forma, a detecção confiável não permite a identificação de cepas virulentas, assim como o monitoramento de colonização no hospedeiro

e o comprometimento de sua presença no organismo (FIALHO, 2008).

A *E. coli* enteropatogênicas (EPEC) o objetivo do nosso estudo, causa lesão nos enterócitos classificada como A/E (*Attaching/ Effacing*) pela ação das proteínas do SST3 e do plasmídeo EAF, que contém sequências que codifica a proteína BfpA (*Binding Forming Pili*) (NATARO E KAPER, 1998).

As *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) causam uma lesão similar as EPECs, porém há a presença de hemorragia e formação de edema no intestino grosso, provocando diarreia sanguinolenta (disenteria) e colite hemorrágica durante a liberação da citotoxina - proteínas toxinas shiga e verocitocina (STx). Ela pode causar também a síndrome hemolítica urêmica e trombocitopenia. (NATARO E KAPER, 1998).

A *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) aderem-se à mucosa do intestino delgado, causando diarreia por enterotoxinas ST (toxina termo estável) e LT (toxina termo lábil) essas toxinas ocasionam lesão no momento da colonização na superfície da mucosa intestinal (TRABULSI, 2005). *E. coli* como a enteroagregativas (EAEC) possuem como peculiaridade a colonização na qual a bactéria adere na mucosa intestinal. Essa aderência produz um muco provocado por uma enterotoxina estável (EAST1) capaz de alterar a fisiologia das células (TRABULSI, 2005).

Nas *E. coli* enteroinvasoras (EIEC) ocorre invasão epitelial, rompimentos dos vacúolos endocíticos, multiplicação intracelular, movimento direcional pelo citoplasma e invasão de células epiteliais adjacentes que são indistinguíveis dos sintomas da disenteria causada pelas espécies de *Shigella*, que invadem e se proliferam em células epiteliais. Todas essas características são coordenadas pelo plasmídeo que codifica os genes de invasão (TRABULSI, 2005).

A *E. coli* de aderência difusa (DAEC) provocam um alongamento das microvilosidades na mucosa *in vitro*, são caracterizadas pela formação de agregados sobre as células do cólon epitelial. Ela secreta toxinas, porém elas não têm efeito necrosante no tecido (NATARO E KAPER,1998). Esta bactéria é capaz de colonizar ambos os intestinos grosso e delgado e estimular uma secreção mucoide do tipo biofilme que permite a ela uma colonização persistente, de modo que a *E. coli* de aderência difusa tem uma característica epidemiológica importante, pois provoca uma diarreia aquosa persistente, com mais de 14 dias.

1.2.1 Classificações dos Antígenos Lipopolissacarídeos (LPS) para a Detecção de DEC's

Os diferentes tipos de *E. coli* podem ser identificados por antissoros específicos que podem variar de acordo com os antígenos existentes na superfície da membrana bacteriana ou em outras estruturas como flagelos. Esses antígenos podem ser flagelares (H), capsulares (K) ou somáticos (O) (NATARO E KAPER,1998).

Os antígenos (H) são proteínas que se encontram nos flagelos, responsáveis pela locomoção das bactérias. A estrutura do flagelo é formada pela polimerização de uma única subunidade proteica flagelina, codificada pelo gene *fliC*. Esta proteína representa grande potencial para a produção de antígenos capazes de ativar o sistema imunológico (MASSIS, 2007). Muitos genes são necessários para essa movimentação, fazendo dos antígenos flagelares uma alternativa importante para a identificação de *E. coli*.

Os antígenos capsulares (K) também são utilizados para identificar sorotipos de *E. coli*, As expressões das proteínas da cápsula são importantes para o microrganismo, pois cabe a elas a função de proteger a bactéria e sinalizar qualquer forma de ataque do hospedeiro (ORSKOV et al., 1977).

Os antígenos somáticos (O) são polissacarídeos termoestáveis formados a partir do lipopolissacarídeo, presente na membrana externa, encontrado em todas as enterobactérias (ORSKOV et al., 1977).

Dois tipos principais de antígenos de superfície constituem a base para a classificação sorológica das DEC's: o antígeno 'O' ou somático que define o sorogrupo e o antígeno 'H' ou flagelar (FIALHO, 2008).

1.3 Agentes Etiológicos Causadores de Doenças Diarreogênicas

A diarreia é um sintoma provocado por diferentes agentes enteropatogênicos, o quadro clínico da doença pode ser agudo podendo evoluir dependendo das condições de saúde em que o indivíduo se encontra (EDUARDO et al., 2002; PEREIRA et al., 2014). A literatura sobre agentes etiológicos na diarreia infantil disponibiliza muitas informações, porém muitos estudos apresentam uma variação regional para um pequena parte da população. Alguns destes foram selecionados para dar uma ideia da diversidade de agentes etiológicos na diarreia infantil.

No Brasil alguns trabalhos foram realizados: Segundo Vasco e colaboradores (2014) foi realizado um estudo etiológico em comunidades rurais e urbanas no Equador, constatando

que *Rotavirus*, bacilos entéricos e *Salmonella* spp, foram os mais incidentes. Na Nicarágua, Becker-Dreps e colaboradores (2014) encontraram em crianças com idade abaixo de cinco anos e que eram residentes na cidade de Leon, que os agentes etiológicos mais frequentes eram *Norovirus*, *Sapovirus*, *Rotavirus*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e enterotoxigênica (ETEC), *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*.

De acordo com Michelli et al., (2016) o grupo investigou no centro urbano nos municípios de Arismendi, Benítez do estado Sucre, Venezuela, 485 casos de crianças que apresentavam diarreia aguda, com faixa etária entre 0 a 10 anos de idade, atendidas em centros de saúde. Para identificar os agentes enteropatogênicos foram realizados testes com cultura de fezes, sorologia com antissoros polivalentes e monovalentes, além da reação em cadeia da polimerase (PCR). Na técnica de PCR, foram amplificados dois genes EAE e BfpA, e como resultado, foram identificados nas culturas de fezes presença de infecção bacteriana em 39,6%. A prevalência de *E. coli* foi de 54,7%; sendo que (82,9%) dessas cepas foram positivas na sorologia, principalmente em crianças entre 0 e 2 anos, as cepas de *E. coli* foram amplificadas por PCR para o gene “*ae*” e “*bfp*” (48,6%). Destes, 58,8% foram classificados como cepas de *E.coli* enteropatogênica típica (*ae*⁺ e *bfp*⁺).

Um estudo realizado por PCR em Portugal nos anos de 2002 a 2012 em mais de 1000 amostras, sendo as espécies de *E. coli* de ETEC e EPEC os agentes mais frequentes (SILVEIRA et al 2013).

Segundo Souza et al., (2000) foi investigado o perfil etiológico das diarreias agudas de um grupo de crianças de baixo nível socioeconômico atendidas em um serviço regional de pronto-atendimento pediátrico na cidade de São Paulo, no período de março de 1994 a junho de 1996. Foram selecionadas para o estudo 154 crianças com diarreia aguda (GDA) e 42 crianças sem diarreia (GSDA). Os resultados detectaram agentes enteropatogênicos em 112 casos do GDA (72,8%) e em 9 do GSDA (21,5%). A associação de dois ou mais enteropatógenos ocorreu em 47 casos do GDA (30,5%) e em 3 do GSDA (7,1%). Das 105 bactérias isoladas no GDA, 90 eram *E. coli* (27 EPEC, 24 DAEC, 21 ETEC, 18 EAEC), 12 eram *Shigella* sp, 2 eram *Salmonella* sp e uma era *Yersinia* sp.

Em relação às associações entre patógenos associados à diarreia um estudo mostrou a influência da exposição ao vírus HIV e diarreia no Quênia (PAVLINAC et al., 2014). O estudo foi conduzido no período de 2011 a 2013 e foram comparados os patógenos entéricos em crianças infectadas com HIV e crianças que nunca foram expostas ao HIV. De 1076 amostras de fezes de crianças abaixo de 5 anos, o perfil de enteropatógenos nas crianças com HIV ficou alterado em relação as não expostas ao vírus nas seguintes proporções: *E.coli*

enteroagregativa (EAEC) (13,3%); *Giardia* sp. (11,1%); *Campylobacter* spp. (6,3%); *E. coli* enteropatogênica (EPEC) (6,1%); e *Cryptosporidium* spp. (3,7%). O achado importante foi que EPEC e *Cryptosporidium* foram mais prevalentes em crianças que entraram em contato com o vírus HIV, indicando a importância deste patógeno na incidência da diarreia em crianças imunocomprometidas.

No Norte dois estudos foram realizados em Rondônia (2001 e 2006) pelo nosso grupo que ajudaram a dar um caráter temporal à investigação da etiologia da diarreia (ORLANDI et al 2001; 2006). Em 2001, *Rotavirus* foi o mais frequente no Estado de Rondônia seguido por *Shigella flexneri* e *S. sonnei*, *Salmonella* sp, ETEC, EPEC, EIEC e *Yersinia enterocolitica*. E vários casos de infecções mistas também foram encontradas, sendo estas associações entre Rotavirus com EPEC, *Salmonella* sp. Protozoários, *histolytica* e *G.lamblia* (ORLANDI et al 2001). Em 2006, as enteroviroses encontradas foram Rotavirus e Adenovírus. Entre as enterobactérias, *E. coli* diarreogênicas foram as mais incidentes, seguido por *Salmonella* spp e *Shigella* spp. A utilização de PCR diferenciou as diarreogênicas e o estudo encontrou os principais patótipos de *E.coli*, em especial mais virulentas, *E. coli* enteroinvasora, (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágica, (EHEC), além de *E.coli* enteropatogênica (EPEC) típica e atípica, enterotoxigênica (ETEC) e a *E. coli* enteroagregativa (EAEC).

Em Macapá, Porcy e colaboradores (2013) realizaram um estudo com crianças com sintomas e sem sintomas de diarreia, sendo 81 crianças positivas para cada grupo. Verificou-se que a faixa etária mais acometida pela diarreia são crianças de 0-12 meses (61,7%). Em termos de indicadores sócio-econômicos, o estudo demonstrou que famílias com baixa renda em torno de um salário mínimo (63%) e baixo nível educacional, no qual 16% dos pais não possuíam nenhuma escolaridade e 30,9% não chegaram a completar o ensino fundamental, foram o grupo onde se encontram as crianças mais acometidas pela doença. As análises laboratoriais revelaram que os agentes etiológicos mais frequentemente associados à diarreia são as *E. coli* diarreogênicas (40,7%, P= 0,0001), particularmente a ETEC (14,8%), EPEC (7,4%) e EAEC (12,3%) (P= 0,015; 0,013 e 0,005, respectivamente).

1.3.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC) como Causadora de Diarreia Infantil

Historicamente, cepas de *E.coli* foram apontadas nas décadas de 40 e 50 como supostas causadoras de diarreia infantil. As cepas reconhecidas hoje como representante do patótipo EPEC, foram descritas como raras cepas encontradas em indivíduos saudáveis indicando que a EPEC estava relacionada às infecções intestinais (LEVINE et al, 1978). Em

1953, ficou estabelecido que *E. coli* enteropatogênica (EPEC) era a principal responsável pela diarreia infantil durante o Congresso Internacional de Microbiologia realizado em Roma. Devido a esta declaração, Neter e colaboradores (1955) realizaram uma investigação epidemiológica com EPEC selecionando crianças e adultos para determinar os sorogrupos “O”. Naquela época, um teste sensível de hemaglutinação foi desenvolvido para distinguir as cepas patogênicas daquelas encontradas em indivíduos saudáveis e com o qual se percebeu que os lipopolissacarídeos sorogrupo ‘O’ era facilmente adsorvido em células vermelhas do sangue. Este estudo ganhou grande importância epidemiológica e etiológica, pois verificou-se que a hemaglutinação reagia com os lipopolissacarídeos de EPEC.

No Brasil, os estudos sobre etiologia da diarreia infantil, que destacaram EPEC, começaram no final dos anos 80. Esta bactéria foi classificada em 1995 no Simpósio Internacional em São Paulo, de acordo com suas características patogênicas, em dois subtipos: EPEC típica e atípica. As EPEC típicas causam aderência localizada e possuem o plasmídeo EAF (Fator de Aderência de *Escherichia coli*) as EPEC atípicas são desprovidas do plasmídeo EAF tornando-se uma aderência mais lenta e difusa, ambas causam lesão aos enterócitos (**Figura 4**) (FRANZOLIN, et al., 2005).



Figura 4- Ultramicrofotografia de um Enterócito: Ultramicrofotografia de um enterócito mostrando várias *Escherichia coli* enteropatogênicas colonizando sobre a superfície epitelial Fonte: (ROTHBAUM E COLS, 1982).

1.3.2 Epidemiologia da EPEC no Brasil

No Brasil, a mortalidade infantil permaneceu com altas taxas durante um longo período. IBGE (2013). Atualmente, os bons indicativos de declínio de mortalidade vêm contribuindo para a redução de óbitos, no entanto a redução das taxas não acontece

homogeneamente nas cinco regiões do Brasil. As regiões Norte e Nordeste continuam altas com discretas diminuições (**Figura 5**). No Amazonas o último relatório do SIM (Sistema de Informações sobre Mortalidade) de 2014 mostrou 169 mortes por causas evitáveis em crianças na faixa etária de 1 a 4 anos por falhas de diagnóstico e tratamento (**Figura 6**). Este dado corresponde a 10% das mortes no Brasil, e em 2015 foram registrados no Amazonas 628 óbitos entre mortes fetais e infantis pelas mesmas negligências (DATASUS, 2016).

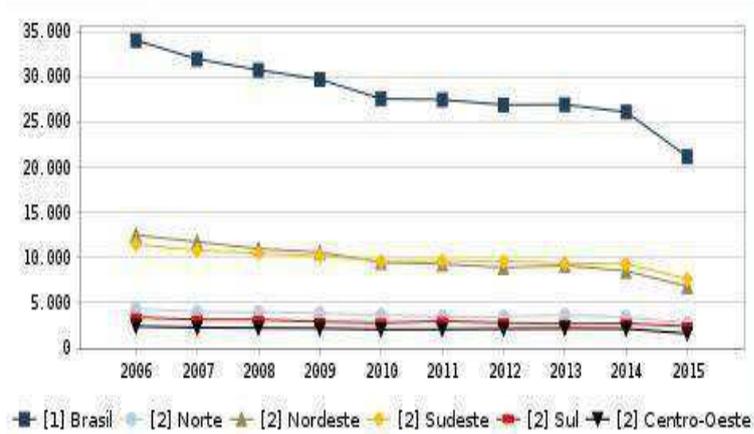


Figura 5- Óbitos Notificados por estado: Número de óbitos infantis (masculinos e femininos) notificados, no ano selecionado e últimos nove anos precedentes. Fonte: SIM – Sistema de informações sobre mortalidade Dezembro de 2015.

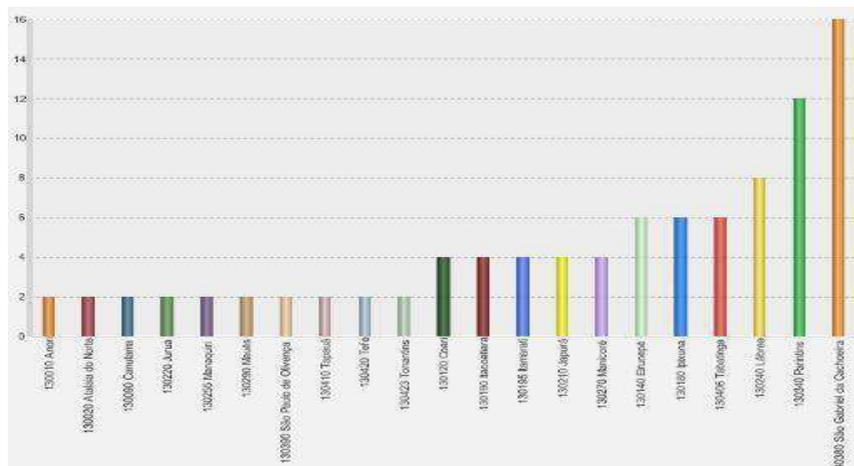


Figura 6- Óbitos por causas evitáveis no Amazonas: Óbitos por causas evitáveis em menores de 5 anos em hospitais e outros estabelecimentos de saúde no estado do Amazonas. Fonte: MS/ SM/CGIAE- Sistema de informações sobre mortalidade- SIM Dezembro de 2014.

Vários estudos identificaram a etiologia das diarreias infantis. As prevalências de EPECs nos estudos mostram que ainda é um fator de risco importante. Na região Norte são poucos os estudos que verificam a prevalência de EPEC.

Regua e colaboradores (2004) investigaram a ocorrência de diarreia em crianças maiores de três anos de idade com e sem sintomas envolvendo 253 crianças. Constatou-se que EPEC foi a principal enterobactéria.

Em Porto Velho/RO vários casos de infecções mistas (Rotavírus com EPEC) (ORLANDI et al., 2001). Em 2006, ambos os fenótipos de EPEC, típica e atípica, foram descritos pela primeira vez na região Norte (ORLANDI et al., 2006). Um novo estudo realizado no período de 2010 a 2012 com 593 crianças de 0 a 6 anos residentes em Porto Velho, que apresentavam quadro clínico de gastroenterite aguda, indicaram a presença de ambas EPECs típicas e atípicas, sendo que as cepas atípicas foram mais predominantes (RODRIGUES, 2013).

Estes resultados apontam alta prevalência de *E. coli* como causadoras de gastroenterites assim como o significativo crescimento de EPEC atípicas. Para um diagnóstico confiável das EPECs é necessário a detecção por testes moleculares, testes sorológicos ou por ensaios celulares tornando-se uma barreira para o sistema público de saúde. Desta forma, a necessidade de novas estratégias rápidas torna-se uma ferramenta de suma importância na identificação desses patógenos.

