

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**UTILIZAÇÃO DO *QUORUM SENSING* NA EXPRESSÃO
DE ANTÍGENOS VACINAIS EM *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA**

Régis Tuchtenhagen Sturbelle

Pelotas, outubro de 2009

RÉGIS TUCHTENHAGEN STURBELLE

**UTILIZAÇÃO DO *QUORUM SENSING* NA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS
VACINAIS EM *Escherichia coli* Enterotoxigênica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências (M.Sc.) (área do conhecimento: Microbiologia).

Orientação:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (UFPel)

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S935u Sturbelle, Régis Tuchtenhagen
Utilização do quorum sensing na expressão de antígenos
vacinais em *Escherichia coli* enterotoxigênica / Régis Tuchte-
nhagen Sturbelle ; orientador Fábio Pereira Leivas Leite. – Pe-
lotas, 2009. – 62f. – Dissertação (Mestrado). Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia. Centro de Biotecnologia.
Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2009.

1.Biotecnologia. 2.Quorum sensing. 3.Meio condiciona-
do. 4.*Escherichia coli*. 5.Colibacilose suína. I.Leite, Fábio Pe-
reira Leivas II.Título.

CDD: 615.372

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite (orientador)

Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin

Prof. Dr. Carlos Gil Turnes

Prof. Dr^a. Sibeles Borsuk

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado do esforço conjunto de muitos amigos e profissionais aos quais manifesto o mais profundo agradecimento, sem deixar de agradecer primeiramente a Deus pelo imensurável dom da vida e pelas valiosas oportunidades concedidas.

À Universidade Federal de Pelotas, verdadeiro centro de excelência, celeiro do saber que colocou ao meu dispor as ferramentas necessárias ao meu aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Centro de Biotecnologia (Cenbiot) em especial ao prof. Dr. Odir por possibilitar a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Paulo e Loiva, aos meus irmãos, Marcelo e Rogério e aos meus avôs, pelo apoio e incentivo sempre que necessitei.

Particularmente, registro um muito obrigado ao prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite, pela orientação, amizade, e pronta colaboração em todos os momentos, sempre de forma atenciosa e agradável, dando-me apoio, incentivo e demonstrando confiança na minha capacidade.

Aos funcionários do biotério, e da sala de preparo de materiais, pelo carinho e apoio recebidos, em especial a Fabi e a Jú.

Aos amigos e colegas do CENBIOT, pelo bom ambiente de trabalho e pelos momentos compartilhados.

À querida Alegani do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Aos colegas e amigos do Laboratório: Rita, Talita, Adalgisa, Carina, Andréia, Luana, Lorena, Diego, Bruno, Marília, Marina, Priscila e Juliano pelo carinho e apoio recebidos.

Ao Professor Rodrigo Kruger pelo apoio nas análises estatísticas.

À professora Maria da Graça Martino Roth pela amizade, carinho e incentivos recebidos durante o período de graduação e pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

RESUMO

Sturbelle, Régis Tuchtenhagen, Universidade Federal de Pelotas, outubro de 2009.
UTILIZAÇÃO DO *QUORUM SENSING* NA EXPRESSÃO DE ANTÍGENOS VACINAIS EM *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA. Orientador: Fábio Pereira Leivas Leite.

Um dos maiores problemas sanitários que causam prejuízo à suinocultura é a diarreia causada por *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC). Esta é a causa infecciosa mais comum de mortalidade em animais em aleitamento e no período pós-desmame. Os fatores primários de patogenicidade desta bactéria são as fímbrias, que as ancoram a receptores específicos dos enterócitos permitindo que as enterotoxinas, toxinas termo estáveis (ST) e toxinas termo lábeis (LT) desencadeiem uma sucessão de eventos levando à diarreia. Outra estrutura é o flagelo que possui um papel na estimulação de células na produção de citocinas pró-inflamatórias através da interação com receptores Toll-like 5 (TLR5), sinalizando o recrutamento e ativação de células, desta forma ampliando a inflamação local bem como a apresentação de antígeno aos linfócitos. *Quorum Sensing* é um sistema de sinalização entre as bactérias, os quais produzem substâncias denominadas de auto-indutores (AI). Quando os auto-indutores alcançam uma determinada concentração, decorrente do aumento da densidade celular ocorre uma ativação de fatores transcricionais que acabam regulando a expressão gênica. As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), produzidas pelas células nervosas, utilizam a via de sinalização do auto-indutor tipo 3 (AI-3) que têm um papel significativo na expressão gênica, estimulando o crescimento e a expressão de fatores de virulência de *Escherichia coli*. O objetivo deste estudo foi utilizar o sistema de sinalização "*Quorum Sensing*" para induzir a expressão "*in vitro*" de antígenos vacinais de *Escherichia coli* Enterotoxigênica cultivadas em diferentes condições de indução mediada pelos meios condicionados (mc). Diferentes concentrações de mc foram utilizadas, sendo que o maior crescimento inicial e a maior expressão de antígenos de interesse foram obtidos com 50% de meio condicionado adicionado de 500 µM de adrenalina. No ensaio de motilidade foi observado um aumento de 16 vezes em relação ao controle. Pelas técnicas de ELISA, hemaglutinação, inibição da hemaglutinação e Dot blot foi observado uma maior expressão de fimbria (F4) e pelas técnicas de Dot blot, ELISA e RT-PCR foi observado aumento da expressão de LT. Baseado nesses dados

testou-se uma bacterina utilizando 50% de mc e 500 μ M de adrenalina com $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adjuvante. Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas com 5 semanas de idade que foram vacinados por via subcutânea com 250 μ L nos dias 0 e 14. A avaliação da resposta imune foi realizada através de soroconversão frente aos antígenos estudados por meio de ELISA e inibição da hemaglutinação. O grupo vacinado com a bacterina com mc obteve uma soroconversão significativamente superior ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a presença de mc com adrenalina são capazes de ativar a expressão de importantes antígenos vacinais, tornando desta forma a bacterina mais eficiente.

Palavras-chave: *Quorum sensing*, meio condicionado, *Escherichia coli*, colibacilose suína.

ABSTRACT

Sturbelle, Régis Tuchtenhagen, Universidade Federal de Pelotas, outubro de 2009.

THE USE OF *QUORUM SENSING* FOR EXPRESSION OF VACCINAL ANTIGENS OF *Escherichia coli* ENTEROTOXIGENIC. Adviser: Fábio Pereira Leivas Leite.