1.4 Fatores de Virulência da EPEC

Uma vez ligada à superfície epitelial do enterócito a EPEC ocasiona destruição localizada nas microvilosidades, iniciada pela indução de rearranjos de actina que vai estimular a célula a modificar sua fisiologia para adquirir a forma de pedestal. A fixação nos enterócitos por meio das proteínas BfpA e do sistema de secreção do tipo III prejudicam a captação de nutrientes levando a diarreia, e conseqüentemente a desnutrição do indivíduo em casos prolongados (**Figura 7**) (LEBEIS et al., 2008).

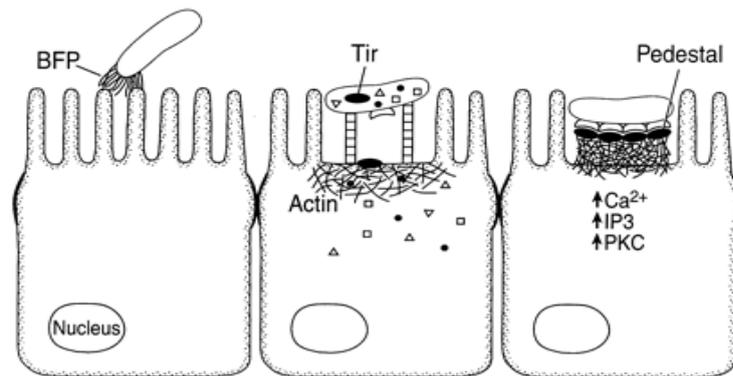


Figura 7 – Mecanismo de Aderência da EPEC: Primeiro contato da EPEC típica se fixando às microvilosidades por meio da (BfpA) formação de feixes de pili. Após o ocorrido, suas proteínas secretadas, como os receptores Tir são exportadas para o meio extracelular, desorganizando o citoesqueleto dos enterócitos e formando um pedestal, promovendo a destruição e perda localizada nas microvilosidades (DONNENBERG et al., 1997).

A ilha de patogenicidade LEE (*locus of enterocyte Effacement*) contém todos os genes necessários para a produção e fixação das proteínas tornando o ambiente favorável para a patologia. Vieira (2009) afirma que as ilhas de patogenicidade (*pathogenicity island* - PAI) codificam vários fatores de virulência, estando dividida em cinco *operons*: LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5. Os *operons* LEE1, LEE2 e LEE3 formam o gene *ler* (*LEE-encoded regulator*) que regula positivamente os genes localizados em LEE e alguns fora dessa região (**Figura 8**) (ELLIOT et al., 2000).

O LEE4 codifica as proteínas EspA, EspB, EspD e EspF. São proteínas translocadoras do sistema de secreção do tipo III (SST3), necessário para a formação da lesão (A/E). O *operon* LEE5 codifica as proteínas intimina e Tir que são responsáveis pela ligação da bactéria à superfície epitelial (NEVES et al., 2003).

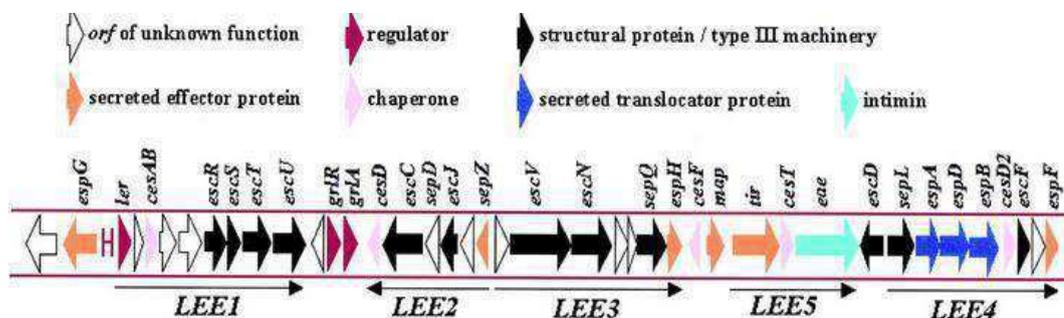


Figura 8- Ilha de Patogenicidade: Organização da ilha de patogenicidade LEE, responsável pela codificação de várias proteínas (GARMENDIA et al., 2005).

1.4.1 Sistemas de Secreção do Tipo III (SST3) e suas Proteínas Efetoras

O Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) (**Figura 9- A e B**) funciona como um complexo de proteínas com a forma de seringa molecular. Estas proteínas são responsáveis pela formação de poros. Sua organização é bastante conservada permitindo a liberação de proteínas efetoras para o interior da célula hospedeira. O poro é formado pelas proteínas EspA, EspB, EspD e EspF sendo o componente principal, pois possui a estrutura filamentosa de superfície estabelecendo contato entre a bactéria e a célula alvo (DANIEL et al., 2001).

A EspB atua com similaridade a EspA, fazendo parte da translocação, e atuando com função transitória nos primeiros momentos da aderência às células do hospedeiro.

Segundo os estudos de Hartland e colaboradores (2000), a EspB associa-se aos filamentos EspA em células hospedeiras infectadas, porém a EspB não é necessária para a ligação dos filamentos à superfície da célula hospedeira. A EspD também auxilia na formação dos poros fazendo a translocação e participando nas mudanças dentro da célula. A EspB e EspD são inseridas na membrana de células infectadas para formar um poro de translocação (KNAPPSTEIN et al., 2004).

Outras proteínas secretadas SST3 são conhecidas como efetoras, entre elas: Mapa, EspF, EspG e EspH. EspF é uma proteína rica em prolina efetora que contém três repetições ricas em prolina em EPEC. A EspF é responsável por destruir a função da barreira intestinal além de induzir a apoptose das células infectadas (DONNENBERG et al., 2001). A proteína Mapa interfere na integridade potencial de membrana mitocondrial diminuindo a geração de energia para a célula. EspG está envolvida na desestabilização dos microtúbulos. A EspH modula os filamentos de actina para formação do pedestal (GARMENDIA et al., 2005).

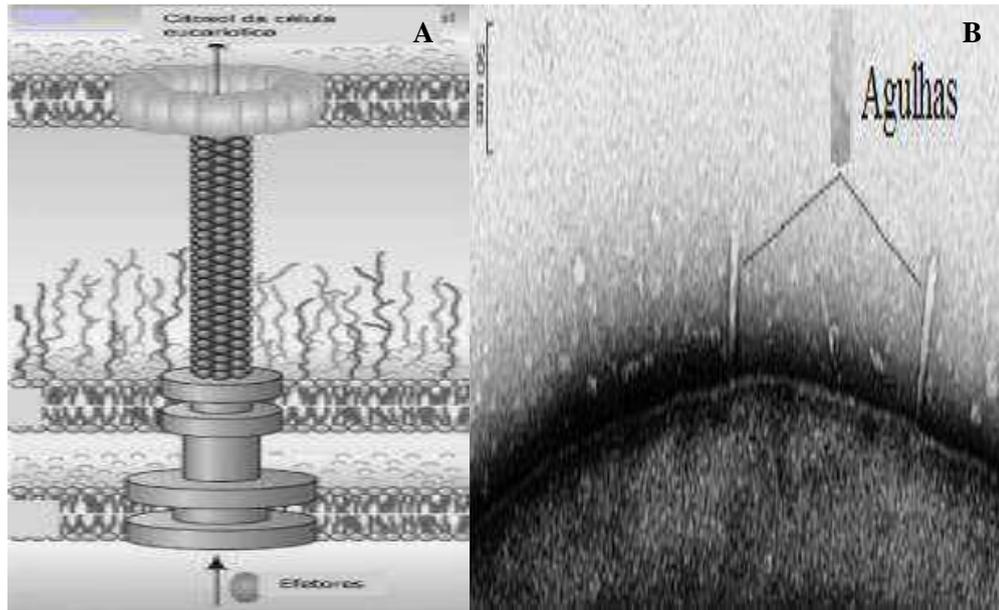


Figura 9- A) T3SS: Sistema de Secreção Tipo III Fonte: (Vieira et al., 2001). **Figura B)** Seringa Molecular: Microscopia eletrônica do sistema de secreção penetrando a membrana da célula hospedeira (Vieira et al.,2009).

A intimina é uma importante proteína de membrana externa com função de adesina responsável pela adesão íntima da bactéria com a célula eucariótica. Seu transporte ocorre pela via de secreção. Possui duas regiões importantes: N-terminal que é bem conservada e C-terminal, que varia em relação aos tipos de intiminas. Seu receptor é denominado proteína Tir (receptor da intimina-translocado) (GARMENDIA et al., 2005).

Tir também é uma proteína efetora. Contém dois domínios transmembranares que, ao entrar no citoplasma, iniciam um processo de fosforilação formando um gancho no interior da célula hospedeira para se conectar com a intimina. Tir possui a região amino e carboxi-terminal capaz de interagir com outras proteínas para a formação do pedestal. (GARMENDIA et al., 2005). Após serem sintetizadas, estas proteínas facilitam a colonização da *E.coli* enteropatogênica (EPEC) à superfície das células do intestino (**Figura 10**) (ELLIOTT et al., 2000).

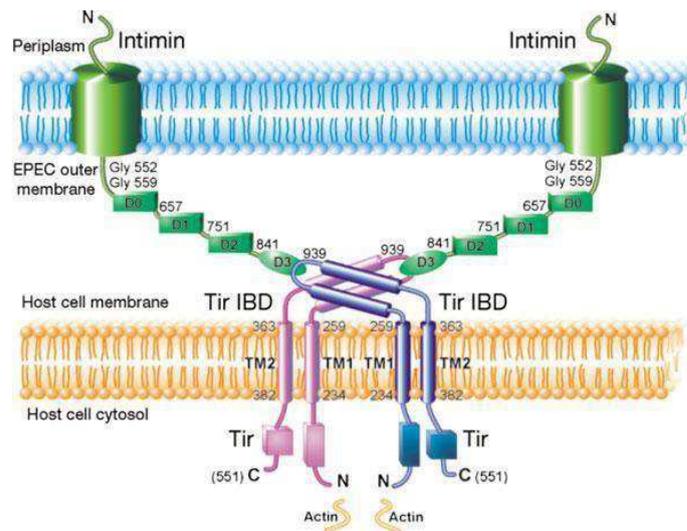


Figura 10-Desenho esquemático da proteína TIR: Desenho esquemático, representando dois domínios transmembranares que, ao entrar no citoplasma, iniciam um processo de fosforilação formando um gancho no interior da célula hospedeira para se conectar com a intimina. Fonte: Yu Lou, 2000.

EPEC típica tem uma proteína que estabelece o primeiro contato BfpA. Esses filamentos formam uma ligação direta entre a bactéria e a célula hospedeira através do seu pili do tipo IV, conhecido como Bfp ou Feixe Formador de pilus (*Bundle-forming Pilus*). Eles são necessários para fixação, além de estimular a bactéria a produzir outras proteínas resultando no rearranjo das actinas (BUERIS, 2008).

1.4.2 Lesão *attaching and effacing* A/E

A infecção por EPEC típica se caracteriza pelo tipo de adesão reconhecida como aderência localizada e por seu plasmídeo EAF. A lesão do tipo *attaching and effacing* (*destruição e apagamento*) (A/E) inclui várias etapas: o primeiro contato é estabelecido pelos feixes formadores de pilis (Bfp) que é codificado pelo fator de aderência (EAF), posteriormente várias proteínas (EspA, EspB e EspD) são secretadas promovendo um processo de transdução de sinal para o enterócito. Juntas atuam no estágio intermediário da infecção (FRANKEL et al., 1998).

O estágio final é caracterizado pela sinalização da célula do hospedeiro para receber a proteína bacteriana intimina, cujo gene responsável é o *eae*. Ela faz o contato íntimo com a

célula, as proteínas efetoras, como Tir, são transferidas para a célula hospedeira, criando receptores de ligação para a intimina. Essa interação induz o rearranjo do citoesqueleto (α -actina, talina e ezrina) e de outras estruturas ocorrendo a acumulação de actina polimerizada, formando o pedestal (**Figura 11**) (FRANKEL et al., 1998).

A aderência localizada, uma lesão do tipo *attaching and effacing*, (*destruição e apagamento*) foi descrita em estudos com a EPEC típica. Ela se caracteriza pela adesão e o primeiro contato é estabelecido pela Bfp. A aderência da EPEC atípica é difusa ainda não está bem descrita, porém sabe-se que ocorre mais lentamente e que é independente de BfpA. E, por isso, a detecção molecular ou sorológica da Bfp permite a distinção da EPEC atípica sem a necessidade de teste de adesão em células.

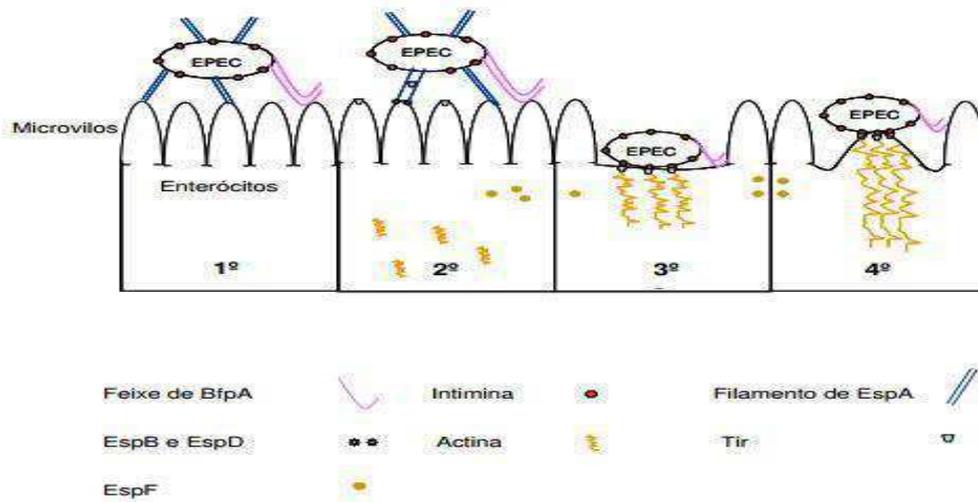


Figura 11- Esquema da infecção da *E.coli* enteropatogênica: Esquema da infecção de EPEC promovida pela sucessão de proteínas extracelulares no primeiro estágio da infecção. 1º. As proteínas estabelecem contato com a célula. 2º. Filamentos de EspA transportam, através de sua estrutura, proteínas efetoras. 3º. Tira o entrar no citoplasma é fosforilada para atuar como integrina na superfície da membrana. 4º. Ocorre o contato íntimo formando o pedestal (adaptada de CLARKE et al., 2002).

1.4.3 Ferramentas de Diagnósticos realizados em *E. coli* Enteropatogênica.

O diagnóstico em EPEC pode ser realizado por importantes técnicas: As técnicas de PCR servem como diagnóstico moleculares produtos de PCR ou sondas podem estar identificando a presença ou ausência do plasmídeo EAF e outros genes de virulência. A Bfp é regulada por um *operon* com 14 genes localizado na membrana externa (SOHEL et al., 1996). A proteína Bfp tem semelhanças com outros tipos de proteínas de *E.coli*, pois pertencem a

família pilina do tipo IV. Suas sequências, no entanto, diferem entre si podendo ser utilizadas como marcador molecular em EPEC típica. BfpA possui em sua subunidade maior a massa molecular de 19,5 kDa e, junto com outros produtos, permite uma interação da EPEC com a célula hospedeira. Esse primeiro contato permite que outras proteínas do SST3 possam destruir a célula (RAMBOARINA et al., 2005).

Kits comercializados pela Empresa Biopharma RIDA®GENE//baseiam-se na técnica de PCR em tempo real para detecção qualitativa em amostras de fezes identificando a presença dos seguintes patógenos: EHEC, STEC, EPEC, EIEC/*Shigella* spp, EAEC, ETEC, EIEC

Alguns estudos utilizam a técnica PCR multiplex para identificação das *Escherichia coli* diarréogênicas, essa técnica possibilita o estudo de diferentes genes de virulência, os principais alvos dentre os genes estudados para EPEC selecionados na PCR multiplex são “*eae*” e “*BfpA*” (HEGDE et al, 2012).

Testes sorológicos também são utilizados na identificação de *Escherichia coli* enteropatogênica alguns já disponíveis identificam sorogrupos, antissoro Polivalente A contendo anticorpos contra os antígenos (O): Identifica as *E. coli* 026, 055, 0111 e 0119. Polivalente B: contém anticorpos contra as *E. coli* 0114, 0125, 0142 e 0158. Polivalente C: contém anticorpos contra as *E. coli* 086, 0126, 0127 e 0128 esses Antissoros podem ser polivalentes ou monovalentes para identificar sorogrupos de EPEC, assim como a geração de anticorpos, alguns antígenos presentes na proteína identificam especificamente as EPEC típicas (GIRÓN et al. 1995).

Os testes bioquímicos são realizados para identificar *E.coli*, analisando a mobilidade, a fermentação de salicina, formação de gás a partir da fermentação da D- glicose, produção de indol entre outros, porém este teste identifica somente o gênero e não a espécie (VAN DEN BELD et al., 2012).

Os testes fenotípicos, com células, considerados como padrão ouro são realizados em células HeLa ou HEp-2 cultivadas in vitro. Neste teste observa-se o tipo de adesão das *E.colis* enteroaderentes, quando as EPEC conseguem aderir por meio da fimbria BFP em uma extremidade da célula, e fazem isto de 3 a 6 horas, elas possuem um padrão de adesão conhecido como padrão de adesão localizado (AL) após 6 horas o padrão conhecido é de adesão localizada like (ALL), este teste consegue separar a EPEC típica da EPEC atípica (GIRÓN et al. 1991).

Os testes de Imunofluorescência (que é uma técnica que permite a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares utilizando corantes fluorescentes, que

absorvem luz e a emitem num determinado comprimento de onda) são utilizados apenas nos laboratórios de pesquisa, devido seu alto custo. Em um estudo de Munhoz (2015) pode-se observar a fimbria ECP de *Escherichia coli* enteropatogênica atípica, por imunoflorescência com antissoro de coelho anti- ECP.

Os testes imunocromatográficos (IC) são simples e podem ser usados em qualquer lugar para detecção de diferentes patógenos ou substâncias. Estudos de Rocha (2012) patronizaram testes imunocromatográficos para as espécies de ETEC e STEC servindo como diagnóstico rápido.