One of the most important sanitary problems that cause economic losses in swine industry is the diarrhea caused by Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). It is the main infectious cause of mortality for animals in suckling and post-weaning periods. Their primary factors of pathogenicity are the fimbriae, which bond the bacteria to specific receptors of the enterocytes. This causes a succession of events, brought about by the enterotoxins, the stable toxins (ST) and heat-labile toxins (LT), leading to diarrhea. Another important structure is the flagellum, which has an important role in cell stimulation to produce pro-inflammatory cytokines through the interaction with Toll-like receptors (TLR5), signaling cell recruitment and activation, thus increasing local inflammation as well as antigen presentation to lymphocytes. Quorum Sensing is a signaling system among bacteria that uses substances denominated auto-inducers (AI). When the auto-inducers reach a certain concentration, due to an increase of cell density, there is an activation of transcriptional factors, which regulate the gene expression. The catecholamines (adrenaline and noradrenalin), produced by nervous cells, use the auto-inducer type 3 (AI-3) pathway. These have a significant role in gene expression as they stimulate the growth and the expression of virulence factors of the *Escherichia coli*. The goal of the present study was to produce experimental vaccines containing total cultures of ETEC cultivated in different induction conditions, mediated by the conditioned media (mc) so as to study the expression of vaccine antigens. Different concentrations of mc were used, with the 50% of conditioned media added with 500 μ M of adrenaline having the major initial growth and antigen expression. In the motility assay, a sixteen-fold increase was observed in comparison to the control. By the ELISA, hemoagglutination, hemoagglutination inhibition and Dot Blot techniques, a higher expression of fimbriae (F4) was observed, whereas by Dot Blot, ELISA and RT-PCR techniques an increase of LT expression was observed. Based on this data a bacterin was prepared using 50% of mc and 500 μ M of adrenaline, with $\text{Al}(\text{OH})_3$ as an adjuvant. Five weeks old Swiss female mice were vaccinated twice with 250 μ L subcutaneously on days 0 and

14. The vaccine immune response was evaluated by ELISA and hemoagglutination inhibition. The mc bacterin vaccinated group respond with a seroconversion significantly higher than the control group. These results suggest that the presence of mc with adrenaline is capable of activating the expression of important vaccine antigens, therefore making bacterin more efficient.

Key-words: *Quorum sensing*, conditioned media, *Escherichia coli*, swine colibacillosis.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Curva de Crescimento.

FIGURA 2. Expressão de Antígeno Fimbrial F4.

FIGURA 3. Expressão da Toxina Termo-Lábil (LT).

FIGURA 4. Motilidade.

FIGURA 5. RT-PCR dos Genes Codificantes para 16S rDNA (393 pb), Fimbria (*faeg*) (764 pb) e Toxina Termo-Lábil (273 pb).

FIGURA 6. Avaliação da Resposta Imune.

ABREVIATÖES

ad - Adrenalina

Als - Auto-Indutores

BHA - Ágar Cerebro e Coração

BHI - Infusão de cérebro e coração

cDNA - DNA Complementar

CT - Toxina Cólerica

DAB - Diaminobenzidina

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DO - Densidade Óptica

ELISA - Ensaio Imuno Enzimático

ETEC - *Escherichia coli* Enterotoxigênica

HA - Hemaglutinação

IHA - Inibição da Hemaglutinação

IL-8 - Interleucina-8

LB - Lúria Bertani

LT - Toxina Termo-Lábil

mc - Meio Condicionado

MEM - Minimum Essential Medium

OPD - Ortho-23 Phenylenediamine

PAIs - Ilhas de Patogenicidade

PBS - Tampão Fosfato Salina

PBS-T - Tampão Fosfato Salina com Tween

QS - *Quorum Sensing*

SC - Soroconversão

ST - Toxina Termo-Estável

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
1.0 INTRODUÇÃO GERAL	13
2.0 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3.0 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Regulação Gênica em Bactérias	17
3.2 <i>Quorum Sensing</i>	18
3.3 <i>Escherichia coli</i>	21
3.4 <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica (ETEC) e colibacilose suína	21
3.5 Fimbrias de Enterobactérias	24
3.6 Fimbria F4 (K88) de ETEC	25
3.7 Receptores - F4R	26
3.8 O papel das Enterotoxinas na Diarréia em Suínos	26
3.9 Imunoterapia Passiva	27
3.10 Vacinas	27
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Bactérias e Meios de Cultura.....	29
4.2 Preparo do Meio Condicionado	29
4.3 Crescimento Bacteriano	29
4.4 Expressão de Fímbrias	29
4.5 Motilidade	30
4.6 Avaliação Molecular.....	30
4.7 Preparo da Bacterina.....	30
4.8 Quantificação dos Antígenos Vacinais	31
4.8.1 Hemaglutinação - HA.....	31
4.8.2 Inibição da Hemoaglutinação - IHA	32
4.8.3 ELISA	32
4.8.4 Dot Blot.....	33
4.9 Titulação de Anticorpos	33

4.9.1 ELISA	33
4.9.2 Inibição da Hemoaglutinação - IHA	34
4.10 Análise Estatística	34
5.0 RESULTADOS.....	36
5.1 Curva de Crescimento	36
5.2 Expressão de Antígeno Fimbrial.....	36
5.3 Expressão da Toxina Termo-Lábil (LT)	38
5.4 Motilidade	38
5.5 Expressão dos Genes Codificantes do 16s, Fimbria F4 e LT por RT-PCR.	39
5.6 Avaliação da Resposta Imune	40
6.0 DISCUSSÃO.....	42
7.0 CONCLUSÃO	47
8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

As características fenotípicas de uma bactéria são determinadas pelo seu genótipo e pelo ambiente. As bactérias estão expostas a uma ampla gama de alterações nas condições ambientais que podem envolver temperatura, pH, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Embora as bactérias tenham ampla distribuição e podem ser encontradas nos diversos ambientes, cada grupo bacteriano está adaptado a condições que proporcionam condições ideais de crescimento, permitindo um potencial máximo de sobrevivência.

Alterações nas condições ambientais requerem rápida adaptação para assegurar a sobrevivência da população. Para se adaptar, a bactéria deve produzir algum componente estrutural ou funcional que lhe assegure a sobrevivência em novas condições ambientais. Do ponto de vista energético, a síntese de compostos orgânicos requer processos altamente dispendiosos para a célula. Portanto, regular os tipos e quantidades de compostos que serão sintetizados é muito efetivo para a otimização do crescimento de uma população bacteriana (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

A síntese de enzimas específicas como resposta a uma nova condição envolve a expressão de genes específicos, o que por sua vez, requer a existência de mecanismos de regulação gênica. A regulação pode afetar qualquer passo da expressão gênica, incluindo o início ou término da transcrição, a tradução, ou a atividade dos produtos gênicos (ALBERTS et al., 1998).

Existem duas categorias básicas de regulação gênica: a indução da expressão gênica e a repressão da expressão gênica. A indução da expressão de um ou mais genes resulta na síntese de enzimas cujos substratos se tornaram presentes em uma célula. Por outro lado, a repressão da expressão gênica impede que uma ou mais enzimas continuem a ser produzidas porque os produtos da atividade enzimática atingiram uma concentração ideal ou limite na célula.

A indução da expressão geralmente resulta na síntese de enzimas catabólicas em resposta à presença, no meio, de um substrato para uma determinada via metabólica, enquanto que a síntese de enzimas biossintéticas é reprimida pelo produto final de uma via metabólica. Dentro dessas duas categorias

de regulação gênica existem vários mecanismos reguladores e que vão determinar se um produto gênico em particular será ou não sintetizado.

Quorum Sensing é um sistema de sinalização entre as bactérias, as quais produzem substâncias denominadas de auto-indutores (AI) que ao atingirem uma determinada concentração, decorrente do aumento da densidade celular, desencadeiam a ativação de fatores transcricionais que acabam regulando a expressão gênica. Em bactéria Gram-Negativas existem basicamente três tipos de (AI): AI-1, associado à comunicação intra-específica, AI-2, responsável pela comunicação inter-específica e AI-3, responsável pela ativação gênica inter-reinos. As catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) produzidas pelas células nervosas de mamíferos podem utilizar a via de sinalização do auto-indutor tipo 3 (AI-3) que têm um papel significativo na expressão gênica bacteriana, estimulando o crescimento, aderência epitelial e a expressão de fatores de virulência de *Escherichia coli*.

A diarréia causada por *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) é um dos problemas sanitários que mais causam prejuízo à suinocultura. Esta é a causa infecciosa mais comum de mortalidade em neonatos e também no período pós-desmame. O agente é comensal do intestino delgado e para causar a doença precisa ser capaz de aderir à mucosa e de produzir toxinas. A adesão é mediada pela presença de apêndices fimbriais protéicos. As cepas produtoras de diarréias em suínos sintetizam como fatores primários de patogenicidade, fímbrias dos sorotipos F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) e F41.

Como a diarréia ocorre nos primeiros dias de vida, não é possível vacinar os animais de risco. A estratégia adotada tem sido a vacinação das fêmeas durante a gestação. A proteção aos leitões é dada pelo colostro que é capaz de conferir imunidade contra *E. coli*. Desde a década de 70, quando foi comprovada a participação das fímbrias como fatores primários de patogenicidade, estas estruturas têm sido utilizadas como imunógeno para induzir à síntese de anticorpos que bloqueiam a aderência bacteriana (FURER et al.,1982). Também tem sido demonstrado que a toxina Termo-Lábil (LT), na composição de vacinas atua de forma eficiente, induzindo a síntese de anticorpos específicos e protetores (RIISING; MURMANS; WITVLIET, 2005).

Tendo em vista a ocorrência de falhas no processo de vacinação com as bacterinas comercialmente utilizadas, a hipótese do presente estudo é que a

utilização de meio condicionado (mc) adicionado aos meios de cultura induzirão a expressão de antígenos vacinais importantes que normalmente não são expressos, ou pouco expressos por falta de estímulos específicos. Dessa maneira, nesse sistema de produção, será possível a obtenção de um melhor imunógeno, pois antígenos que são expressos em baixa quantidade ou não são expressos *“in vitro”* estarão compondo essa bacterina. Assim, esta será capaz de induzir uma resposta imune mais eficiente, protegendo os animais da doença e dessa forma evitando prejuízos econômicos.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O presente trabalho teve como objetivo utilizar o sistema de sinalização “*Quorum Sensing*” para induzir a expressão “*in vitro*” de antígenos vacinais de *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC).

2.2 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito da adição de meio condicionado (mc) aos meios de culturas na expressão de fimbria F4;
- Estudar o efeito da adição de meio condicionado (mc) aos meios de culturas na expressão de Toxina Termo-Lábil;
- Estudar o efeito da adição de meio condicionado (mc) aos meios de cultura na motilidade;
- Analisar por RT-PCR a expressão de Fimbria e da Toxina Termo-Lábil;
- Testar vacinas produzidas com este sistema de indução quanto a sua eficiência em camundongos.

3.0 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Regulação Gênica em Bactérias

No cromossomo bacteriano situam-se todos os genes essenciais para o metabolismo, sobrevivência e reprodução da célula bacteriana. Os plasmídios, moléculas menores, são também formados por DNA circular de fita dupla e são capazes de se auto-replicarem independentemente do DNA cromossômico (MATHEWS; VAN HOLD; AHERN, 2000). Os genes para múltiplos fatores de virulência frequentemente estão juntos em grandes blocos chamados de ilhas de patogenicidade (PAIs) (RUSSO; JOHNSON, 2000). Presume-se que os genes para os fatores de virulência organizam-se nessas PAIs pois ganham vantagens quando presentes em grupo e sendo assim são transmitidos horizontalmente para outra bactéria (JOHNSON; RUSSO, 2002). PAIs são regiões que carregam um ou mais genes de virulência; estão presentes no genoma de bactérias patogênicas, mas ausentes do genoma de representantes não patogênicos da mesma espécie ou espécie intimamente relacionada (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Genomas bacterianos estão organizados em unidade de expressão, também chamada de unidade de transcrição, que pode conter mais de um gene com um único promotor realizando a regulação de sua transcrição, e dando origem a um transcrito único contendo todos os genes a serem traduzidos. Neste caso trata-se de um operon, ou seja, um grupamento de genes adjacentes sob controle do mesmo promotor sendo, portanto, uma unidade genética de expressão coordenada. É uma forma de aperfeiçoar o processo, colocando próximos os genes que executam funções relacionadas (BONATO, 2004).

Na natureza, as bactérias apresentam-se como grupos coerentes capazes de habitar nichos ecológicos diversos (LASDUNSKI; VENTRE; STURGIS, 2004). Sendo assim, os microrganismos possuem diversos sistemas de regulação gênica que permitem respostas aos estímulos ambientais e adaptação às flutuações ocorridas no meio (WITHERS; SIMON; WILLIAMS, 2001; WHITEHEAD et al., 2001).

Diversos fatores ambientais podem levar a ativação ou repressão de determinados genes. A expressão gênica diferenciada pode ser mediada por mecanismos de transdução de sinais como, por exemplo, os sistemas de dois componentes (STOCK; ROBINSON; GOUDREAU, 2000), por fatores sigma

(WÖSTEN, 1998) e por mudanças topológicas no DNA mediadas ou não por proteínas (WHITEHEAD et al., 2001).

3.2 Quorum Sensing

Quorum Sensing (QS) é um mecanismo de transdução de sinal pelo qual bactérias podem modular diversas funções celulares (SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004) dentre elas a expressão de fatores de virulência (LYON; MUIR, 2003), formação de biofilme (MCLEAN et al., 1997), bioluminescência (DEFOIRDT et al., 2008), conjugação (HE et al., 2003), esporulação (VEENING; HAMOEN; KUIPERS, 2005) e motilidade (RASMUSSEN et al., 2000) de acordo com a densidade populacional.

QS é um sistema de sinalização entre as bactérias, os quais produzem substâncias denominadas de auto-indutores (AIs). Quando uma concentração crítica destas moléculas é alcançada no meio externo, o que corresponde a uma alta densidade celular ou quorum, toda a população pode então iniciar uma ação conjunta com a expressão coordenada de determinados genes (SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004; TJALSMA et al., 2004). Quando os AIs alcançam uma determinada concentração, decorrente do aumento da densidade celular, ocorre uma ativação de fatores transcricionais que acabam regulando a expressão gênica. Vários pesquisadores têm utilizado este sistema de sinalização *Quorum Sensing* para melhor entender a patogenicidade das bactérias (SURETTE; MILLER; BASSLER, 1999; SPERANDIO et al., 2001).

Enquanto as bactérias Gram-Positivas utilizam peptídeos modificados como moléculas sinalizadoras (SCHAUDER et al., 2001), a grande maioria de bactérias Gram-Negativas utilizam *N*-acil homoserina lactonas (AHLs). As AHLs diferem no tamanho e composição da sua cadeia acil lateral *N*-ligada, o que fornece a especificidade do sinal. As cadeias acil variam de 4 a 14 átomos de carbono, podendo conter uma ou mais duplas ligações e um grupo carbonila ou hidroxila no terceiro carbono (CÂMARA; DAYKIN; CHHABRA, 1998).