Várias pesquisas têm levado a buscar diferentes alternativas para diagnosticar patógenos, as principais patentes foram pesquisadas neste estudo como inovações tecnológicas para diagnóstico.

1.4.4 Levantamento de Patentes

Foi realizado o levantamento de patentes com a finalidade de verificar quais as prováveis proteínas específicas da EPEC que já estariam patenteadas. O site utilizado foi a plataforma *Derwent Innovations Index - DII* (Thomson Reuters Scientific).

Na busca de patentes foi observado que os estudos estão direcionados para as proteínas EspA, EspB, EspD e suas variantes, além das intiminas alfa, beta, gama e o seu translocador Tir. Estas proteínas estão sendo utilizadas para diagnosticar microrganismos em amostras biológicas ou em alimentos, além de reconhecer polinucleotídeos. Alguns estudos avançam no desenvolvimento de sondas, outros utilizam partículas com funções microbiológicas contra infecções. Dentre as patentes levantadas que se relacionam ao presente estudo foram encontrados os seguintes resultados:

***US2003166841-A1 (2003) New purified protein called EspB or EspA isolated from enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), useful for diagnosing whether a subject has been infected with EHEC, Inventores: KAPER J B, JARVIS K.**

A presente invenção refere-se a novas proteínas que são segregadas a partir de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), o agente patogênico responsável pela diarreia sanguinolenta e síndrome hemolítica urêmica (HUS) em seres humanos. Os objetivos da invenção foram proporcionar proteínas que fossem segregadas a partir de EHEC e desencadear uma forte resposta imune. Obteve-se uma proteína de 37kDa (EspB) segregada a

partir de *E. coli* 0157:H7; Obteve-se uma proteína de 24kDa (EspA) segregada a partir de *E. coli* 0157:H7; foram Obtidos genes que codificam as proteínas segregadas a partir das Esp de *E. coli* 0157:H7; Teste de sorodiagnóstico, tais como ELISA ou *Western Blot* foram realizados para determinar a presença de proteínas secretadas Esp em organismo ou de humanos ou vacas; foi desenvolvido um Kit de teste para diagnóstico de seres humanos e vacas, neste KIT a utilização de um substrato revestido com as proteínas Esp irá diagnosticar a presença de anticorpos para as proteínas secretadas de *E. coli*.

***WO200062069-A1 (2000) Detecting intimin-expressing microorganisms such as enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in a sample, involves contacting the sample with antisera raised against intimin alpha, beta and gamma, Inventores: Batchelor M, G DOUGAN, FRANKEL G.**

Esta referiu-se a triagem de amostras para a infecção por microrganismos enteropatogênicos ou enterohemorrágicos, dispondo de contato com antissoros contra intiminas (IN) da região Gly387, e região Lys666 de *eae* (R1) ou seus fragmentos antigênicos, polipeptídeos isolados ou recombinantes que tenham R1 derivados de polipeptídios em alfa, beta ou gama, ou polipeptídeo tendo 75% de semelhança com os intiminas. O objetivo foi detectar a intimina e seus fragmentos.

***WO 200274812-A2 (2002) Antibodies specific for an attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) virulence-associated protein, useful for Preventing infection or intestinal attaching and effacing Preventing (A / E) intestinal lesions in mammals AEEC inventores :Fairbrother JM , HAREL J , BATHISSON I , GIRARD F , Guimond M , Fairbrother J.**

Esta invenção refere-se a produtos, composições e métodos e à sua respectiva utilização na prevenção de uma infecção EAEC (*E. coli* enteroagregativa) em um mamífero. O anticorpo da presente invenção é imunologicamente específico para EAEC e está associado à virulência. A proteína é capaz de prevenir uma infecção EAEC intestinal *in vivo* quando administrada a um mamífero. Objetivo: Este anticorpo é capaz de evitar o desenvolvimento A/E, lesões intestinais associadas com EAEC.

***WO9924576-A1 (1998) New translocated intimin receptor useful for treating infection by enteropathogenic or enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Inventor(es): FINLAY B B, KENNY B, DEVINNEY R, STEIN M, FINLAY B B B L, KENNY B B L,**

DEVINNEY R B L, STEIN M B L, FINLAY B, KENNY B L, STEIN M C S P A, FINLAY, DEVINNEY R B, FINLAY B B B, STEIN M I C S P, STEIN M I C S.

Um polipeptídeo denominado Tir (Receptor Translocador de Intimina) é segregado pela lesão A/E de agentes patogênicos, tais como EPEC e EHEC. Estes agentes patogênicos bacterianos inserem os seus próprios receptores na superfície das células de mamíferos, no qual o agente patogênico bacteriano adere e então desencadeia eventos de sinalização adicional do hospedeiro e a nucleação da actina. Objetivos: Tir pode ser usado para diversas análises de acordo com suas utilidades como a indução de uma resposta imune em seres humanos ou bovinos contra EPEC ou EHEC. Os polinucleotídeos Tir podem ser utilizados como sondas para detectar sua presença numa amostra. Também pode ser usado para detectar um citoesqueleto celular e identificar compostos que interferem com a ligação de Tir/Intimina. As proteínas de fusão de Tir podem ser usadas em *Escherichia coli* atenuadas para induzir uma resposta imune mediada por células de interesse.

***WO 9941614-A2 (1999) Detecting microorganisms that express intimin, for diagnosis of infection, e.g. by enteropathogenic *Escherichia coli*, inventores: BATCHELOR M, DOUGAN G, FRANKEL G.**

Microrganismos que expressam intimina são detectados tanto por sua reação com os antissoros ou por amplificação do DNA por PCR com iniciadores específicos. O objetivo foi desenvolver um método que pudesse detectar amostras em alimentos ou diagnosticar infecções causadas por EPEC e EHEC.

*** WOS A1995TF96700060(1995) MONOCLONAL-ANTIBODIES SPECIFIC FOR THE BUNDLE-FARMING PILUS OF ENTEROPATHOGENIC *Escherichia-coli* inventores: GIRON, JA (GIRON, JA); QADRI, F (QADRI, F); AZIM, T (AZIM, T); JARVIS, KJ (JARVIS, KJ); KAPER, JB (KAPER, JB); ALBERT, MJ (ALBERT, MJ)**

A invenção refere-se aos anticorpos monoclonais ICA2, ICA3 e ICA4 que foram produzidos e purificados a partir da cepa EPEC B171 (O111: NM). No estudo estes anticorpos conseguiram reagir por imunoblot com diferentes epítomos da subunidade da BFP. O objetivo foi desenvolver anticorpos monoclonais que pudessem ser utilizados para estudos epidemiológicos. Este estudo foi utilizado para verificar o mapeamento antigênico e domínios

funcionais de BFP que foi isolada e purificada.

Os produtos tecnológicos para diagnósticos sorológicos relacionados a este estudo muitos já se encontram no mercado comercial, a baixo podemos constatar algumas empresas que produzem em alta escala a produção de anticorpos para diagnóstico.

1.4.5 Produtos Comerciais

Existem anticorpos comercializados para vários fins. Na busca por produtos comerciais foi utilizado o site BIOCOMPARE disponível na internet (<http://www.biocompare.com/antibodies>) onde foram identificados os anticorpos que estão sendo comercializados, porém com um custo elevado. Dentre os produtos encontrados, comercializados pela empresa *antibodies-online* encontram-se:

- anti-EspA: anticorpo monoclonal específico para EHEC e EPEC;
- anti-EspB: anticorpo primário policlona específico para EHEC e EPEC;
- anti-EspB: anticorpo primário monoclonal específico para *E. coli*;
- anti-EspD: anticorpo primário monoclonal específico para *E. coli*;
- anti-EspE: anticorpo primário monoclonal específico para EHEC e EPEC

Estes anticorpos são específicos para análises de diagnósticos. O fato de estes produtos serem onerosos eleva a importância deste trabalho em desenvolver anticorpos policlonais que servirão como ferramentas para os estudos de identificação e controle do processo fisiopatológico da diarreia.

2 JUSTIFICATIVA

As doenças diarreogênicas ocasionadas pela EPEC típica são frequentes em países como o Brasil. Os elevados números de casos da doença preocupam a Organização Mundial da Saúde, uma vez que a população mais atingida são crianças. Na tentativa de desenvolver ferramentas para a identificação, estudos mostraram algumas proteínas associadas a virulência específicas a esta bactéria que podem ser utilizadas em ensaios de identificação. Esses conhecimentos fornecem dados importantes para possíveis diagnósticos rápidos e eficazes para detectar a presença do patógeno. Desse modo, esta pesquisa propôs identificar sequências de epítomos presentes na proteína BfpA preditas em algoritmos para a produção de peptídeos sintéticos e geração de anticorpos policlonais, possibilitando o reconhecimento deste fenótipo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir anticorpos policlonais funcionais contra os peptídeos sintéticos referentes à proteína BfpA da *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC).

3.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar epítomos das proteínas BfpA com alta probabilidade de reconhecimento por células B;
- Produzir anticorpos contra os peptídeos sintetizados;
- Avaliar a resposta imunológica frente à imunização;
- Avaliar o reconhecimento do antissoro produzido contra a proteína BfpA nativa em EPEC.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho Experimental

O desenho experimental deste estudo está representado no esquema simplificado na **Figura 12**.

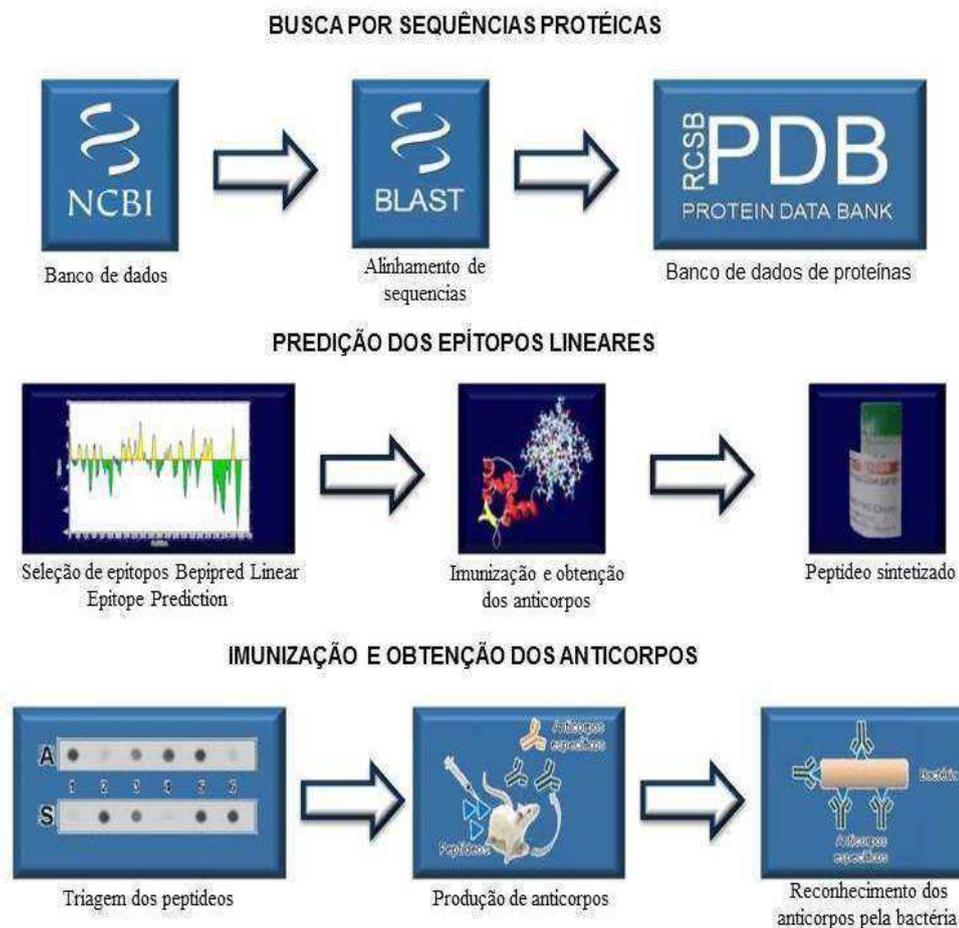


Figura 12 - Esquema representativo da metodologia utilizada no trabalho.

4.1.1 Moldes da Estrutura 3D das Proteínas BfpA

A ferramenta *Protein Database Bank PDB RCSB* (<http://www.rcsb.org/pdb>) é um banco de dados que consiste no depósito de informações de várias proteínas, onde o mesmo disponibilizou a estrutura tridimensional da BfpA número de acesso (1ZWT).

4.1.2 Acessibilidade de Epítomos nas Proteínas BfpA

O programa PDB disponibiliza o software *swiss pdb viewer (epitopos swiss pdb viewer)* para mapear os epítomos lineares e conformacionais de acordo com a estrutura 3D da proteína. Esses epítomos antigênicos foram visualizados de maneira gráfica a fim de verificar sua acessibilidade com os linfócitos B.

4.1.3 Desenho e Seleção dos Peptídeos Sintéticos

A plataforma de dados *GenBank* disponibilizou a sequência da proteína BfpA sob o número de acesso CAS07439.1, pertencente à cepa modelo E2348/69 de EPEC, com intuito de verificar regiões antigênicas das proteínas BfpA foram utilizadas ferramentas de bioinformática para selecionar epítomos específicos que possivelmente possam promover uma reação imunológica em camundongos. Esses peptídeos foram utilizados para a geração de anticorpos, onde foram monitorados e identificados por testes imunoenzimáticos. Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório FIOCRUZ, Instituto Leônidas e Maria Deane – ILM D em parceria com o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

As sequências encontradas em regiões antigênicas foram sintetizadas na forma de peptídeos. Essa prática de sintetização é utilizada desde a década de 50, quando vários peptídeos ativos foram descobertos tornando-se uma alternativa rápida e prática para a produção de antissoro. (AGUIRRE, 2014; GÓMEZ et al., 1998; HANCOCK E O'REILLY, 2005; MACHADO et al., 2004). Para a construção dos peptídeos sintéticos da proteína BfpA da EPEC, foi realizada uma busca no banco de dados de sequências genéticas *Gen Bank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Posteriormente as sequências foram selecionadas e comparadas utilizando a ferramenta *Blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com a finalidade de verificar suas regiões de similaridade entre as espécies bacterianas. As similaridades entre as sequências obtidas nesta análise formaram um conjunto de informações que foram comparadas com as ferramentas de bioinformática, indicando que estas sequências poderiam ser possíveis candidatas a formação de anticorpos.

As ferramentas de bioinformática pelas estratégias de algoritmos promoveu interação entre estes epítomos antigênicos da proteína selecionada e os linfócitos B. Essas interações foram observadas pelo programa *Bepipred Linear Epitope Prediction* (IEDB Analysis Resource – <http://tools.iedb.org>) cujos parâmetros constam a seguir:

4.1.3.1 Previsão *Beta Turn* ou Conformação Chou e Fasman

A simulação com o parâmetro beta para a conformação dos epítomos é o método útil para selecionar as regiões que formam estruturas secundárias das folhas alfa (α) e beta (β), baseadas em aminoácidos que irão determinar as voltas ou “*loop*” que, segundo os cálculos dos algoritmos, são regiões de rotação para fazer a interação com linfócitos B (CHOU E FAZMAN, 1978).

4.1.3.2 Emini - Escala de Acessibilidade de Superfície

Emini e colaboradores (1985) desenvolveram um cálculo baseado na escala de acessibilidade superficial indicando a probabilidade dos peptídeos serem encontrados na superfície da proteína.

4.1.3.3 Karplus e Schulz - Escala de Flexibilidade

Este método é baseado no estudo de temperaturas conhecido como carbono 31 das proteínas para verificar a flexibilidade nos segmentos de aminoácidos das regiões antigênicas (KARPLUS E SCHULZ, 1985).

4.1.3.4 Kolaskar e Tongaonkar - Escala de Antigenicidade

Este método é semi-empírico utilizando as propriedades físico-químicas dos resíduos de aminoácidos nas proteínas e nas frequências de epítomos segmentais. A ocorrência permite prever os determinantes antigênicos de proteínas (KOLASKAR E TONGAONKAR, 1990).

4.1.3.5 Escala Hidrofilicidade

Os parâmetros hidrofílicos são utilizados para prever quais resíduos de aminoácidos são antigênicos quando comparados com a retenção de Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) (PARKER et al., 1986).

4.1.3.6 BepiPred - Predição Linear em Epítomos de Células B

A ferramenta BepiPred utiliza uma combinação com o modelo oculto de Markov que busca, através de várias análises estatísticas, encontrar parâmetros desconhecidos propondo o quanto a sequência antigênica é capaz de interagir com os linfócitos de células B (LARSEN et al., 2006).

4.2 Sintetização dos Peptídeos

As sequências dos epítomos lineares foram preditos e selecionados com auxílio das ferramentas de bioinformática como consta acima, após, foram encaminhadas para a empresa PEPTIDE Chantilly Virginia Estados Unidos. Os peptídeos foram sintetizados com 3mg/ml e diluídos em 1ml de PBS1X.

4.2.1 Acoplamento dos Peptídeos

Com o objetivo de aumentar a resposta imunogênica dos camundongos, os peptídeos sintéticos foram conjugados com uma proteína carreadora BSA (albumina de soro bovino). O peptídeo foi acrescentado e homogeneizado a 600 µg/mL a concentração do BSA (1mg). Após a reação foi preparada uma solução de glutaraldeído a uma proporção final de 0,2 % V/V e incubado a 4°C com a reação de BSA + peptídeo. O glutaraldeído foi adicionado lentamente em proporções parceladas sobre a reação. Após 60' foi adicionado 100 mM de glicina pH 7,2 a fim de reduzir as Bases de Schiff. A reação final foi dialisada contra solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,1X) pH 7,5 durante 16h a fim de retirar os sais e os peptídeos não acoplados. O produto de conjugação foi armazenado a 4°C (GOMEZ, et al.,1998).

4.3 Comitê de Ética Animal

Todo o procedimento foi realizado de acordo com a legislação Brasileira Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA segundo e conforme a Lei Nº. 11.794, de 08 de outubro de 2008. O projeto foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do Instituto de Pesquisas do Amazonas (INPA) sob o número 016/2015.

4.4 Produção do Antissoro

Para a produção de antissoro contra a bactéria EPEC típica 2348/69 foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus* com aproximadamente 6 semanas de idade. A suspensão foi cultivada no Caldo Luria Bertani (LB) a 37° C a 200 rpm por 16 horas. Após o crescimento foram centrifugadas 5000 rpm a 4°C, o centrifugado foi lavado duas vezes com solução fisiológica (PBS1X) e ressuspenso até atingir a densidade óptica de 1×10^8 UFC/mL no espectrofotômetro a 600nm. O inoculo foi preparado por diluição 10^5 UFC/mL seriada pela escala nefelométrica de McFarland.

Para a produção de anticorpos específicos foram injetados por via intraperitoneal 100µl com emulsão do adjuvante completo de Freud, no total de três imunizações, o sangue total foi coletado e armazenado a -20°C.

4.5 Seleção dos Peptídeos Sintéticos por Dot Blot

Os peptídeos sintéticos e o controle positivo (lisado bacteriano *E. coli* EPEC 2348/69) foram diluídos 0,5µl da concentração 3000mg/ml e transferidos para membrana de nitrocelulose, em seguida a membrana foi bloqueada em uma solução diluída do anticorpo primário 1:100 (soro anti- *E.coli*), os peptídeos foram incubados com os anticorpos específicos por 30 minutos em temperatura ambiente com leve agitação, as lavagens foram processadas e reveladas usando o kit Western Breeze® Chromogenic Immunodetection protocol (invitrogen) conforme o protocolo fornecido pelo fabricante.

4.6 Procedimentos de Imunização em Camundongos com Peptídeo Sintético

4.6.1 Grupos Experimentais

Os animais foram distribuídos de forma aleatória nos seguintes grupos:

1-Grupo controle – animais que receberam apenas a proteína BSA;

2-Grupo com peptídeo P3 – animais que receberam apenas o peptídeo 3 da proteína BfpA;

3-Grupo com peptídeo P6 – animais que receberam apenas o peptídeo 6 da proteína BfpA.

4.6.2 Indução para Produção de Anticorpo

Para a produção de anticorpos contra a proteína BfpA, foram usados animais como citados acima pertencentes a espécie *Mus musculus*, antes das imunizações foi realizado uma mínima sangria pela cauda de cada animal para obtenção do soro utilizado como controle negativo. A suspensão contendo 50ng/ μ l de peptídeo sintético diluídos em PBS 1X foi homogeneizada, após, a solução foi emulsificada com adjuvante completo de *Freud*, e inoculada 50 μ l por via intraperitoneal nos animais, tendo como referência o estudo de Oliveira (2006).

A cada 15 dias os animais receberam os reforços contendo 50ng/ μ l de antígenos com adjuvante incompleto de *Freud* totalizando 2 reforços. O sangue total foi coletado 15 dias após o último reforço através da punção cardíaca. O animal sob anestesia, 0,02mL com quetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) recebeu uma sucção lenta no centro do coração, a fim de se obter antissoro mais eficiente. O monitoramento da resposta imune contra os peptídeos sintéticos foi avaliado pelo teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

4.7 Ensaio Imunoenzimático

4.7.1 ELISA Indireto (*enzyme linked immuno sorbent assay*)

A técnica foi realizada em placas contendo 96 poços de fundo chato. A placa foi sensibilizada na concentração de 4 μ g/ml de antígenos diluídos em solução de carbonato de sódio e bicarbonato de sódio 0,1M pH 9,6, sendo aplicados 50 μ l em cada poço e incubada a 4°C por 16 horas. Após a sensibilização, a placa foi lavada 3x com PBS 1X- Tween 0,02% e, em seguida, bloqueada com a solução salina tamponada com fosfato (PBS 1X) e BSA por um período de 2 horas a 37°C. Foi adicionado o antissoro do animal como anticorpo primário na diluição 1/10 e incubado por mais 1 hora em estufa a 37°C. Passado esse período, foi lavado novamente 3x com PBS 1X-Tween 0,05%. Posteriormente, o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com a enzima Horseradish Peroxidase (HRP), foi adicionado a placa e levado a estufa por 1 hora a 37°C. Após este período de incubação, a placa foi lavada 3x com PBS 1X Tween 0,02%. A revelação foi realizada com uma solução contendo substrato (tetrametilbenzidina) TMB e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e incubada por 15 minutos em uma câmara escura. A reação foi interrompida com ácido clorídrico (2M). A leitura da D.O

foi realizada no espectrofotômetro a 450nm (CLARK et al. 1986).

4.8 Seleções das Cepas Padrões para o Teste de Adesão

A seleção das cepas padrões para os testes de citometria de fluxo foram obtidas pelo banco de dados da plataforma de bioensaio do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD. As cepas padrões foram identificadas pelo teste de adesão e identificadas pela técnica de PCR, são elas (EPEC 04) ATCC E2348/69, (ETEC) ST8, (EPEC 16) 2348/69 (EPEC23) C275153, (EPEC 17) ATCC E234869, (EHEC) EDL -933 171-0157:H7, (EIEC) 1381- invasiva. As cepas foram cultivadas em meio Luria Bertani (LB) líquido a 37 °C 200 rpm por 16 horas para o teste de adesão.

4.9 Cultivos de Células HEp- 2

A capacidade de adesão das amostras a células HEp-2, originárias de carcinoma de laringe humana, foi realizada de acordo com a técnica descrita por Cravioto et al., (1979), com algumas modificações.

As células HEp-2 foram cultivadas em frascos de plástico de 25 cm² de superfície de crescimento (Corning), contendo 6,5 ml de meio MEM (Anexo 4), acrescido de 10% Soro Fetal Bovino (Cultilab); MEM - SFB 10%, e mantidos em estufa a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por três a quatro dias. Após este período, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada com 2,5 ml de solução de tripsina a 0,25%. Em seguida, mais 2,5 ml desta solução dispersante foram adicionados e deixados em contato com a monocamada celular por dois a quatro minutos, à temperatura ambiente. Tendo se iniciado o desprendimento celular, todo o volume de tripsina foi retirado (a fim de se evitar o seu efeito tóxico). Para as células se desprenderem por completo, o frasco foi manual e levemente agitado, e 5 ml de MEM - SFB 10% foram adicionados. Através de repetidas e vigorosas pipetagens, com o devido cuidado, para não haver formação de bolhas de ar, obteve-se uma suspensão celular homogênea.

Posteriormente, procedeu-se à contagem do número de células viáveis dessa ressuspensão celular, utilizando-se do método de exclusão pelo corante Azul Tripán (SCHREK, 1936), quando finalmente foi feita diluição apropriada em MEM – SFB 10% (v/v), de modo a ser obtido uma concentração de 10⁵ células por/ml.

4.9.1 Inoculo Bacteriano

Foram adicionados 50µl de suspensão bacteriana aos orifícios dos poços contendo células HEp-2 cultivadas em MEM – SFB 10% (v/v) para iniciar a adesão e colocados novamente para incubar por 6 horas.

4.9.2 Ensaio de Adesão e Invasão *in vitro* às Células HEp-2

Para a realização dos testes de adesão alíquotas de um ml dessa ressuspensão celular, foram distribuídas em cada uma das lamínulas colocadas em cada orifício das placas de cultura de células de 24 orifícios (Costar). Em seguida, os cultivos celulares foram incubados em estufa a 37° C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por 24 horas. A partir do estoque em ágar nutriente, as amostras bacterianas foram semeadas em 3 ml de TSB e incubadas a 37° C por 16/18 horas.

Inicialmente, o meio de cultivo MEM - SFB 10% (v/v) foi retirado dos orifícios de cultura contendo a monocamada incompleta de células HEp-2, realizando-se, em seguida, três lavagens com solução tampão salina – fosfato de Dulbecco - Vogt, pH 7.4 (PBS - D - V). Posteriormente, foram acrescentados: 0,96ml de novo meio MEM, contendo 2% de soro fetal bovino (MEM - SFB 2%) e 1% (v/v) de D – Manose, para inibir a adesão bacteriana devido à fímbria tipo I, e 40µl de crescimento bacteriano em TSB. Após incubação desse sistema durante 3 horas em estufa a 37° C, o meio de cultivo foi removido e a monocamada celular lavada por cinco vezes com PBS, a fim de se retirarem às bactérias que não se aderiram às células em cultivo. Em seguida, as células foram fixadas com uma solução de ácido pícrico 1,22%, formaldeído 40% e ácido acético glacial por 10 minutos. Após esse período as células foram lavadas por duas vezes e coradas com soluções do Kit de coloração Panótico Rápido (Laboclin) por um minuto. Decorrido esse tempo, as preparações foram lavadas em água corrente, secas à temperatura ambiente ou a 37° C e observadas ao microscópio óptico, com os aumentos de 400 e 1000 vezes. Como controle das células HEp-2, reservou-se uma lamínula de células HEp-2 sem bactérias. As amostras bacterianas que não apresentaram um padrão de adesão claramente definido após 3 horas de incubação foram submetidas a novo teste, estendendo-se o período de incubação para 6 horas. Neste caso, posteriormente à incubação inicial de 3 horas a 37° C, as monocamadas celulares foram lavadas três vezes com PBS e incubadas por um período adicional de 3 horas após ter sido adicionado novo meio

MEM --SFB 2% (v/v).

Na leitura dos resultados foram considerados os seguintes padrões de adesão:

- *Adesão localizada* (AL), caracterizada pela formação de micro colônias de bactérias aderidas a sítios localizados da célula;
- *Adesão difusa* (AD), com bactérias aderidas ao acaso, por toda a superfície celular;
- *Adesão agregativa* (AA), quando as bactérias se aderem sobre a célula e nos espaços intercelulares, lembrando a disposição de tijolos empilhados (“stacked bricks”);
- *Adesão AL - like* (ALL), quando as bactérias aderidas aparecem em microcolônias muito pequenas em menos de 1% das células, com apenas 3 horas de incubação, e quando esse período de incubação é prolongado para 6 horas essas microcolônias aparecem em agrupamentos mais frouxos, aderidos a menos de 10% das células.

Os testes de invasão qualitativo e quantitativo foram realizados baseando-se na técnica descrita por Francis et al (1991) com algumas modificações. Para a realização destes testes, as amostras foram testadas quanto à sensibilidade à gentamicina pelo teste de difusão de disco pela técnica de Bauer et al (1966).

O teste foi realizado sob as mesmas condições descritas para o teste de adesão com a diferença que as células HEp-2 foram inoculadas com 100 µl das culturas bacterianas. Após o período de incubação a 37°C por 3 horas as células foram lavadas 4 vezes com PBS. Em seguida, 1 ml de meio MEM-SFB 10% acrescido de 100µg/ml de uma solução de gentamicina foi adicionado aos tubos que foram incubados a 37°C por mais uma hora. Após este período, o meio de cultivo foi desprezado, sendo as células lavadas por mais 4 vezes com PBS. Em seguida as células foram fixadas com uma solução de Bouwin 200µl por 10 minutos, após esse período todas as instruções do fabricante foram seguidas conforme o manual do kit comercial Panótico. As Preparações foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente e observadas no microscópio óptico com aumento de 1000 vezes e óleo de imersão.

4.10 Indução do Inoculo Bacteriano com Vermelho Congo e Plasma Humano

Para aumentar o número a produção da BfpA pela EPEC, foram crescidos em meio de cultura LB, bactérias cultivadas por 16 horas contendo no meio concentrações diferenciadas de plasma humano conforme tabela abaixo. Após a centrifugação e separação do plasma, este foi adicionado lentamente variando de 0,33% a 3,3% para o crescimento bacteriano.

O teste com vermelho congo (que ajuda a mimetizar o contato celular e consequentemente a ativação do SSTT) foi realizado com 0.1% variando entre 1mg/mL a 0,0033mg/ml suplementado ao meio de cultura LB para crescimento da bactéria. A técnica foi copiada de experimentos realizados por Johnson & Chilton, (1966).

Tabela 1 - Concentrações de plasma e Vermelho Congo adicionado ao LB líquido para o cultivo das cepas selecionadas

Concentração de Indutores	
Condições Plasma	Condições Vermelho Congo
LB	LB
Plasma 0,33%	Ver. Congo 1 mg/ml Ver.
Plasma 1,6%	Congo 0,1 mg/ml Ver.
Plasma 3,3%	Congo 0,033 mg/ml Ver.
Plasma 10%	Congo 0,016 mg/ml Ver.
	Congo 0,0033 mg/ml

4.11 Citometria de Fluxo

Para o ensaio de citometria de fluxo foram utilizadas as cepas citadas acima cultivadas somente no LB 3ml, LB+ plasma, LB+ vermelho congo a 37 °C por 16 horas e 5 horas respectivamente. Após o cultivo as cepas foram centrifugadas a 1800 rpm por 10 minutos, descartando-se gentilmente o sobrenadante.

Após o descarte do sobrenadante o *pellet* foi ressuspendido em 5 ml PBS-W 1X com três lavagens sucessivas. Em seguida foram distribuídos 100 µl de suspensão bacteriana para todos os controles e condições testadas.

Como medida de parâmetro as cepas selecionadas receberam as seguintes condições de tratamento: soro negativo (coletado antes da primeira imunização), soro anti-BSA produzido em camundongos, antissoro contra a cepa EPEC típica, secundário Anti-Mouse Alex 488(controle). Estas condições foram acrescentadas individualmente aos 100 µl de suspensão já citados, testados com as 6 cepas; EHEC, EIEC, EPEC, EPECs típicas e ETEC.

Posteriormente foi adicionado o soro primário (antissoro P3 e P6) e foram homogeneizados por 30 minutos em temperatura ambiente, em seguida as cepas nas suas diferentes condições foram lavadas 2X e centrifugadas com PBS-W 1X por 5 minutos a

1800 rpm a fim de retirar os anticorpos não ligados as proteínas expressas nos cultivos. Após a lavagem as amostras receberam o anti-mouse secundário Alex 488 na concentração 1/1000 incubados na ausência de luz por 30 minutos. Após foram lavadas e ressuspendidas com PBS-W 1X e levadas para a leitura no citômetro de fluxo.

O desenho experimental desta metodologia foi baseado no trabalho de Gusmão (2013).

5. RESULTADOS

5.1 Análise da Estrutura 3D

A análise da estrutura tridimensional da BfpA revelou a presença de folhas α -hélices, Folhas- β , “loop” e “ β -turn”. O processo de seleção dos epítomos teve como objetivo identificar as regiões da proteína mais próximas a superfície, de preferência nas estruturas secundárias “loop” ou “ β -turn”. A utilização do programa “Swiss PDB Viewer” possibilitou a identificação destas regiões, demarcando as estruturas mais superficiais, como pode ser observado na **Figura 13**. Seis epítomos foram selecionados: 1-8 aa; 7-35 aa; 45-60 aa; 70-87 aa; 112-130 aa; e 145-155 aa (**Figura 14**).

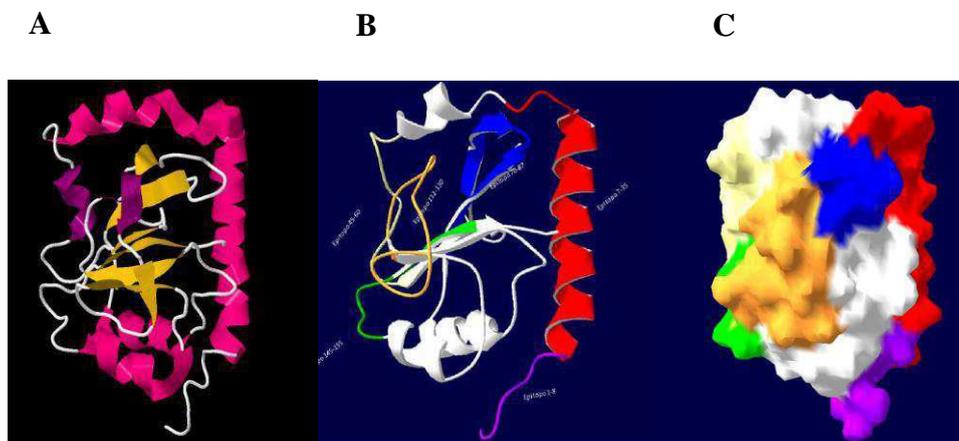


Figura 13- Análise da estrutura tridimensional da BfpA: (A) Análise da estrutura 3D obtida pelo programa PDB para seleção dos epítomos lineares; (B e C) Identificação dos epítomos na estrutura 3D da proteína BfpA obtida pelo programa Swiss PDB Viewer. Fonte: PDB (2016).

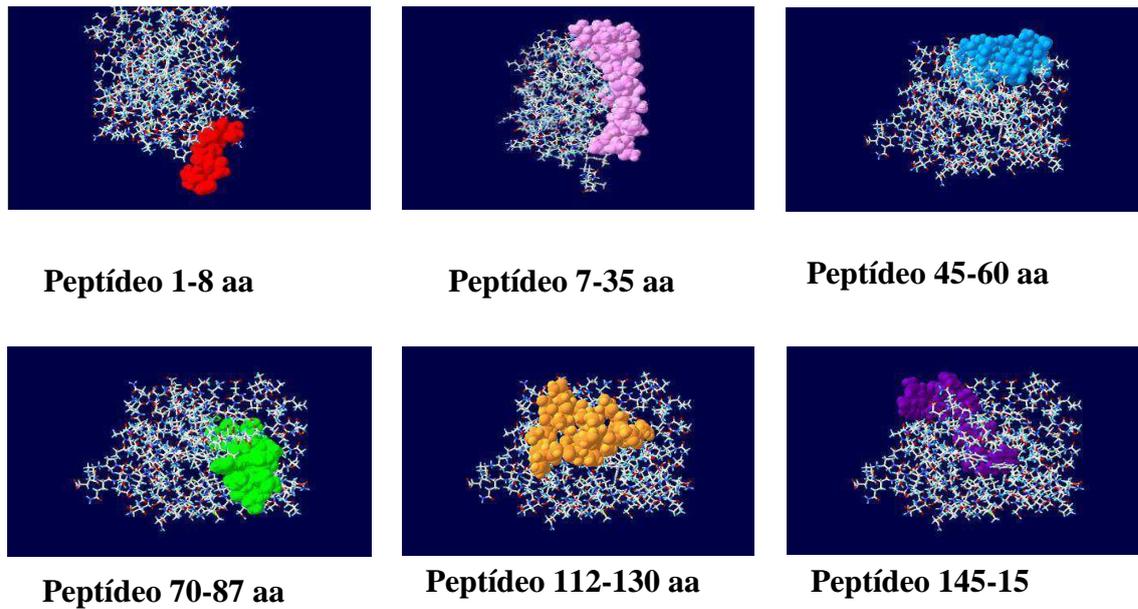


Figura 14 - Análise dos peptídeos: Análise da acessibilidade dos peptídeos identificados por coloração na superfície da proteína BfpA. Fonte: Software Swiss PDB Viewer (2016).