Em bactérias Gram-Negativas, o sistema QS possui, basicamente, quatro características principais: síntese e acúmulo da molécula indutora por uma proteína sintase; ligação do indutor à proteína receptora; ligação da proteína receptora

ativada à região promotora do gene alvo, atuando como regulador transcricional e; ativação ou repressão de características fenotípicas específicas (GRAM et al., 2002).

Em patógenos, por exemplo, uma expressão gênica de fatores de virulência reduzida é mantida quando a densidade populacional encontra-se baixa, evitando que o organismo hospedeiro inicie uma resposta imune. Quando um número suficiente de bactérias é alcançado, há a expressão dos genes de virulência e, assim, as bactérias são capazes de vencer as defesas do hospedeiro (DONABEDIAN, 2003). As bactérias apresentam vantagens ao expressarem determinados genes somente quando a densidade populacional é suficiente mente alta. O sistema pode conferir à célula economia de energia, pela não expressão de fenótipos requeridos somente em populações altas quando a densidade populacional é baixa (GRAM et al., 2002). Um gasto desnecessário de energia seria realizado se as bactérias comesçassem a produzir estes fatores antes que uma população mínima fosse atingida (GREENBERG, 2000).

QS foi primeiramente descrito na regulação da bioluminescência em *Vibrio fischeri* (NEALSON; PLATT; HASTINGS, 1970). *V. fischeri* é uma bactéria Gram-Negativa, bioluminescente, marinha, aeróbica facultativa, que vive tanto como simbionte em certos órgãos de peixes marinhos e lulas e, como um organismo de vida livre na água do mar. Quando ocorre baixa densidade bacteriana na água do mar, as bactérias não emitem luz. No entanto, quando existe alta densidade celular no interior dos órgãos, a população emite luz e torna-se bioluminescente (MEIGHEN, 1994).

As águas habitadas por esses organismos são geralmente rasas e, à noite, a Lua é a única fonte de luz disponível. Os predadores podem detectar com facilidade as sombras de suas presas se movimentando a frente da luz da Lua. No entanto, a produção de luz no órgão luminoso da lula mascara sua sombra, diante da luz da Lua, confundindo seus predadores. Assim, as bactérias luminescentes garantem abrigo e um ambiente farto em nutrientes. Já quando estão dispersas no mar, a produção de luz seria um gasto desnecessário de energia, pois não traria qualquer vantagem (RUBY; MCFALL-NGAI, 1992; RUBY, 1996).

O operon da luciferase em *V. fischeri* é regulado por duas proteínas, LuxI, que é responsável pela produção do auto-indutor N-acil-homoserina-lactona (AHL) e LuxR, que é ativada por este auto-indutor para aumentar transcrição do operon da

luciferase (ENGEBRECHT, NEALSON, SILVERMAN, 1983; ENGEBRECHT; SILVERMAN, 1984). A partir dessa primeira descrição, homólogos de LuxR-LuxI foram identificados em outras bactérias e, em todos esses sistemas LuxR-LuxI, as bactérias produzem um auto-indutor AHL, que se liga à proteína LuxR e regula a transcrição de vários genes envolvidos em uma variedade de fenótipos (DAVIES et al., 1998; PARSEK; GREENBERG, 2000). Um grande número de outras bactérias Gram-Negativas possuem o tipo de proteínas LuxI/R e utiliza o sistema de comunicação com sinais AHL (MANEFIELD; TURNER, 2002). Estes sistemas são utilizados, sobretudo para comunicação intra-específica como extrema especificidade (FUQUA, 1999).

Bactérias da espécie *Vibrio harveyi* apresentam um sistema de sensoramento populacional diferente e alternativo daquele observado em *V. fischeri*. Neste microrganismo, existem dois sistemas de sensoramento populacionais independentes, cada qual sintetiza, detecta e responde a moléculas sinais específicas para controlar a bioluminescência. Um destes sinais, AI-1 (4-OH-C4-HSL), é codificado por dois genes *luxL* e *luxM*, nenhum deles similar a *luxI* de *V. fischeri* (BASSLER et al., 1993). O segundo auto-indutor, AI-2, é um furanosil borato diéster (BASSLER et al., 1993). AI-1 e AI-2 são detectados pelas proteínas sensoras LuxN e LuxPQ, respectivamente (FREEMAN; LILLEY; BASSLER, 2000). Ao contrário de *V. fischeri*, a transdução de sinal via AI-1 e AI-2 envolvem uma cascata de fosforilação (BASSLER et al., 1993). Em alta densidade populacional, os sensores LuxN e LuxPQ detectam seus respectivos indutores, AI-1 e AI-2, que convertem LuxN e LuxQ para fosfatases (FREEMAN; LILLEY; BASSLER, 2000). A codificação de AI-2 pelo *luxS* foi encontrado na metade das bactérias que tiveram seu genoma seqüenciado e isso leva a hipótese de que as bactérias utilizam essa molécula para comunicação intra-específica e inter-específica (XAVIER; BASSLER, 2003).

Nos mamíferos, os hormônios adrenalina e noradrenalina têm demonstrado similaridade com AI-3 no sistema *Quorum Sensing*. Ambos podem substituir o AI-3 na regulação da expressão dos genes de virulência de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (SPERANDIO et al., 2003). AI-3 e adrenalina / noradrenalina são reconhecidos pelo mesmo receptor. Um dos receptores conhecido para a detecção desses sinais é o sistema de dois componentes QseBC. O QseBC responde a AI-3 e adrenalina / noradrenalina e regula a transcrição das proteínas que compõem o

flagelo, bem como a sua própria transcrição (SPERANDIO; TORRES; KAPER, 2002; CLARKE; SPERANDIO, et al., 2003; SPERANDIO, 2005;).

3.3 *Escherichia coli*

No gênero *Escherichia* são classificadas cinco espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, porém a espécie *E. coli* é considerada a espécie de importância do gênero (HOLT et al., 1994; CAMPOS; TRABULSI, 1999). Os organismos da espécie *E. coli* são Gram-Negativos, possuem a forma de bastonetes, não formam esporos, geralmente são móveis pela presença de flagelos peritríquios, existindo também cepas imóveis, algumas possuem cápsula e são considerados como parte da microbiota normal do trato intestinal do homem e da maioria dos animais de sangue quente (DOYLE; CLIVER, 1990).

O genoma de forma circular apresenta $4,0 \times 10^6$ pares de bases com peso molecular de aproximadamente $2,5 \times 10^9$ daltons. *E. coli* é sorotipada baseada no lipopolissacarídeo (LPS) antígeno O, antígeno flagelar H e antígenos de superfície. Usando as combinações de O e H é possível a obtenção de mais de 10.000 sorotipos O:H. O antígeno capsular K, foi utilizado para representar o antígeno fimbrial, por causa de sua íntima associação com a cápsula, porém uma nova nomenclatura foi introduzida, classificando as fimbrias com antígeno F (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Esta espécie apresenta diferentes categorias conhecidas, com relação às infecções intestinais: *E. coli* Enterotoxigênica, *E. coli* Enteroinvasora, *E. coli* Enteropatogênica, *E. coli* Enterohemorrágica, *E. coli* Enteroagregativa e *E. coli* que adere difusamente (BOUCKENNOOGHE et al., 2002).

3.4 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) e colibacilose suína

Escherichia coli é uma importante causa de diarreia em suínos recém-nascidos e de recria, e é responsável por perdas econômicas em granjas de todo o mundo (MOSELEY et al., 1986; KHAC et al., 2006). Esta é a causa infecciosa mais comum de mortalidade em neonatos e também no período pós-desmame (ZHANG, 2007).