Tabela 2 - Tabela com os peptídeos da proteína BfpA selecionados no programa Bepipred.

IDENTIFICAÇÃO	POSICÃO DAS SEQUÊNCIAS	SEQUÊNCIAS DAS PROTEÍNAS
P1	1-8	MVSKIMNKKYEKGLSLIESA
P2	45-60	SDSNKSQNAI SEVMSATSAI
P3	70-87	SGLDSTILLN TSAIPDNYKD
P4	112-30	NNTAFGYLYT LTRLDKAACV
P5	145-155	AKGYGVNISG ENNITSEFGNS
P6	7-35	NKKYEKGLSL IESAMVLALA ATVTAGVMFY

5.2 Predições dos Epítomos Lineares

A caracterização dos epítomos obtidos através na análise da estrutura terciária da proteína BfpA, possibilitou os resultados da (**tabela 2**) pelos algoritmos disponíveis no site “*Immune epitope database and analysis resource*” - IEDB (<http://www.iedb.org/>). Os principais parâmetros analisados foram “ β -turn”, acessibilidade, hidrofobicidade e antigenicidade (Bepipred). As regiões das sequências dos seis epítomos anteriormente selecionados apresentaram um resultado satisfatório para os parâmetros citados, dado aos altos picos acima do “cut-off” encontrados nestas regiões. Analisando a antigenicidade dos epítomos selecionados “in silico”, P6 e P4 foram classificados como alto, P2 e P3 como médio e P1 e P5 como baixo potencial antigênico (**Tabela 3**)

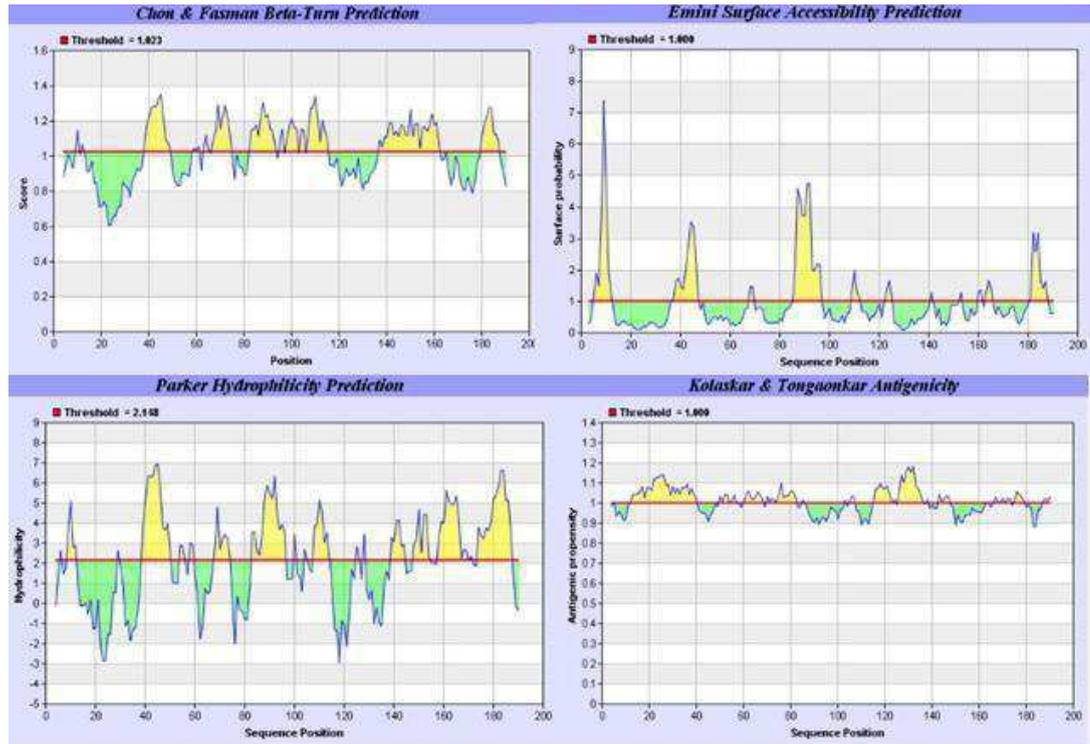


Figura 15- Predição de epítomos utilizando os algoritmos disponíveis no “Immune epitope database and analysis resource” (IEDB).

Os resultados da tabela abaixo representam alguns critérios dos algoritmos da predição dos epítomos utilizados no programa database analysis resource (IEDB).

Tabela 3: Avaliação dos parâmetros “ β -turn”, acessibilidade, hidrofiliçidade e antigenicidade no algoritmo IEDB para os epítomos de BfpA selecionados.

	Posição (aa)	Conformação	β Turn	Hidrofiliçidade	Acessibilidade	Antigenicidade
P1	1-8	Loop	Baixo	Alto	Alto	Baixo
P2	45-60	Loop	Baixo	Alto	Alto	Médio
P3	70-87	β -Turn	Alto	Baixo	Baixo	Médio
P4	112-130	β -Turn	Alto	Médio	Médio	Alto
P5	145-155	β -Turn	Alto	Alto	Médio	Baixo
P6	7-35	Loop	Baixo	Baixo	Baixo	Alto

5.2.1 Triagem de Peptídeos Sintéticos

Para avaliar a imunogenicidade dos peptídeos selecionados “in vivo”, estes foram expostos a um soro de um animal infectado com a bactéria *E. coli* EPEC em um experimento qualitativo no formato de “Dot Blot”. Todos os peptídeos sintetizados (P1, P2, P3, P4, P5 e P6 e o controle positivo) foram reconhecidos pelo soro anti - *E. coli* EPEC (**Figura 16-A**), não havendo reatividade observável nos controles negativos: soro de camundongos saldáveis

(Figura 16-B); e o controle do sistema (Figura 16-C). Os peptídeos P3 e P6 foram selecionados em escala visual ao soro anti-*E. coli* EPEC.

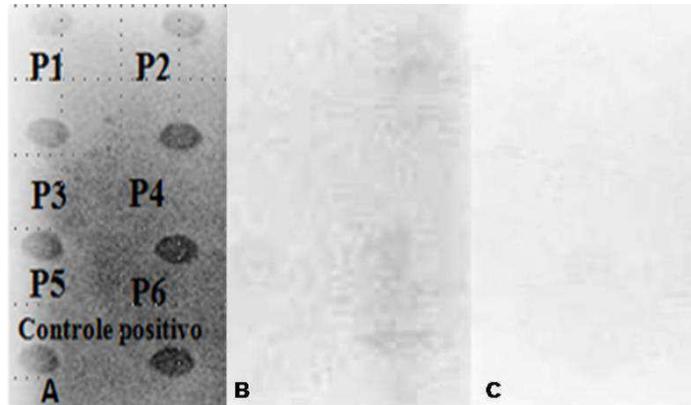


Figura 16-Teste de reatividade dos peptídeos sintéticos por “Dot blot”. (A) Reconhecimento pelo anti-soro *E.coli* EPEC; (B) Controle negativo, soro de camundongo saldável; (C) Controle negativo: controle do sistema.

5.2.2 Avaliação da Resposta Humoral em Camundongos

Os peptídeos P3 e P6, representantes das conformações folha “Loop” e “ β - Turn”, respectivamente, foram selecionados para dar prosseguimento aos estudos devido aos resultados satisfatórios na predição de acessibilidade e hidrofobicidade “in sílico” (Tabela 3) e alta imunogenicidade “in vivo” (Figura 16). Como passos seguintes, foram avaliadas a produção de uma resposta humoral de IgG detectável por ELISA pelos peptídeos selecionados.

Os animais imunizados com P3 apresentaram uma baixa produção de anticorpos IgG anti-P3 após 3 imunizações com este antígeno (Gráfico 1). Em contraste, o grupo de animais imunizados com o peptídeo P6 obtiveram reatividade elevada (Gráfico 2).

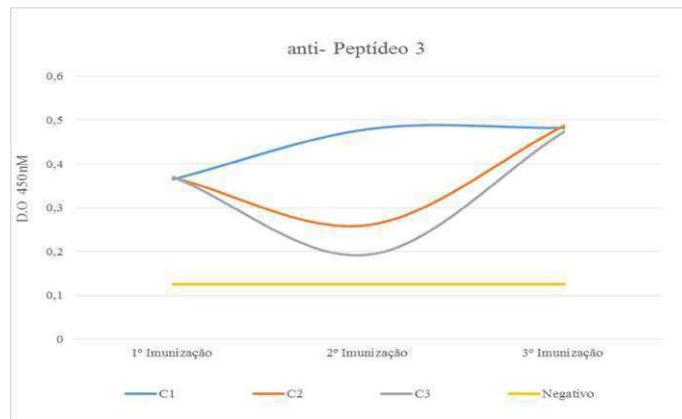


Gráfico 1- Reconhecimento pela técnica de ELISA da reatividade dos anticorpos produzidos pelo modelo animal imunizado com P3.

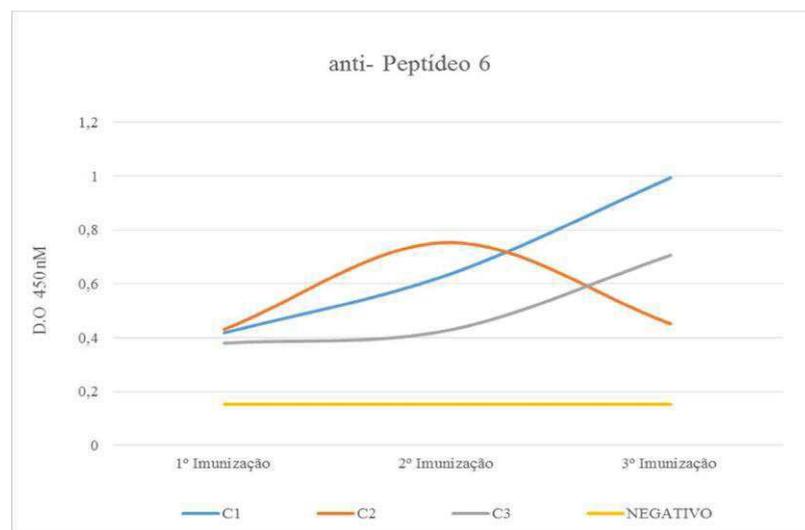


Gráfico 2 - Anticorpos produzidos pelo modelo animal imunizado com P6, reconhecimento pela técnica de ELISA.

No grupo P6, o soro do camundongo “C1” apresentou alta reatividade contra este antígeno. Os outros camundongos C2 e C3, imunizados do mesmo grupo, apresentaram uma baixa ou redução da reatividade ao longo das três imunizações (**Gráfico 2**).

5.2.3 Avaliação da Capacidade de Reconhecimento do Soro anti-P3 a Subtipos de *E. coli* por Citometria de Fluxo

A partir das imunizações, foi verificada a capacidade dos anticorpos presentes no soro dos animais de reconhecer a proteína nativa na superfície das bactérias. Para tanto, utilizamos

a metodologia de citometria de fluxo, dada a disponibilidade, praticidade e acurácia desta técnica em responder esta pergunta.

Inicialmente, foi necessário confirmar os subtipos de *E. coli* presentes na bacterioteca pertencente ao acervo do laboratório de pesquisa disponível na FIOCRUZ/AM. Para isso, foi utilizado ensaios de adesão em células HEP-2 com cepas padrões e amostras clínicas de *E. coli* para confirmar o perfil fenotípico para cada subtipo.

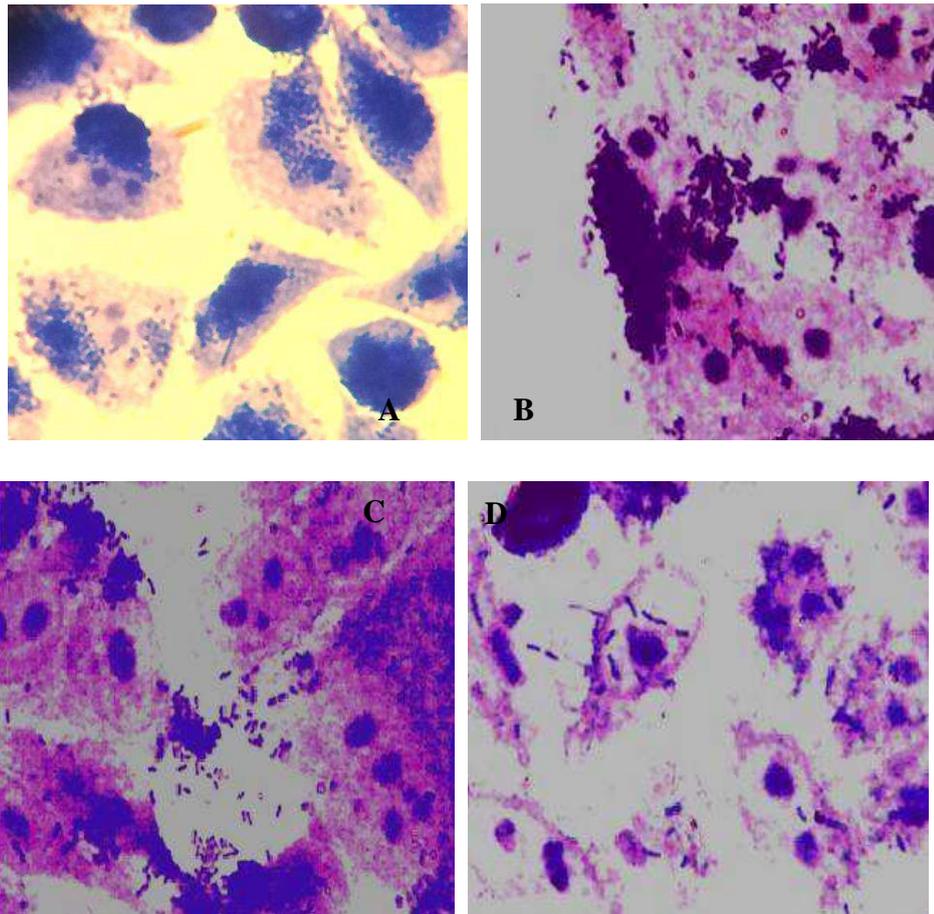


Figura 17- Teste de Adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica: Foto representativa da aderência localizada apresentada por EPEC após 3 horas de interação com células HEp-2. **(A)** EPEC17 (E2348/69); **(B)** EPEC 23 (C275153); **(C)** EPEC 16 (Selvagem); **(D)** EPEC 04 (Selvagem).

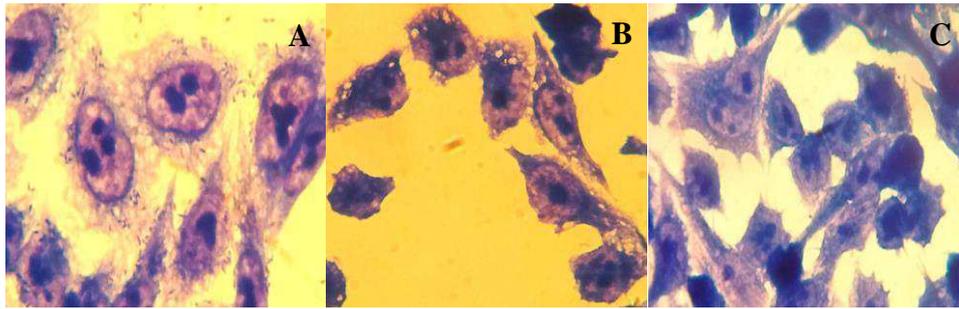


Figura 18: Teste de Invasão de *Escherichia coli* após 3 horas de interação com células HEp- 2: Foto representativa de padrão de (A) Enteroinvasora - EIEC (ATCC 1381); (B) Enterotoxigênica - ETEC (ST8); (C) Enterohemorrágica - EHEC (EDL-933 171-O157:H7).

Confirmados os subtipos de *E. coli* por padrão de adesão, foi analisada a especificidade dos anticorpos anti-P3 e anti-P6. O teste foi realizado por citometria de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) da plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD – FIOCRUZ/AM. A análise dos eventos foi realizada pelo programa FACS Diva Software versão 6.1.2 e os gráficos pelo programa Flow-Jo versão

5.2.4 Os subtipos de *E.coli* EPEC, EHEC, EIEC e ETEC foram incubados com o soro dos animais imunizados com P3 e P6, sendo, em seguida, este contato revelado por anticorpo secundário anti-camundongo fluorescente (Anti-IgG Mouse conjugado a alexa flúor 488).

Como resultados, de acordo com os perfis de tamanho (FSC) e a complexidade (SSC) das amostras de *E. coli*, foi construída uma ‘Gate’ de seleção para as análises de fluorescência (**Figura 19 - A**). Para determinar as porcentagens de *E. coli* reconhecidas pelos anticorpos policlonais contra os peptídeos P3 e P6, foram utilizados os parâmetros de tamanho e fluorescência no canal FL-1 que revelaram diferenças em comparação aos controles de extrato total de bactéria (**Figura 19 - B e C**). A média de intensidade de fluorescência foi determinada pela análise do gráfico em histograma (**Figura 19 - D**) onde foi verificada a média de deslocamento dos picos de fluorescência de cada amostra.

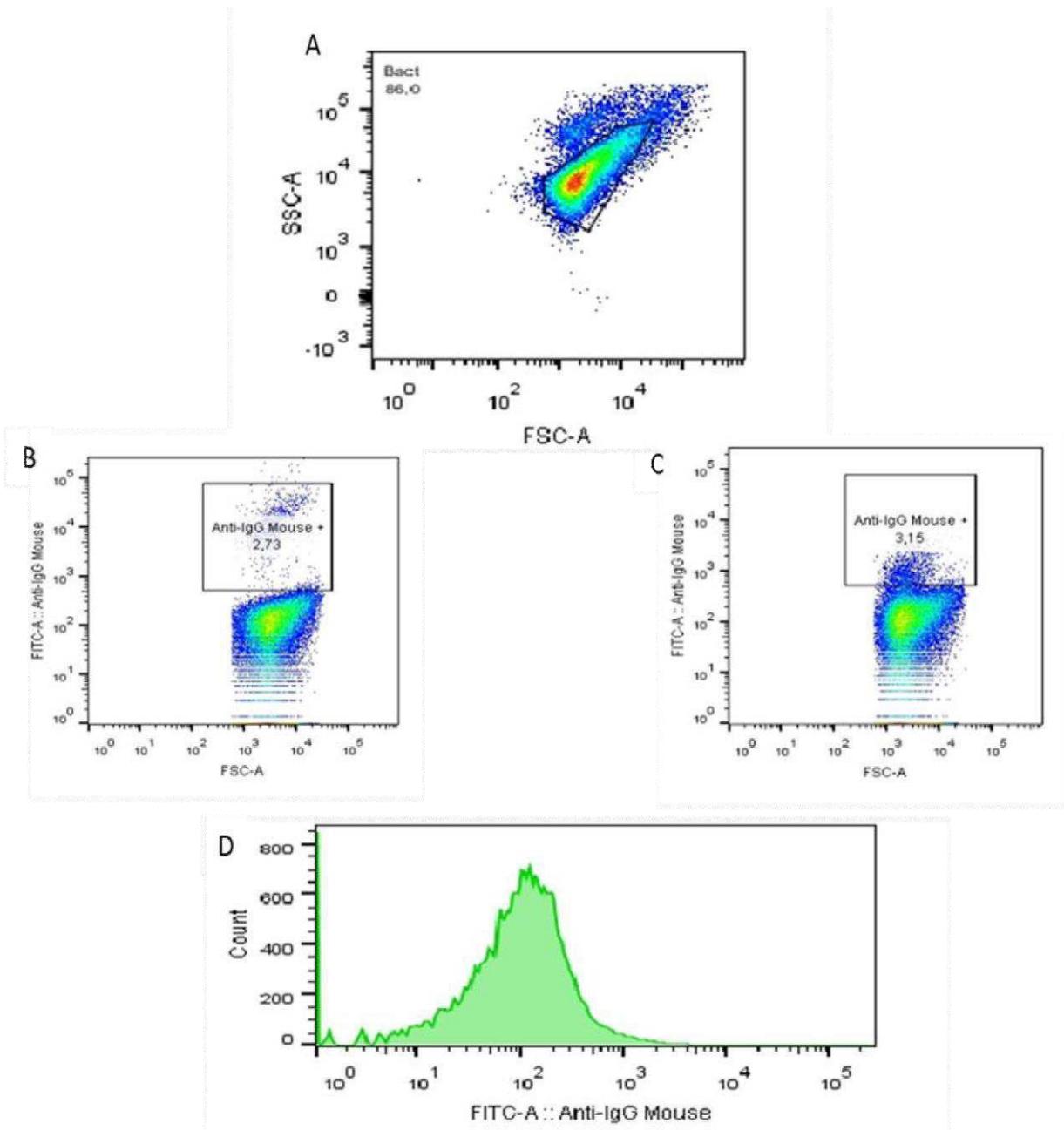


Figura 19: Avaliação do reconhecimento de anticorpos policlonais de peptídeos P3 e P6 contra proteínas nativas em amostras de diferentes tipos de bactérias *E. coli* por Citometria de Fluxo. (A) Análise por tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das amostras de bactérias por citometria de Fluxo; (B) Avaliação da porcentagem de marcação de Anti-Mouse Alexa Fluor 488 das amostras de soro contra extrato de bactéria; (C) contra Peptídeo; (D) histograma da média de intensidade de fluorescência – MIF.

Os soros anti-P3 e anti-P6 foram testados contra as 7 amostras de *E. coli* padrão e selvagens. Dentre as amostras selvagens, a EPEC 16 obteve as maiores reatividades, tanto contra P3 (0,81%), quanto contra P6 (2,73%) (**Gráfico 3**).

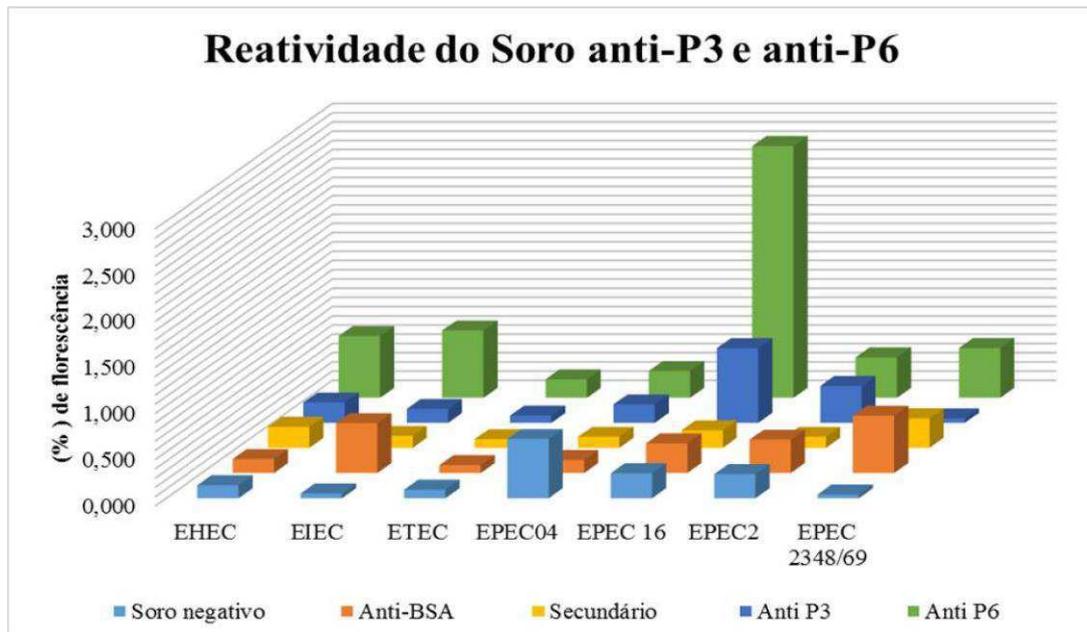


Gráfico 3 – Reconhecimento dos antissoros P3 e P6 contra as cepas selecionadas. O eixo x do gráfico representa os controles e tratamento, o eixo y representa o percentual de reconhecimento medido em (%) de fluorescência.

5.2.4 Análises de Estimulação da Produção de BfpA em Cultura *in vitro*

O soro anti-P6 foi selecionado para dar prosseguimento aos ensaios devido a maior reatividade visualizada pela Citometria de fluxo contra as amostras de *E. coli* testadas.

Com a finalidade de aumentar a expressão da BfpA, foi realizada a pré-estimulação desta proteína com a incubação da bactéria *E. coli* EPEC 2348/69 com plasma humano e vermelho congo. As bactérias *E. coli* EPEC cultivadas em 5 horas com diferentes concentrações de plasma humano apresentaram decréscimo na obtenção de fluorescência para anti-P6 inversamente proporcional ao aumento da porcentagem de plasma (**Gráfico 4**).

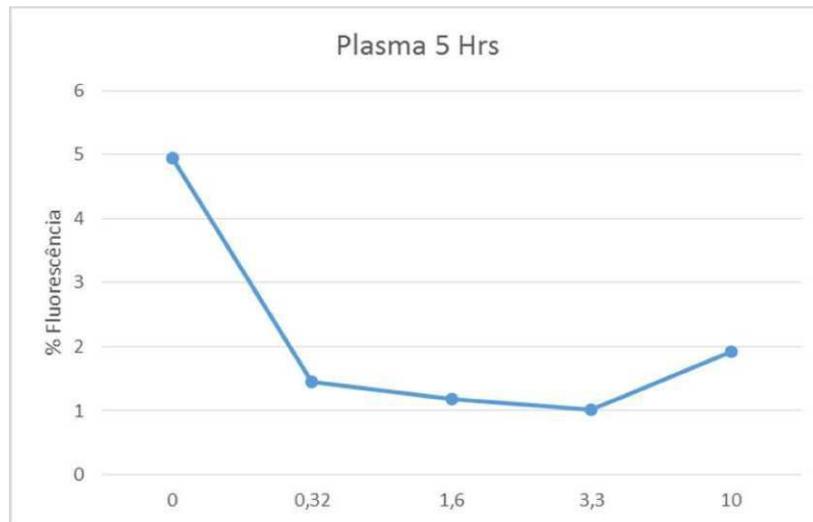


Gráfico 4 - *E. coli* EPEC 2348/69 cultivada por 5 horas contendo concentrações crescentes de plasma humano (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).

Para o cultivo por 16 horas, o perfil apresentado pela *E. coli* EPEC 2348/69 obteve um perfil similar ao de 5 horas, onde houve uma redução da porcentagem de fluorescência a medida que a concentração de plasma humano era aumentado. A exceção foi o ponto na concentração de 1,6% de plasma, onde houve um aparente aumento na porcentagem (**Gráfico 5**).

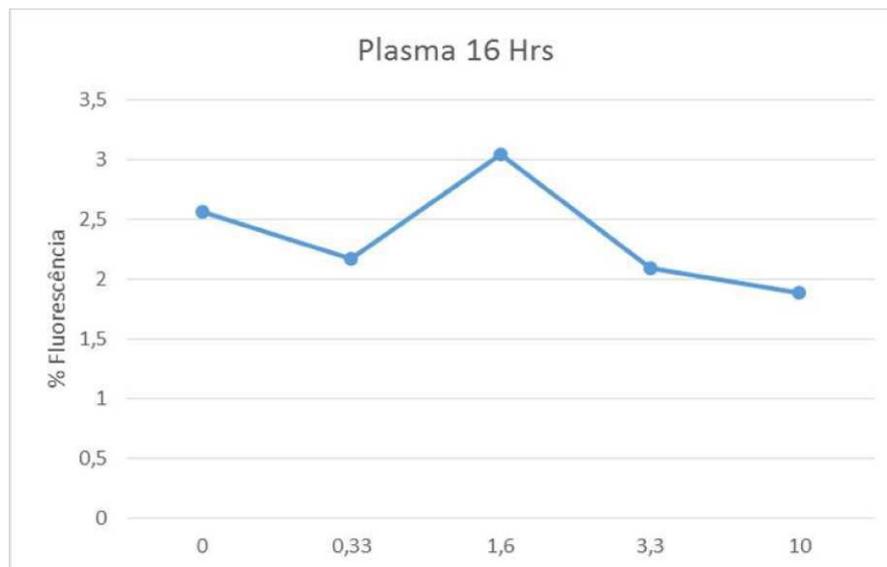


Gráfico 5: *E. coli* EPEC 2348/69 cultivada por 16 horas contendo concentrações crescentes de plasma humano (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).

Em oposto dos resultados obtidos com plasma humano, a incubação da *E. coli* EPEC 2348/69 com vermelho congo por 5h apresentou aumento na porcentagem de detecção de anti-P6 com concentrações crescentes do reagente (**Gráfico 6**).

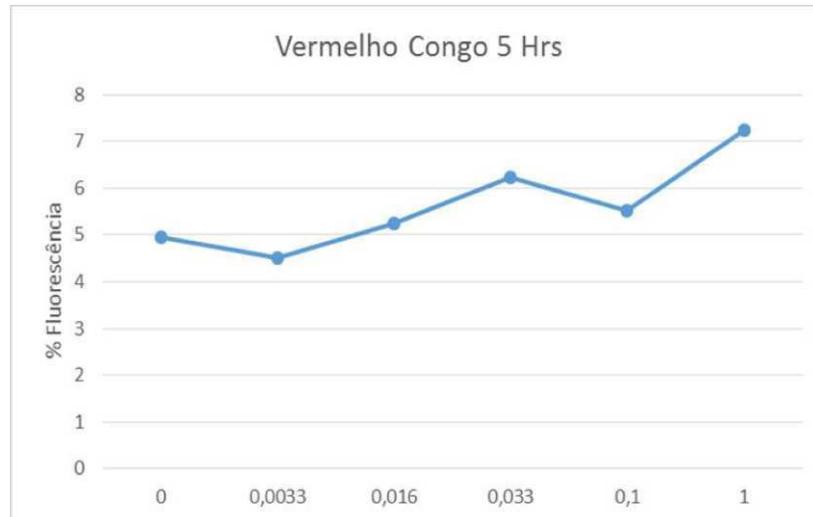


Gráfico 6 - *E. coli* EPEC 2348/69 cultivada por 5 horas contendo concentrações crescentes de vermelho congo (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).

O mesmo perfil não foi observado durante a incubação por 16h com o vermelho congo, onde foi observada uma redução da reatividade do antissoro nas concentrações iniciais seguida do aumento nas concentrações maiores (**Gráfico 7**).

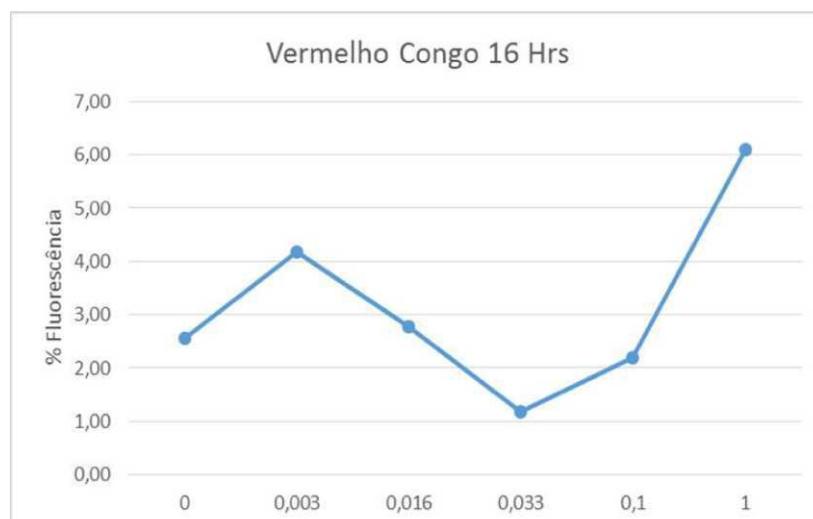


Gráfico 7 - *E. coli* EPEC 2348/69 cultivada por 16 horas contendo diferentes concentrações de vermelho congo (eixo x) e porcentagem de fluorescência obtida para anti-BfpA (eixo y).

6 DISCUSSÃO

Epítomos são sequencias de aminoácidos que são especificamente reconhecidas por moléculas do sistema imune, sendo normalmente divididos em epítomos de célula T e de célula B. Os primeiros são apresentados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e reconhecidos por receptores de linfócitos T (TCRs); Os segundos, por receptores de linfócitos B (BCRs) ou seus respectivos anticorpos solúveis (ZANG et al., 2008).

Muitos estudos visando a seleção de epítomos utilizam a estrutura 3D da proteína (POKROVSKY et al., 2016; MEHLA e RAMANA, 2016; GUAN et al., 2015), devido a possibilidade de identificar suas estruturas primárias e secundárias (ZHENG et al. 2014). Dentre as ferramentas utilizadas para a predição de epítomos de célula T e B em proteínas de interesse, a plataforma “Immune epitope database and analysis resource” – IEDB (PETERS et al., 2005) - destaca-se devido a capacidade de realizar comparações diretas entre as sequencias, utilizando vários métodos preditivos, com uma metodologia fácil e instrutiva (ZHANG et al., 2008).

No atual estudo, a análise dos parâmetros acessibilidade e hidrofobicidade pela plataforma IEDB possibilitou a validação dos epítomos selecionados “in silico”. A seleção de regiões expostas como os “loops” e “ β -Turn” para a construção de epítomos é recomendada por estas regiões obterem propriedades que afetam a imunogenicidade (POKROVSKY et al., 2016).

A utilização de peptídeos sintéticos para o reconhecimento por células B é largamente utilizado por possuir vantagens em caráter econômico, estabilidade, de fácil manipulação, e por não serem tóxicos ou oferecer riscos de infecções. Além disso, ferramentas de bioinformática podem prever a construção de epítomos descontínuos, com sequências de várias regiões, e contínuos, de uma região linear, para maximizar a produção de anticorpos (ÁVILA, 2011).

Nossos peptídeos foram obtidos de sequencias lineares e acoplados com uma proteína carreadora BSA (Soro de Albumina Bovino). Ambas as estratégias foram utilizadas para otimizar a resposta de células B contra o epítomo de interesse e obtenção de antissoros que possam ser aplicados em diagnósticos para a detecção de antígenos (SILVA, 2016; NOGUEIRA, 2014; REZENDE e KITAJIMA, 2012; LANGHAM, 2010; ROMEIRO, 2001).

A confirmação da imunogenicidade das sequências obtidas neste estudo foi realizada “in vivo” pela técnica de “dot blot”. Esta técnica representa um avanço na detecção microbiana no soro de paciente de forma rápida e eficaz (SILVA et al., 2011). Todos os peptídeos de BfpA construídos neste estudo foram reconhecidos pela antissoro de camundongo imunizado com EPEC. Este resultado confirma a predição realizada pela plataforma de bioinformática.

Em um estudo realizado por Oliveira (2001), antissoros de EPEC produzidos por inoculação intramuscular e intragástrica de cepas H86:34 vivas e atenuadas, permitiram a detecção de vários antígenos de superfície bacteriana.