Os distúrbios gastrintestinais são resultados da intensificação da produção e falhas no manejo dentro da suinocultura. A fase mais crítica para os leitões é o período pós-desmame, pois uma série de eventos estressantes atinge estes animais

tornando-os predispostos a problemas entéricos (BERTOL; BRITO, 1998; TSILOYANNIS et al., 1998; MORES; AMARAL, 2001; RANTZER; SVENDSEN, 2002). As diarréias são as mais importantes causas de mortalidade, atraso no crescimento e decréscimo na taxa de conversão alimentar em leitões, gerando perdas econômicas severas (MELIN et al., 1998; PEJSACK et al., 1998). A literatura atribui ao patotipo *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC) a principal categoria de diarréia causadora de infecções entéricas em suínos (GYLES, 1994; NAGY; FEKETE, 1999; FRANCIS, 2002; FRYDENDAHL, 2002; ZANG et al., 2007; AMEZCUA; FRIENDSHIP; DEWEY, 2008;).

Esse fato é observado principalmente em rebanhos de porcas jovens, considerando que leitões nascidos de porcas mais velhas, mostram menor vulnerabilidade. As vacinações das porcas são capazes de imunizar os leitões, por transferência de anticorpos contra *E. coli*, via colostro (KOHLE, 1974; AVILA et al., 1986).

Inicialmente as vacinas eram produzidas com culturas de ETEC inteiras (bacterinas), mas foi demonstrado que a adição de fimbrias purificadas em tais vacinas aumentavam a proteção dos leitões (NAGY et al., 1978). Também foi demonstrado que fimbrias F4 (K88), F5 (K99) e F6 (987P) poderiam induzir proteção contra *E. coli* Enterotoxigênica que expressam antígenos homólogos (RUTTER et al., 1976; MORGAN et al., 1978).

As fímbrias de *E. coli* diarreogênica, assim como outros fatores de patogenicidade, enterotoxinas, colicinas, hemolisinas, são codificados em plasmídios (MILON, 1993). Sua síntese depende da ativação de um operon que codifica várias proteínas, a maior parte delas envolvidas na exportação, montagem e ancoragem das fímbrias. Para que elas sejam exportadas é necessário que todos os genes do operon sejam expressos (MILON, 1993).

E. coli Enterotoxigênica que causam diarréias em animais apresentam cinco diferentes tipos de fimbrias, F4 (K88), F18, F5 (K99), F6 (987P), e F41. As fimbrias F5, F6 e F41 são normalmente associadas à ETEC que causam diarréia em suínos neonatos, enquanto F4 e F18 estão mais relacionadas à diarréia pós-desmame (WILSON; FRANCIS, 1986; FRYDENDAHL, 2002; VU-KHAC; HOLODA; PILIPCINEC, 2004; FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005; NAGY; FEKETE, 2005; DO et al., 2005).

Diarréias que ocorrem em animais e/ ou homem são freqüentemente devidas à infecções ocasionadas por tipos de *E. coli* Enterotoxigênica (ETEC), Vero - ou Shiga- toxina (VTEC ou STEC), Necrotoxigênica (NTEC), Enteropatogênica (EPEC), Enterohemorrágica (EHEC), Enteroagregativa (EAggEC), e Enteroinvasiva (EIEC) (NAGY; FEKETE, 2005). Destes patótipos, ETEC é a causa mais importante e global de diarreia severa, em bovinos recém nascidos e suínos no período de amamentação e pós-desmame. De forma interessante, é muito raro em outros animais de criação como coelhos, cavalos e aves, pois estes não possuem receptores responsáveis pela aderência da bactéria aos enterócitos. No homem ETEC é reconhecido como uma das mais freqüentes (às vezes fatal) causas de diarreia de infância nos países em desenvolvimento, e como agente causativo importante da diarreia de viajante (DALTON et al., 1999; BOUCKENOOGHE et al., 2002;).

ETEC são conhecidas por se aderir ao epitélio intestinal sem induzir significantes mudanças morfológicas. Elas produzem proteínas (enterotoxinas) que alteram as funções de enterócitos, aumentando a secreção e reduzindo a absorção. Assim, os principais fatores de virulência atribuídos a ETEC são as adesinas, apêndices chamados fimbrias e as enterotoxinas (BERBEROV et al., 2004; ZHANG et al., 2006). Uma vez estabelecida à colonização intestinal, ETEC pode produzir LT, e/ ou ST que agem nos enterócitos, provocando diarreia secretória (SEARS; KAPER, 1996).

Outra importante estrutura bacteriana é o flagelo. Este faz parte do mecanismo sensorial da bactéria que permite ao microrganismo responder a estímulos quimiotáticos ou simplesmente evitar um ambiente desfavorável. A flagelina é a principal proteína constituinte do flagelo, que são apêndices superficiais que estão envolvidos na locomoção bacteriana. Recentemente, foi demonstrado que o flagelo possui um papel importante na estimulação de células, na expressão e secreção de citocinas pró-inflamatórias através da interação com receptores Toll-like 5 (TLR5) (GOLDSBY et al., 2003). Bambou et al., (2004), demonstrou que a flagelina de *E. coli* estimula os enterócitos a expressar e secretar a citocina IL-8 que é um potente quimiotático e ativador de neutrófilos. A sinalização através do TLR pode ainda aumentar o recrutamento e ativação de células imunes bem como a apresentação de antígeno às células T (KOOYK; GEIJTENBEEK, 2003), sugerindo

que o flagelo possui papel importante na patogenia da ETEC até então pouco estudado. Recentes trabalhos demonstram vantagens no uso da flagelina como adjuvante de mucosa, mostrando resultados atrativos e promissores na utilização deste antígeno (PINO; MARTIN; MICHALEK, 2005; HONKO et al., 2006; LEE et al., 2006).

Em adição aos fatores de virulência, ETEC muitas vezes possui um gene *hlyA* responsável pela produção de α -hemolisina. A presença de α -hemolisina é de fácil confirmação, indicado pela presença de zonas claras de hemólise circundante em colônias crescidas em ágar sangue (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). As hemolisinas são proteínas que são secretadas extracelularmente (exoproteínas) por algumas cepas de *E. coli*, as quais possuem uma ação citotóxica, provocando lise em uma variedade de tipos de células incluindo eritrócitos, fibroblastos e leucócitos (CAVALIERI; BOHACH; SNYDER, 1985; KONIG et al., 1986). Zhang et al., (2007), analisando a prevalência de fatores de virulência em *E. coli* isolados de surtos de diarreia em leitões nos Estados Unidos da América, observaram que mais de 64% das amostras analisadas apresentavam atividade hemolítica.

A hemolisina pode contribuir no processo da doença de três modos: a) por ser citotóxica para as células do tecido “in vitro”, logo deve prejudicar as células “in vivo” e contribuir diretamente para a patologia do tecido; b) afetando os mecanismos de defesa do hospedeiro (leucócitos e suas funções) permitindo a sobrevivência do microrganismo; c) lise do eritrócito, mecanismo através do qual o microrganismo irá obter ferro para permanecer vivo e para continuar a síntese de hemolisina (CAVALIERI; BOHACH; SNYDER, 1985).