O resultado obtido pela técnica de “dot blot” em adição das previsões pelo algoritmo IEDB permitiu a seleção dos epítomos mais responsivos para dar prosseguimento ao estudo. Os epítomos P3 e P6 foram selecionados devido à alta acessibilidade e boa responsividade no “dot blot”. Além disso, foram escolhidos um representante de cada estrutura (loop e β -Turn).

A quantificação da produção de anticorpo por ELISA para o epítomo P3 foi menor que o observado pelo P6. Da mesma forma, os camundongos imunizados com peptídeos sintéticos construídos por Gusmão e colaboradores (2013) também obtiveram variações de reconhecimento. Esta variação de reatividade pode ser atribuída ao tempo de imunização, modelo animal e a região imunogênica escolhida como objeto de estudo (GUSMÃO et al., 2013).

A citometria de fluxo é uma técnica que substituiu a microscopia de fluorescência para quantificar antígenos e estruturas celulares (GIVAN, 2013). No atual estudo esta técnica foi realizada para avaliar a habilidade dos antissoros produzidos contra peptídeos sintéticos P3 e P6 em reconhecer a proteína BfpA nativa na superfície bacteriana. Como resultados, o reconhecimento ocorreu em maior escala, tanto para P3 quanto para P6, na amostra de EPEC 16, uma amostra clínica proveniente da bacterioteca da FIOCRUZ/AM.

A proteína BfpA faz parte do *operon* BFP (Bundle-Forming Pilus), este gene faz parte do pili tipo IV e que classifica as espécies de *E. coli* EPEC em típica e atípica. As cepas de EPEC típicas (tEPEC) são aquelas que carregam o gene BFP (HAZEN et al., 2015), promovendo a destruição das microvilosidades dos enterócitos gerando a lesão *attaching* e *effacing* (FRANZOLINI et al., 2005). A presença deste gene aumenta a probabilidade de tEPEC de causar diarreia, estando associado a uma patologia mais severa da doença (HAZEN et al., 2015).

Dentre os grupos de EPEC, a proteína BfpA compartilha até 95% de similaridade entre

seus diversos sorogrupos (SOUZA et al., 2016). Apesar do aparente baixo reconhecimento do peptídeo P6 nas demais cepas de EPEC, a baixa produção não interferiu na ligação antígeno–anticorpo, uma vez que a pequena sequência de aminoácidos foi reconhecida dentro de uma complexa proteína nativa em seu estado conformacional funcional e sem qualquer indução. Estudos realizados por Girón e colaboradores (1995) já demonstravam que anticorpos monoclonais eram capazes de reconhecer vários determinantes antigênicos nos diversos sorogrupos que produzem proteína BfpA. Isto implica que a metodologia utilizada foi sensível e específica para detectar todos os eventos ocorridos na ligação específica.

Para avaliar o reconhecimento da proteína “in vitro”, foi utilizado o antissoro P6 contra a cepa padrão de *E. coli* EPEC 2348/69. Para isso a bactéria foi cultivada na presença de concentrações crescentes de plasma humano e vermelho congo. O reagente vermelho congo é comumente utilizado para avaliar propriedades da superfície bacteriana, principalmente aquelas relacionadas a virulência e patogenicidade (YADAV et al., 2014). Esta técnica foi utilizada pela primeira vez por Johnson e Chilton (1966), que observaram que bactérias patogênicas podiam ser coradas com vermelho congo, atualmente, este reagente é utilizado para testes em invasão e formação de biofilme potencializando seus fatores de virulência. Já o enriquecimento com plasma humano já foi realizado em um estudo para avaliar a resistência de *Staphylococcus aureus* a concentrações crescentes de sais (PAIVA et al., 1991).

Em nosso estudo, o reconhecimento do peptídeo P6 em EPEC diminuiu conforme houve o aumento das concentrações de plasma humano; Em oposto, o reconhecimento de P6 aumentou juntamente com as concentrações de vermelho congo. A maior expressão da proteína BfpA em presença de vermelho congo era esperada devido ao fato deste reagente ser largamente utilizado para confirmar a patogenicidade de sorogrupos de *E. coli* (ISHIGURO et al., 1985; AGARWAL et al., 1999; DUBEY et al., 2000; SWAMINATHAN et al., 2004).

Neste estudo, a construção de um peptídeo pertencente a região BfpA capaz de produzir anticorpos contra esta região que possam reconhecer a proteína bacteriana em seu estado nativo foi alcançado. A utilização de peptídeos sintéticos que otimizem a resposta de célula B na obtenção de antissoros demonstrou ser uma ferramenta eficaz e específica, porém dependente de um bom procedimento de imunização e enriquecimento bacteriano para melhora da resposta.

O epítopo P6, apesar de apresentar baixa antigenicidade “*in silico*”, obteve boa reatividade no teste “dot blot” contra antissoro de camundongos produzido contra esta proteína (anti-P6). Para confirmar este reconhecimento, a ligação antígeno-anticorpo foi visualizada por citometria de fluxo contra a proteína nativa. O enriquecimento da proteína BfpA com o vermelho congo permitiu sua estimulação e detecção pelo antissoro produzido de uma forma concentração dependente. Este estudo é o primeiro passo para obtenção de uma proteína que possa ser empregada com intuito de identificação de *E. coli* EPEC típica em rotina de laboratório, e possa servir de base para produção de kits diagnóstico de origem nacional.

CONCLUSÃO

- Foram possíveis a construção e predição de epítomos da proteína BfpA através da modelagem 3D e algoritmos da plataforma IEDB;
- Os antissoros produzidos pela imunização de camundongos com a *E. coli* EPEC 2348/69 foram capazes de identificar os seis peptídeos sintetizados;
- Os peptídeos sintéticos P3 e P6 mostraram ter propriedades antigênicas, induzindo a produção de anticorpos no modelo animal;
- O antissoro P6 demonstrou uma boa reatividade em ELISA, sendo este o selecionado como produto deste estudo;
- Os anticorpos anti-P6 foram capazes de reconhecer a proteína BfpA nativa presentes na cepa de *E. coli* EPEC 2348/69 enriquecida com vermelho congo, podendo este epítopo ser candidato para projetos futuros visando o diagnóstico de EPEC.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste presente estudo foram investigadas as sequências antigênicas da proteína BfpA, onde simulações de ferramentas de bioinformática (*Bepipred Linear Epitope Prediction*) foram aplicadas afim de potencializar a produção de anticorpos.

Apesar do epítipo P6 ser o selecionado como produto deste estudo, ensaios posteriores visando melhorar a produção de anticorpo contra os demais epítipos (P1- P5) podem ser realizados. Assim, novas imunizações serão previstas com todos os peptídeos selecionados para potencializar suas propriedades antigênicas no modelo animal.

Acreditamos que os produtos aqui obtidos possam ser acoplados em nanotubos de carbono para fins de diagnósticos. Porém, para que isto ocorra, os dados aqui obtidos necessitam de validação a fim de minimizar a ocorrência de interferências.

REFERÊNCIAS

AGARWAL RK, KAPOOR KN, VERMA JC, BACHHIL VN, SINGH BR, KUMAR A, SACHAN N, SINGH DK, MALIK SVS **Isolation and characterization of Salmonella Stockholm from beef. Ind. J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.** 20(1):50 – 52, 1999.

AGUIRRE, A.R.A. **Seleção de peptídeo por meio de bioinformática e sua avaliação como imunógeno.** 2014. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

AGUIRRE, A. R. A. **Resposta imune e eficácia de peptídeo sintético desenvolvido por vacinologia reversa contra rhipicephalus sanguineus** 2014. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

ANVISA -**Agencia Nacional de Vigilância Sanitária** Disponível em: endereço eletrônico da base (URL)

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4a3b680040bf8cdd8e5dbf1b0133649b/RESOU%3C%87%3C%83°RDC+N+216+DE+15+DE+SETEMBRO+DE+2004.pdf?MOD=AJPEES>
S Acesso em: 02 JANEIRO 2015

AVILA, RAM. **Predição de epítomos descontínuos ou conformacionais em proteínas através da bioinformática estrutural.** Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioinformática. Belo Horizonte, 2011, 151pp.

BAUER A W, KIRBY W M M, SHERRIS J C& TURCK M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.** Amer. J. Clin. Pathol. 45: 493-6, 1966.

BECKER-DREPS S , AMAYA E , LIU LAN et al., **Etiology of Childhood Diarrhea Following Rotavirus Vaccine Introduction: A Prospective, Population- Based Study in Nicaragua.** The Pediatric Infectious Disease Journal, 2014.

BUERIS V. **Interação de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) atípica que**

apresenta o padrão de adesão localizada-like com a célula epitelial in vitro. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BÜHLER, Helena Ferraz et al. **Análise espacial de indicadores integrados de saúde e ambiente para morbimortalidade por diarreia infantil no Brasil, 2010 Spatial analysis of integrated health and environmental indicators for morbidity and.** Cad. Saúde Pública, v. 30, n. 9, p. 1921-1934, 2014.

CHOU P Y, FASMAN G D **Empirical predictions of protein conformation.** Annual review of biochemistry, v. 47, n. 1, p. 251-276, 1978.

CLARK, M.F., LISTER, R.M., BAR-JOSEPH, M.. **ELISA techniques. Methods in Enzymology** 118, 742-766 1986.

CLARKE, S.C., HAIGH, R. D., FREESTONE, P. P. & WILLIAMS, P. H. **Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: history and clinical aspects.** Br J Biomed Sci 59, 123–127, 2002.

CRAVIOTO A, GROSS R J, SCOTLAND SM et al. **An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes.** Current Microbiology, v. 3, n. 2, p. 95-99, 1979.

DANIELL SJ, DELAHAY RM, SHAW RK et al., **Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis.** Infection and immunity, v. 69, n. 6, p. 4055-4064, 2001.

DATA SUS, disponível:
<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=01>.
<http://svs.aids.gov.br/dashboard/mortalidade/infantil.show.mtw> Acesso em : 06 junho 2016.

DONNENBERG MS, KAPER J B, FINLAY B. B. **Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* /i and host epithelial cells.** Trends in microbiology, v. 5, n. 3, p. 109-114, 1997.

DONNENBERG, Michael S.; WHITTAM, Thomas S. **Pathogenesis and evolution of**

virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. The Journal of clinical investigation, v. 107, n. 5, p. 539-548, 2001.

DUBEY S, SHARDA R, CHHABRA D, TIWARI S, PILLAI AGR. **Congo red colony pigmentation and haemolysin production by *E. coli* strains from diarrheic goats.** Ind.. J. Comp. Microbiol. Infect. Dis. 21(1) : 157 – 158, 2000.

EDUARDO PBM, MELO RLM, KATSUYA ME, CAMPOS CJ, **Manual é uma revisão da 2ª Edição do manual de Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas**, editado em 2002. <http://www.cve.saude.sp.gov.br> Acesso em: 03 Junho 2016.

ELLIOTT S J, SPERANDIO V, GIRÓN J A, et al., **The Locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE-and non- LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** Infection and immunity, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.

EMINI EA, HUGHES JV, PERLOW DS, BOGER J. **Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide.** J Virol p. 836, 1985.

FIALHO, OB **Identificação de estirpes de *Escherichia coli* diarreiogênicas por PCR multiplex**, Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas), Universidade Federal do Paraná p.106, 2008.

FRANKEL, Gad et al. **Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements.** Molecular Microbiology, v. 30, n. 5, p. 911-921, 1998.

FRANZOLINI, M R., ALVES R C B I, KELLERI R et al. **Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, n. 4, p. 359-363, 2005.

GARMENDIA J, FRANKEL G, **Operon structure and gene expression of the espJ-tccP locus of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7,** *FEMS MICROBIOLOGY LETTERS*, Vol: 247, Pages: 137-145, ISSN: 0378-1097,2005.

- GIRÓN, J.A.; H.O A.S; SCHOOLNIK, G.K. **An inducible bundle – forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli***. Science, v.254, p 710-713, 1991.
- GIRÓN JA, QADRI F, AZIM T, JARVIS KJ, KAPER JB, ALBERT MJ. **Monoclonal antibodies specific for the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli***. Infect Immun. Dec;63(12):4949-52, 1995.
- GIVAN, AL. **Flow Cytometry: First Principles**. Segunda Edição. Copyright © 2001 by Wiley-Liss, Inc, 2013
- GÓMEZ C E, LÓPEZ-CAMPISTROUS A E, DUARTE C A. **An immunoassay with bovine serum albumin coupled peptides for the improved detection of anti V3 antibodies in HIV-1 positive human sera**. Journal of virological methods, v. 71, n. 1, p. 7-16, 1998.
- GUAN W, LIU W, BAO J, LI J, YUAN C, TANG J, SHI D. **Analysis and application of a neutralizing linear epitope on liable toxin B of enterotoxin *Escherichia coli***. Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Jul;99(14):5985-96, 2015.
- GUSMÃO, MICHÉLIA ANTÔNIA DO NASCIMENTO ET AL. Imunolocalização da SmATPDase 2 de *Schistosoma mansoni* e estudo dos peptídeos sintéticos SmB1LJ e SmB2LJ derivados desta proteína na **esquistossomose experimental**. Pós-graduação em ciências Biológicas ênfase em imunologia – Juiz de fora 2013.
- HANCOCK DC, OREILLY N J. **Synthetic peptides as antigens for antibody production**. In: Immunochemical Protocols. Humana Press, p. 13-25.2005.
- HARTLAND EL, DANIELL SJ, DELAHAY RM. et al. **The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA–EspB protein interactions**.Molecular microbiology, v. 35, n. 6, p. 1483-1492, 2000.
- HAZEN TH, DAUGHERTY SC, SHETTY A, MAHURKAR AA, WHITE O, KAPER JB, RASKO DA. **RNA-Seq analysis of isolate- and growth phase-specific differences in the global transcriptomes of enteropathogenic *Escherichia coli* prototype isolates**. Front

Microbiol, Jun 12;6:569. 2015.

HEGDE, A. et al. **Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR.** Indian Journal of Medical Microbiology, v. 30, n. 3, p. 279, 2012.

ISHIGURO EE, AINSWORTH T, TRUST TJ, KAY WM. Correlation between congo red binding and pathogenicity of *E. coli*. J. Bacteriol. 164 : 1233, 1985.

JOHNSON, J.I.; CHILTON, W.S. **Galactosamine glycan of *Chondrococcus columnaris*.** Science. 152:1247-1248, 1966.

KARPLUS PA, SCHULZ GE. **Prediction of Chain Flexibility in Proteins - A tool for the Selection of Peptide Antigens.** Naturwissenschaften; 72:212-3, 1985.

KNAPPSTEIN, Sabine et al. **α 1-Antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains.** Infection and immunity, v. 72, n. 8, p. 4344-4350, 2004.

KOLASKAR AS, TONGAONKAR PC. **A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens.** FEBS Lett. Dec 10;276(1- 2):172-4, 1990.

LANGHAM, M.A.C. **Vírus fitopatogênicos**, in: Trigiano, R.N., Windham, M.T., Windham, A.S. (Eds.) Fitopatologia: Conceitos e exercícios de laboratório, 2aed. Artmed, Porto Alegre, p. 576, 2010.

LARSEN, Jens Erik Pontoppidan; LUND, Ole; NIELSEN, Morten. **Improved method for predicting linear B-cell epitopes.** Immunome research, v. 2, n. 1, p. 1, 2006.

LEBEIS, S L.; SHERMAN, Melanie A.; KALMAN, Daniel. **Protective and destructive innate immune responses to enteropathogenic *Escherichia coli* and related A/E pathogens.** 2008.

LEVINE MM, BERGQUIST EJ, NALIN DR , et al. ***Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive.** The Lancet, v. 311, n. 8074, p. 1119-1122, 1978.

MACHADO A, LIRIA C W, PROTI P B et al. **Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações.** Química Nova, v. 27, p. 781-789, 2004.

MASSIS L M **IMUNOGENICIDADE E POTENCIAL VACINAL DAS FLAGELINAS DE *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*.** 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MEHLA K, RAMANA J. **Identification of epitope-based peptide vaccine candidates against enterotoxigenic *Escherichia coli*: a comparative genomics and immunoinformatics approach.** Mol Biosyst. Mar;12(3):890-901, 2016.

MICHELLI, Elvia et al. **Identificación de *Escherichia coli* enteropatógena en niños con síndrome diarreico agudo del Estado Sucre, Venezue.** Biomédica, v. 36, p. 118-27, 2016.

MUNHOZ, D.D. **Expressao e produção da fimbria ECP por *Escherichia coli* enteropatógena atípica.** 2015 93f Dissertação (mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2015.

NATARO J P, KAPER J B. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Clinical microbiology reviews, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NETER E, WESTPHAL O, LÜDERITZ O et al. **Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages.** Pediatrics, v. 16, n. 6, p. 801-808, 1955.

NEVES BC, MUNDY R, PETROVSKA L, et al. **CesD2 of enteropathogenic *Escherichia coli* is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD.** Infection and immunity, v. 71, n. 4, p. 2130-2141, 2003.

NOGUEIRA, DRS, **Produção e avaliação de anti-soro policlonal visando a detecção do potyvirus Pepper yellow mosaic vírus Pós-Graduação em Fitopatologia.** – Viçosa, MG, 2014

OLIVEIRA, APS. **Estudo da resposta imune sistêmica em camundongos após inoculação por diferentes vias de imunização com *Escherichia coli* O86:H34 vivas ou mortas por formalina.** Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2001. 140p.

OLIVEIRA L S, JULIÃO F S, SOUZA V M M et al., **A utilização da imunofluorescência indireta no diagnóstico de rotina da leishmaniose visceral canina e suas implicações no controle da doença.** Ciência Animal Brasileira, v. 6, n. 1, p. 41-47, 2006.

OMS- **ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE** (internet) Document Centre Disponível em: endereço eletrônico da base (URL)http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2015_Part1.pdf?ua=1

PHE-prevention-diseases-infographic-EN.pdf http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204585/1/9789241565196_eng.pdf?ua=1Acesso em: 26 maio 2016.

ORLANDI PP, MAGALHÃES GF, MATOS NB, SILVA T, PENATTI M, NOGUEIRA PA, SILVA LH. **Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil).** Braz J Med Biol Res. 39(4):507- 17, 2006.

ORLANDI PP, SILVA T, MAGALHÃES GF, ALVES F, DE ALMEIDA CUNHA RP, DURLACHER R, DA SILVA LH. **Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2001 Jul;96(5):621-5.

ORSKOV I, ORSKOV F, JANN B et al. **Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*.** Bacteriological reviews, v. 41, n. 3, p. 667, 1977.

PAIVA, RG. **A prova da coagulase relacionada ao meio de cultivo de *Staphylococcus aureus* contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio.** Rev. Pat. Trop. 20(1):21-33, 1991.

PARKER JM, GUO D, HODGES RS. **New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites.** *Biochemistry*. Sep 23; 25(19):5425-32,1986.

PAVLINAC PB, JOHN-STEWART GC, NAULIKHA JM, . et al. **High-risk enteric pathogens associated with HIV infection and HIV exposure in Kenyan children with acute diarrhoea.** *AIDS*, v. 28, n. 15, p. 2287-2296, 2014.

PAWŁOWSKA BK E SOBIESZCZAŃSKA BM, **model patogenezы enteropatogennych szczepów escherichia coli – kluczowa rola adhezji post.** *MIKROBIOL.* 55, 2, 119–131,2016.

PEREIRA, Juliana Rogéria et al. **Diarréia em crianças menores de cinco anos em uma unidade de saúde da família.** *Revista de Enfermagem da UFSM*, v. 4, n. 3, p. 594-601, 2014.

PETERS B, SIDNEY J, BOURNE P, BUI HH, BUUS S, DOH G, FLERI W, KRONENBERG M, KUBO R, LUND O, et al. **The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint.** *PLoS Biol.*, 3, e91, 2005.

POKROVSKY VS, KAZANOV MD, DYAKOV IN, POKROVSKAYA MV, ALEKSANDROVA SS. **Comparative immunogenicity and structural analysis of epitopes of different bacterial L-asparaginases.** *BMC Cancer*, 16, 89, 2016.

PORCY C, FERRO T A F, SÍLVIO, MONTEIRO G et al., **Epidemiologia da doença diarreica associada às *Escherichia coli* diarreiogênicas em crianças residentes em uma área alagada de Macapá–Amapá, Brasil.** *ciência equatorial*, v. 3, n. 1, 2013.

RAMBOARINA, Stéphanie et al. **Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 48, p. 40252-40260, 2005.

REGUA-MANGIA, A.H. et al. **Frequency and characteristics of**

diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of infection*, v. 48, n. 2, p. 161-167, 2004.

REZENDE, J.A.M., KITAJIMA, E.W. **Procedimentos para identificação de fitovírus**, in: Zambolim, L., Jesus Júnior, W.C., Pereira, O.L. (Eds.) **O Essencial da Fitopatologia**. Vol. 2 - Agentes Causais. Editora UFV, Viçosa, MG, pp. 287-304, 2012.

RIBEIRO, LARYSSA FREITAS et al. **Shiga toxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* in water and fish from pay-to-fish ponds.** *Letters in applied microbiology*, 2015.

ROCHA, L.B **Desenvolvimento e patronizacao de testes imunocromatograficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de shiga (Stec) e *Escherichia coli* enterotoxigenica (Etec).** 2012 178 f. tese de doutorado em biotecnologia – Instituto de ciências biológicas-São Paulo

RODRIGUES J , THOMAZINI C M. , MORELLI A et al. **Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants.** *Journal of clinical microbiology*, v. 42, n. 1, p. 398-400, 2008.

RODRIGUES SR, **Caracterização das cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) típica e atípica isoladas de crianças com gastroenterite aguda na região de Porto velho- RO.** Dissertação de Mestrado de Pós-graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia. p.76, 2013.

ROMEIRO, R.S., 2001. **Métodos em bacteriologia de plantas.** Editora UFV, Viçosa, MG.

ROTHBAUM, R., A. MCADAMS, J., GIANNELLA, R., PARTIN, J.C. **Divisions of Gastroenterology and Pathology, Children's Hospital Medical Center,** *jornal Gastroenterology* p. 83:441-54, 1982.

SILVA J, LEITE D, FERNANDES M, MENA C, GIBBS PA, TEIXEIRA P. ***Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review** *Front. Microbiol.*, 1664- 302X, 2 (200) (2011), pp. 1– 2.

SILVA, Marta Filipa Serra da. **Interação entre *Escherichia coli* uteropatogénica e as**

células epiteliais e do estroma do endométrio canino. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária.

SILVA, RENATA KHODAIR. **Detecção e caracterização moleculares dos paramixovírus aviários tipo 1 em materiais provenientes de aves silvestres utilizando testes para a detecção dos vírus da família viral Paramyxoviridae.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

SILVEIRA L, MARQUES A, MACHADO J **Patotipos de Escherichia coli associados a infecções entéricas entre 2002-2012.** 2013.

SOHEL I, PUENTE JL, RAMER SW, BIEBER D, WU C-Y & SCHOOLNIK GK. **Enteropathogenic Escherichia coli: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis.** J Bacteriology 178: 2.613-2.628, 1996.

SOUZA, ELOISA CORRÊA. **Perfil etiológico das diarreias agudas em crianças atendidas em um pronto socorro de hospital regional da cidade de São Paulo.** 2000. Tese de Doutorado.

SOUZA CDO, MELO TRB, MELO CDSB, MENEZES ÊM, CARVALHO ACD, MONTEIRO LC R. **Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 7(2), 79-91, 2016.

SWAMINATHAN TR, CHANDRAN NDJ, DORAIRAJAN N. **Virulence attributes of E.coli associated with colisepticaemic chickens.** Ind. J. Anim. Sci. 74(3): 248 – 252, 2004.

TRABULSI, L R. **Microbiologia.** Editora Atheneu, 4 ed, São Paulo, 2005 679 p. UNICEF, **Fundo das Nações Unidas para a Infância Disponível em:** <http://www.unicef.org.br/Acesso> em: 02 JANEIRO 2015 <http://data.unicef.org/child-health/diarrhoeal-disease.html> Acesso em: 26 maio 2016.

VAN DEN BELD, M. J.; REUBSAET, F. A. **Differentiation between Shigella, enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and noninvasive Escherichia coli.** Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., v. 31, n. 6, p. 899-904, jun. 2012.

VASCO G, TRUEBA G, ATHERTON R et al. **Identifying Etiological Agents Causing Diarrhea in Low Income Ecuadorian Communities.** The American journal of tropical medicine and hygiene, v. 91, n. 3, p. 563-569, 2014.

VIEIRA, Mônica Aparecida Midolli. **Ilhas de patogenicidade.** O Mundo da Saúde. São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VIEIRA, MONICA A. M.; SALVADOR, FABIA A.; SILVA, ROSA M.; IRINO, KINUE; VAZ, TANIA M. I.; ROCKSTROH, ANNA C.; GUTH, BEATRIZ E. C.; GOMES, TANIA A. T. **Prevalence and Characteristics of the O122 Pathogenicity Island in Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains.** Journal of Clinical Microbiology, v. 48, n. 4, p. 1452-1455, 2001.

YADAV V, JOSHI R K, JOSHI N, DIWAKAR RP. **Congo red binding and Plasmid Profile of E. coli Isolates of Poultry Origin.** Journal of Animal Health and Production, 2(3), 31-32, 2014.

ZHANG Q, WANG P, KIM Y, HASTE-ANDERSEN P, BEAVER J, BOURNE PE, BUI HH, BUUS S,FRANKILD S, GREENBAUM J, LUND O, LUNDEGAARD C, NIELSEN M, ONOMARENKO J, SETTE A,ZHU Z, PETERS B. **Immune epitope database analysis resource (IEDB-AR).** Nucleic Acids Res. Jul 1:36, 2008.

ANEXOS

Anexo 1 - PROTOCOLOS

Purificação de anticorpo em coluna de proteína A

- NaCl na concentração de 3,3 M. sódio Borato 1M (Ph 8,9) (Diluir para 1:10) Soro :M n.g p.m(v).
- Adicionar 50 µl NaCl e sódio borato 50 mM no soro direto no soro (500 µl) de soro. Adicionar o soro preparado (anteriormente) na coluna deixar 1 gota de soro, coletar a gota de soro.
- Após passar todo o soro pela coluna, para posteriores etapas de lavagens Lavar com NaCl 3M e sódio Borato 50mM PH 8,9 10 ml Lavar com mais 10 ml NaCl 3M Borato 10 ml Separar 15 microtubos 50 µl Tris 1M pH 7,9
- Adicionar na coluna 500 µl de glicina 100mM pH 3,0 A partir do 7 ° microtubo fazer o teste de presença de proteína Lavar a coluna com 5ml de H₂O
- Adicionar álcool 70% na coluna para manter conservada e guarda a -20C

SDS-PAGE

Materiais

- Preparar solução a 10% (w / v) ammonium persulfate (APS) fresco
- Prepara-se a mistura de gel de separação (pelo menos 10 ml por gel quando utilizando os espaçadores de 1,5 milímetros):

Reagentes Gel 15%

- MilliQ 3,4 ml
- Poliacrilamida (bisa + acrilamida) 7,0 ml Tris 1M Ph 8.8 3,8 ml
- SDS 10% 150 ml TEMED 6 μ L
- Persulfato de amônio -150 ml
- Butanol (pingar 3 gotas para alinhar o gel)
- Obs.: colocar o persulfato e o ultimo reagente a ser misturado.
- Quando o gel de separação foi polimerizado, preparar a mistura de gel de empilhamento (5 % de acrilamida):

Gel 5%

- MilliQ 3,4 ml
- Poliacrilamida (bisa + acrilamida) 830 μ L Tris 1M Ph 6.8 630 ml
- SDS 10% 50 ml TEMED 5 μ L
- Persulfato de amônio - 50 ml
- MilliQ 3,4 ml
- 1,0 ml de tampão II poliacrilamida
- Adicionar APS e Temed ao empilhamento mix gel, despeje-o até o topo e inserir o pente.
- Conecte o sanduíche de gel para o conjunto do eléctrodo. colocar o tampão de corrida dentro do conjunto gel. corrida com 150V para ca. 1 h 20 min.

SOLUÇÕES NECESSÁRIAS

- Tampão I (4x) 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 Tampão II (4x) 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 30% de acrilamida 29,2% de acrilamida
- 0,8% de bis-acrilamida
- De tampão de amostra (2x) 0,125 M de Tris-HCl pH 6,8 20% de glicerol
- 4% de SDS
- Mercaptoetanol a 2% (-Me) 0,02% bromphenol blue
- O tampão de corrida (1x) 25 mM Tris 192 mM de glicina
- 0,1% de SDS

PROTOCOLO DE ELISA INDIRETO

- PROCEDIMENTOS

- 1- Sensibilizar as placas com 4 μ g com uma volume final de 50 μ l em tampão em carbonato – bicarbonato 0,05 M.
- 2- Incubar a placa a 4°C /por 16 horas 3-Lavar 1 vez com PBS 1X tween
- 4- Remover o antígeno e bloquear com o tampão PBS tween 1x e incubar por 4 horas a 37° C na estufa por 16 horas
- 5- Adicionar anticorpo primário em tampão PBS Tween 1x por 4 horas a 37° C na estufa por 16 horas
- 6- Adicionar anticorpo secundário em tampão PBS Tween 1x por 4 horas a 37° C na estufa por 16 horas
- 7- Lavar com PBS Tween
- 8- Revelar com o substrato peroxidase

REAGENTES

- Carbonato de bicarbonato 0,2 M
- Solução A: carbonato de sódio Na₂CO₃ (0,02 M) 1g / 50 ml Solução B: bicarbonato de sódio NaCO₃ (0,02 M) 0,8 g / 50 ml Solução C: 16 ml de solução A 34 ml de solução B O tampão carbonato –bicarbonato 0,5 M e preparado diluído solução C em ¼ 5ml de solução C
- 15 ml H₂O - Peroxidase (substrato)
- Preparar tampão citrato –fosfato solução A Na₂Po₄ 0,083M Acido cítrico 0,036 M

PROTOCOLO - PVDF

- Para as transferências Western de Novex® ou outros mini-géis, preparar as soluções para membranas de PVDF conforme descrito na tabela a seguir para ~ 60 cm² de membrana.
- Solução Para PVDF membrana
- Bloqueio Solução Ultra água filtrada 5 ml
- Bloqueador / diluente (Parte A) 2 ml Bloqueador / diluente (Parte B) de 3 ml de volume total de 10 ml
- Anticorpo primário Diluente Água Ultra filtrado 7 ml
- Bloqueador / diluente (Parte A) 2 ml Bloqueador / diluente (Parte B) de 1 ml de volume total de 10 ml
- Diluir o anticorpo primário para este diluente de acordo com as recomendações do fabricante. Tipicamente, as preparações de anticorpos primários comerciais são diluídas a 1: 1000 a 1: 5000 a uma concentração de cerca de 1-0,2 µg / ml.
- Anticorpo Wash Ultra filtrada de água 150 ml de solução de lavagem de anticorpos (16X) 10 ml de volume total de 160 ml

WesternBreeze® Chromogenic Imunodeteção Protocolo

Protocolo para pequenas membranas (60 cm²)

- 1 Coloque a membrana em 10 ml de solução de bloqueio apropriado num coberto, prato de plástico fornecidos com o kit. Incubar durante 30 minutos a um conjunto de agitador rotativo a 1 rotação / seg. Decantar a solução de bloqueio.
- 2 Lavar a membrana com 20 ml de água durante 5 minutos, em seguida decantar. Repetir uma vez.
3. Incubar a membrana com 10 ml de solução de anticorpo primário durante 1 hora, em seguida decantar.
4. Lavar a membrana durante 5 minutos com 20 ml de preparado de lavagem Anticorpo, decantar. Repita 3vezes.
5. Incubar a membrana em 10 ml de solução de anticorpo secundário por 30 minutos, em seguida decantar.
- 6 Lavar a membrana durante 5 minutos com 20 ml de anticorpo de lavagem, em seguida decantar. Repita 3 vezes.

- 7 Lavar a membrana com 20 ml de água durante 2 minutos, em seguida decantar. Repita duas vezes.
8. Incubar a membrana em 5 ml de substrato cromogénico até bandas roxo desenvolver sobre a membrana. Desenvolvimento está completa em 1 a 60 minutos.
- 8 Lavar a membrana com 20 ml de água durante 2 minutos. Repita duas vezes.
- 9 Seca-se a membrana sobre uma folha limpa de papel de filtro para o ar livre, por uma corrente de ar ligeiramente quente, ou sob uma lâmpada de infravermelhos.

PROTOCOLO DE DOT BLOT

1. Ter membrana de nitrocelulose pronta, desenhe grade pelo lápis para indicar a região que a amostra será colocada.
2. Utilizar pipeta de ponta, manchar 2 ul de amostras para a membrana de nitrocelulose no centro da grade. Minimizar a área que a solução penetra (normalmente 3-4 mm diam.), Aplicando-o lentamente.
3. Deixe secar membrana.
4. bloquear sites não-específicas por imersão em 5% BSA em TBS-T (0,5-1 h, RT). Use 10 centímetros Disco de Petri para a câmara de reação.
5. Incubar com anticorpo primário (0,1-10 ug / ml para o anticorpo purificado, 1: 1000 e 1: 100000 diluição de anti-soros, para 1: 100 a 1: 10000 para o sobrenadante de hibridoma) dissolvido em BSA / TBS-T durante 30 min à RT.
6. Lavar três vezes com TBS-T (3 x 5 min).
7. Incubar com anticorpo secundário conjugado com HRP (para melhor diluição, seguir a recomendação do fabricante) por 30 minutos em temperatura ambiente.
8. Lavar três vezes com TBS-T (15 min x 1, 5 min 2 x), depois uma vez com TBS (5 min).

9. Incubar com o reagente ECL por 1 min, cubra com Saran-wrap (remover solução excessiva da superfície), e expor filme de raios-X na sala escura. Experimente vários comprimentos diferentes de exposição.

10. Compare o sinal do seu amostra desconhecida ao de padrão e estimar a concentração.

IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Materiais:

- Anti-IgG camundongo alexa 488 (*os anticorpos devem se diluídos em PBS-Tween*)
- DAPI (1/10.000) 10mg/ml
- PBS-TWEEN (100ul de Tween em 800ml de PBS1x, homogeneizar bem)

Glicerina tamponada (9ml de glicerina e 1ml de PBS1x)

Painel de marcação

Tubos	Anticorpo primário	Alexa 488	Anticorpo secundário
CN			
CN 2°		X	X
CN 1°/2°	X	X	X
Ci		X	X
Ci 2°		X	X
Ci 1°/2°	X	X	X

PROCEDIMENTO

1. Prepara as diluições e anticorpos primários(1/800) e secundários (1/200);
2. Lavar 3x usando PSB-Tween aspirando e colocando 30ul sem deixar secar, espere 3 minutos para cada lavagem;
3. Colocar anticorpo primário incubando em câmara húmida por 30 minutos à 37°C ao abrigo de luz;
4. Lavar 5x usando PSB-Tween aspirando e colocando 30ul sem deixar secar, espere 3 minutos para cada lavagem;
5. Colocar o anticorpo secundário incubando em câmara húmida por 30 minutos à 37°C ao abrigo de luz;
6. Lavar 5x mergulhando em PBS-Tween;
7. Colocar a glicerina tamponada e lamínulas, ler no microscópio de fluorescência.



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

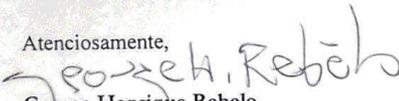
Número do Protocolo: 016/2015	Data de Entrada: 25/05/2015
Pesquisador Responsável: ANDREIA FERREIRA DA SILVA	
Título do Projeto: "Produção de anticorpos para detecção de Escherichia coli enteropatogênica."	
Instituição Responsável: INPA	

RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 06.08.2015.

Atenciosamente,


George Henrique Rebelo
Presidente CEUA-INPA
PO n. 079/2015