3.5 Fimbrias de Enterobactérias

Escherichia coli apresenta várias proteínas em sua superfície que fazem a ligação aos receptores das células dos mamíferos. Entre estas estão às fimbrias que permitem a persistência da bactéria em tecidos alvos, desempenhando um papel importante na patogênese (HUNG; HULTGREN, 1998). Fimbrias são apêndices protéicos de 0,5 -1,5 microns distribuídos na superfície da bactéria, que permitem a aderência a receptores específicos. São encontradas de 100 a 300 fimbrias por bactéria. As fimbrias são classificadas de acordo com a presença e a posição de vários aminoácidos na subunidade maior (OTTOW, 1975).

3.6 Fimbria F4 (K88) de ETEC

O antígeno F4 forma um envelope em torno da parede celular da bactéria e foi descrito pela primeira vez em 1961 (GAASTRA; GRAAF,1982). Sua presença é considerada um fator de patogenicidade da bactéria. Com o uso de antisoros específicos obtidos com a adsorção de antisoros policlonais com bactérias de subtipos heterólogas, foi possível distinguir 3 variantes da fimbria F4: K88ab, K88ac e K88ad. O fator “a” representa um ou mais determinantes antigênicos comuns, enquanto que os fatores “b, c e d” são específicos a cada subtipo (ZIJDERVELD et al., 1990).

As fímbrias são compostas por uma subunidade principal que forma a estrutura da fimbria. Além desta subunidade principal, existem outras menores que estão estruturalmente relacionadas à subunidade principal. Estas subunidades menores possuem funções especializadas na biossíntese da fimbria. Elas podem estar envolvidas na iniciação, alongamento e/ou terminação da fimbria (DYKES *et al.*, 1985).

Os genes *faeA* e *faeJ* estão localizadas em um plasmídio e codificam as proteínas correspondentes FaeA a FaeJ que atuam como chaperonas, cujas funções são dar conformação à fimbria. F4 tem um peso molecular de aproximadamente 26 kDa, conforme determinado por gel dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS PAGE) (MOOI; DE GRAAF; VAN EMBDEN,1979). As fímbrias apresentam um comprimento de aproximadamente 1 µm, compostas por centenas de repetições da subunidade maior FaeG, com um menor número das outras subunidades intercaladas em toda a estrutura. As subunidades menores não são apenas partes estruturantes da fimbria, mas apresentam funções importantes. Por exemplo, FaeC age como molde para a adição das subunidades maiores para iniciar a síntese fimbrial (BAKKER et al., 1992). FaeH e FaeF são intercaladas atuando como andaimes na formação da fimbria. FaeA, atua como um repressor da síntese fimbrial. FaeD age como um modelador da membrana externa e FaeE representa uma chaperona. A montagem da fimbria F4, começa com a expressão dos genes *faeB* através de *faeJ*, cuja taxa de transcrição é influenciada pelo nível do repressor *faeA*. FaeC desencadeia a montagem da fimbria uma vez que atua como molde para as demais subunidades, permitindo a elongação, sendo acoplada na membrana por FaeD (VAN DEN BROECK; COX; GODDEERIS, 2000). Essa complexa montagem

da fimbria pode dar três variantes “ab”, “ac” e “ad” de comprimentos variáveis. Por exemplo, F4ab e F4ad são formados por 264 aminoácidos, enquanto que F4ac por 262 aminoácidos. Essa variação fimbrial é baseada na diferença de aminoácidos na sequência primária (VAN DEN BROECK; COX; GODDEERIS, 2000).

3.7 Receptores - F4R

Além dos fatores de aderência e virulência, também envolve fatores do hospedeiro sendo que os mais importantes são os receptores para adesinas e enterotoxinas. O F4R está localizado nas vilosidades intestinais, o que facilita a ligação de ETEC F4, levando à colonização e consequentemente à diarreia. A ligação de ETEC aos enterócitos intestinais é uma condição prévia para que ocorra a colonização e posteriormente diarreia em suínos (BERTSCHINGER; FAIRBROTHER, 1999, CHAE, et al, 1998). Essa ligação se dá através de receptores específicos presentes no intestino, no entanto existem suínos que possuem deficiências desses receptores e consequentemente são resistentes a infecções relacionadas (VAN DEN BROECK; COX; GODDEERIS, 1999; MEIJERINK et al., 2000).

3.8 O Papel das Enterotoxinas na Diarreia em Suínos

Infecções causadas por ETEC F4 são responsáveis por mortalidade e morbidade em leitões no período neonatal e pós-desmame. ETEC que expressam fimbrias F4 se aderem às células epiteliais intestinais de suínos que apresentam receptores F4R⁺ resultando a colonização e subsequentemente secreção de enterotoxinas que leva ao processo de diarreia (SNOECK et al., 2006). Dependendo da cepa de ETEC F4, ela pode expressar Toxina Termo-lábel (LT) e/ ou Toxina Termo-Estável (ST) (MORA, 2005). LT se apresenta em duas variantes, LT1 e LT2. A primeira se assemelha com a toxina da cólera e a LT2, não está associada com a doença (HOLMES; TWIDDY; PICKETT, 1986; NATARO; KAPER, 1998; FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005). A LT1 é composta de 5 subunidades B e uma subunidade A. A subunidade B é responsável pela ligação ao receptor enquanto que a subunidade A é responsável por estimular a produção de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) levando a modificações intracelular e alterações no citoesqueleto, ocasionando uma maior atividade transportadora da membrana.

Essas alterações levam à secreção de cloro e bicarbonato das células intestinais, ocasionando a diarreia (SIXMA, 1993; NATARO; KAPER, 1998). Estudo recente realizado por Johnson e colaboradores (2009), demonstraram que a LT tem a capacidade de aumentar a aderência de ETEC em células intestinais de suínos, favorecendo o processo de patogênese.

A ST, também se apresenta em duas variantes, STa e STb, ambas envolvidas no processo que leva a diarreia. A STa induz o aumento de guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que ativa canais iônicos facilitando a passagem de cloro para fora da célula e para dentro da luz intestinal. STa também é responsável por dar início ao rearranjo do citoesqueleto que contribui para a resposta secretória intestinal (SNOECK et al., 2006). STb estimula o aumento da produção de serotonina e prostaglandina a partir das células intestinais, resultando em aumento de (cAMP) levando à diarreia (HITOTSUBASHI et al., 1992; FUJII; KONDO; OKAMOTO, 1995).

3.9 Imunoterapia Passiva

Enquanto a indução de uma resposta imune protetora através de vacinação leva vários dias para se desenvolver, e essa resposta deve acontecer antes da infecção, atos de imunoterapia passiva podem ser usados para prevenir a infecção dos leitões. A transmissão de anticorpos através do colostro da porca pode prevenir as infecções por ETEC, em neonatos. (RUTTER; JONES, 1973; MOON; BUNN, 1993).

3.10 Vacinas

A imunização é a medida mais eficiente e menos dispendiosa para evitar doenças infecciosas. Diversas estratégias têm sido utilizadas para o desenvolvimento de diferentes tipos de vacinas. As vacinas de primeira geração foram produzidas com microrganismos atenuados, como a vacina BCG contra a tuberculose e inativados como a vacina contra a *Bordetella pertussis* (BLOOM, 1989).

Na última década, o grande avanço da biologia molecular permitiu a introdução de novas estratégias para a obtenção e a produção de antígenos e foram otimizadas novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Entre estas estão as de subunidades, consideradas de

segunda geração, constituídas de antígenos purificados e provenientes de fontes naturais ou sintéticas, e antígenos recombinantes. Huang et al., (2003) produziram a subunidade fimbrial FaeG da fimbria F4 expresso em tabaco, sugerindo uma possibilidade de produção de vacinas para o controle da diarreia em leitões.

As vacinas gênicas ou de terceira geração surgiram com a introdução de genes ou fragmentos de genes, que codificam antígenos potencialmente imunogênicos, em vetores virais ou em DNA plasmidial (RODRIGUES JR et al., 2004). Turnes et al., (1999) através da inoculação em camundongos e porcas do plasmídeo contendo o gene da subunidade faeG da fimbria de *Escherichia coli* F4, relataram a indução de uma resposta específica e duradoura, fazendo deste um vetor candidato para imunizações genéticas contra *E. coli* F4. Simionatto et al., (2005), desenvolveu uma vacina de subunidade com a purificação da proteína FaeC da fimbria e também clonou o mesmo gene em um vetor de expressão em célula eucariótica e obtiveram indução da resposta imune em camundongos nos dois sistemas, sugerindo esse antígeno como candidato potencial para imunizações contra ETEC K88.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Bactérias e Meios de Cultura

Escherichia coli E68 (O141; K88ab; H4) utilizada nesse experimento foi obtida do Instituto Copenhagen- Dinamarca, e gentilmente cedida pelo professor Dr. Carlos Gil Turnes (Laboratório de Bacteriologia, Cenbiot - UFPel). Os meios de cultura utilizados foram os caldos Infusão Cérebro e Coração, (BHI), e Lúria Bertani (LB), (Acumedia) e Minimum Essential Medium Eagle MEM, (SIGMA). Foi utilizada a Adrenalina ($C_9H_{13}NO_3$, E1635, HIPOLABOR) em uma concentração de 50 e 500 μM , filtrada com filtro de 0,22 μm (MILLIPORE) e estocada a $-4^\circ C$ até posterior uso.

4.2 Preparo do Meio Condicionado

ETEC foi semeada em ágar sangue por 24 h a $37^\circ C$, posteriormente colônias isoladas foram semeadas em balões com 10% de seu volume de meio e incubada em agitador orbital (CERTOMAT^R BS-T) a $37^\circ C$ por 7 h a 150 rpm. Após este período, o cultivo foi centrifugado a 10.000 g por 20 min e o sobrenadante filtrado (filtro de 0,22 μm). O sobrenadante filtrado foi utilizado para condicionar os meios. Meio condicionado (mc) refere-se à utilização de sobrenadante filtrado com ou sem adrenalina adicionada aos meios de cultura.

4.3 Crescimento Bacteriano

Para avaliar a influencia dos meios condicionados no crescimento, ETEC foi cultivada em meio LB para obtenção do pré-inóculo que foi ajustado para DO_{600} 1,0 sendo utilizados 500 μL nos seguintes tratamentos: Controle (meio LB) e *Quorum Sensing* (QS, 50%-500 - mc a 50% e 500 μM de adrenalina); foram cultivados em balões com volume de 1.000 mL com 100 mL de meio e incubados em agitador orbital a $37^\circ C$ por 18 h a 150 rpm.

4.4 Expressão de fímbrias

A expressão de fímbrias por ETEC utilizando meios condicionados foi avaliada por hemaglutinação, Dot Blot, ELISA e RT-PCR.

Os seguintes tratamentos em meio Lúria Bertani (LB) foram realizados para verificação da expressão de fímbrias. LB (controle); adrenalina 50 μM ; adrenalina

500 μ M; 10% de mc (meio condicionado); 50% de mc; 10% de mc e 50 μ M de adrenalina; 10% de mc e 500 μ M de adrenalina; 50% mc e 50 μ M de adrenalina; 50% mc e 500 μ M de adrenalina.

4.5 Motilidade

O ensaio de motilidade foi realizado segundo Sperandio et al., (2002), com adaptações. ETEC foi semeada em ágar sangue de ovino a 5% e incubada a 37 °C por 24 h. Após este período de incubação, colônias isoladas foram semeadas em BHI e incubadas a 37 °C por 24 h. A quantificação bacteriana foi avaliada por densidade ótica com espectrofotômetro Biospectro SP-22. Após o ajuste da densidade ótica do cultivo ($DO_{600} = 1,0$), 500 μ L foram semeados em 20 mL de caldo LB e este foi incubado em agitador orbital a 37 °C por 7 horas a 150 rpm, sendo utilizado como inóculo, semeando-se 1 μ L por placa, contendo 0,3% de ágar MEM. Os tratamentos foram realizados nas seguintes concentrações: MEM (controle); adrenalina 500 μ M; 10% de mc; 50% de mc; 10% de mc e 500 μ M de adrenalina; 50% de mc e 500 μ M de adrenalina. mc- (meio condicionado). As placas foram incubadas a 37 °C e os halos de motilidade foram medidos com paquímetro às 16 h de incubação.

4.6 Avaliação molecular- RT-PCR

Foi realizada extração de RNA total de amostras de ETEC cultivadas por 5 h, utilizando o procedimento com TRIZOL (INVITROGEN) com e sem a adição de meio condicionado. Os níveis de expressão gênica dos genes *faeG* (fimbria), *ltb* e 16S rDNA (controle) foram analisados por RT-PCR, realizado a partir da formação do cDNA (DNA complementar), segundo Radcliff et al., (2006), adaptado. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram extraídos de Chapman et al., (2006) e Sjöling et al., (2007) respectivamente, *faeG* anterógrado GGTGATTTCAATGGTTTCG; *faeG* retrógrado ATTGCTACGTTTCAGCGGAGCG; LT anterógrado ACGGCGTTACTATC CTCTC; LT retrógrado TGGTCTCGGTCAGATATGTG.

4.7 Preparo da bacterina

ETEC foi cultivada em agitador orbital a 37 °C por 18 h a 150 rpm em meio LB em 2 balões de 1.000 mL com volume de meio de cultura de 100 mL; o primeiro

com LB e o segundo com LB adicionado de 50% de meio condicionado com 500 μM de adrenalina. Posteriormente verificou-se a densidade óptica em espectrofotômetro (BIOSPECTRO SP-22) a 600 nm e titulação em placas com BHA, em seguida os cultivos foram inativados com formol a 0,1% a 37 °C, sendo testados durante 2 dias através da semeadura de uma amostra de cada cultivo em meio BHA, a fim de constatar a completa inativação. As bacterinas foram produzidas seguindo uma concentração de 2×10^9 UFC/ mL^{-1} adsorvidas em hidróxido de alumínio a 15% utilizado como adjuvante.

Trinta camundongos Swiss fêmeas com 5 semanas de idade foram alocados aleatoriamente em 3 grupos de 10 animais. Os animais foram mantidos em isoladores durante o período da experimentação, sob temperatura controlada, água e ração à vontade e vacinados nos dias 0 e 14 por via subcutânea com volume de 250 μL por animal. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética UFPel sob o processo nº: 23110.007699/2008-52.

No grupo 1 foi utilizada a bacterina produzida em meio condicionado, enquanto que no grupo 2 foi utilizada a bacterina controle. No grupo 3 foi aplicada uma solução salina 0,85% com hidróxido de alumínio $\text{Al}(\text{OH})_3$ a 15%.

Para testar se a bacterina apresentava uma maior quantidade de fimbrias, foi realizado ensaios de hemaglutinação, inibição da hemaglutinação, ELISA e Dot Blot, contrastando com soro anti-fimbria F4, produzido em coelho cedido pelo professor Carlos Gil Turnes.

4.8 Quantificação dos antígenos Vacinais

4.8.1 Hemaglutinação - HA

Para a verificação da indução de uma maior produção de antígeno fimbrial foi utilizada a técnica de hemaglutinação proposta por Hovelius e Mardh, (1979), adaptado. Os cultivos vacinais foram ajustados para densidade óptica - $\text{DO} = 1,0$. Foram utilizadas placas de 80 cavidades em fundo U, adicionou-se 500 μL de solução salina a 0,85% em cada cavidade, após adicionou-se 500 μL dos cultivos e a partir daí foram realizadas diluições logarítmicas base 2. Logo em seguida adicionou-se 500 μL de uma suspensão de hemácias de galinha a 0,5% em solução salina. Incubou-se por 2 h a 4 °C para posterior leitura dos resultados. A leitura foi

observada visualmente, sendo o resultado considerado positivo quando se forma uma rede homogênea de hemácias cobrindo toda a cavidade. O resultado negativo mostra-se com a homossedimentação, definida no centro da cavidade da placa. Para o controle negativo foi utilizado hemácias e solução salina e para o controle positivo utilizou-se uma amostra padrão de ETEC, mantidas a -18 °C.

4.8.2 Inibição da Hemoaglutinação - IHA

A inibição da hemaglutinação (IHA) foi realizada segundo Joo et al., (1976), modificado. A IHA foi realizada em microplaca em fundo U, de 96 poços.

Primeiramente, foram distribuídos nas cavidades, 50 µL, dos cultivos ajustados para DO=1,0 com mc e controle; em seguida 50 µL de soro anti-F4 (mencionado no item 4.7), foi diluído em 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 e 1:100 em volume de 50 µL. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 1 h, logo foi adicionado a cada cavidade 50 µL de uma solução de hemácias de galinha a 0,5%. Foram utilizadas cavidades para o controle de hemácias, contendo apenas suspensão de hemácias a 0,5%, e outra para controle da hemaglutinação (HA). As leituras foram realizadas uma vez verificadas hemossedimentação nos controles de hemácias, e de aglutinação nos de hemaglutinação.

4.8.3 ELISA

Os antígenos foram titulados por ELISA, utilizando-se placas (NUNCK) com 96 cavidades. Os cultivos utilizados como antígeno apresentaram 2×10^9 UFC mL⁻¹ de ETEC. Para análise do antígeno fimbrial as placas de ELISA foram sensibilizadas com 50 µL de suspensão de *E. coli* cultivadas com e sem mc (meio condicionado) diluído 1:50. Suspendendo-se os antígenos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6, o soro anti-fimbria foi diluído 1:50 em tampão fosfato pH 7,6 contendo Tween 20 a 0,5 % (PBS-T), e o conjugado 1:2000 em PBS-T. As placas foram sensibilizadas com os antígenos correspondentes por 1 h a 37 °C, após lavadas três vezes com PBS-T pH 7,6 e incubadas por 90 min a 37 °C com 50 µL de soro anti-fimbria diluídos 1:50 em PBS-T (em triplicata). Após foram novamente lavadas por três vezes com PBS-T, foi adicionado 50 µL de imunoglobulina anti-coelho conjugada com peroxidase (DAKOPATTS A/S,) diluída 1:2.000 em PBS-T e incubadas por 90 min a 37 °C. Após as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e em seguida

adicionado 50 μ L de substrato/cromógeno - Ortho-23 Phenylenediamine (OPD), deixando reagir por 15 min no escuro, a temperatura ambiente. As absorbâncias foram medidas em um leitor de microplacas (MR 700 MICROPLATE READER) à 450 nm.

4.8.4 Dot Blot

Esse ensaio foi utilizado para verificação de fimbria F4 e LT. Para a sensibilização das membranas de nitrocelulose (BIOAGENCY) foram utilizados 7 μ L dos cultivos ajustados para DO = 1,0. Após cada membrana foi colocada em solução bloqueadora (PBS com leite em pó a 5%) e mantida em agitação por 1 h. Em seguida procedeu-se a lavagem das membranas com PBS-T e adicionado o soro anti-fimbria em uma membrana e anti-CT (SIGMA) em outra membrana, ambos diluídos em PBS-T (1:2.000), mantidos mais 1 h em agitação. Após procedeu-se nova lavagem e adicionou-se o soro anti-espécie (anti-coelho conjugado com peroxidase- SIGMA), os quais foram incubados por 1 h em agitação. Em seguida as membranas foram reveladas com 1,8 mg de DAB, 30 μ L H₂O₂ em 30 mL de Tris HCl 50 Mm.

4.9 Titulação de Anticorpos

4.9.1 ELISA

A titulação foi efetuada por ELISA, sendo que as amostras de soro de camundongos foram obtidas nos dias 0 e 28 após a vacinação. Para realização desse ensaio procedeu-se da mesma maneira descrita no item 4.8.3, porém no ensaio para titulação de anticorpos foi utilizado o “pool” do soro dos camundongos e o soro individual sendo, utilizada imunoglobulina de coelho anti-camundongo conjugada com peroxidase (DAKOPATTS A/S). As absorbâncias de cada amostra foram divididas pela absorbância do soro da primeira coleta e os resultados expressos como soroconversão. Para a análise da soroconversão frente ao antígeno LT, as placas foram sensibilizadas com a porção B da proteína LT, (rLTB) gentilmente cedida pelo professor Dr. Fabrício Conceição do Centro de Biotecnologia (UFPEl) sendo utilizado soro anti-CT (SIGMA) diluída 1:2.000.

4.9.2 Inibição da hemoaglutinação - IHA

A inibição da hemaglutinação (IHA) foi realizada segundo Joo et al., (1976), adaptado. A IHA foi realizada em microplaca em fundo U, de 96 cavidades. Os soros foram testados nas seguintes diluições: 1:10, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90 e 1:100. A seguir foi distribuído em cada cavidade 50 µL de uma diferente diluição do soro e igual volume de suspensão de ETEC contendo uma unidade hemaglutinante (UHA). As microplacas foram incubadas a 37 °C por 1 hora, em seguida foi adicionado a cada cavidade 50 µL de uma solução de hemácias de galinha a 0,5%. Foi reservada uma fileira de cavidades para controle de hemácias, contendo apenas suspensão a 0,5%, e outra para controle da HA. As leituras foram realizadas uma vez verificadas hemossedimentação nos controles de hemácias, e de aglutinação nos de hemaglutinação.

4.10 Análise Estatística

A influência na curva de crescimento; a influência nos halos de motilidade; influência na leitura por espectrofotometria (450nm) na avaliação da presença de antígeno fimbrial; influência da leitura por espectrofotometria (450nm) na avaliação da presença de LT; influência da soroconversão individual do soro dos camundongos; influência da soroconversão do “pool” do soro dos camundongos e influência das soroconversão do pool do soro dos camundongos anti-LT, analisado pela técnica de ELISA foram avaliadas pela análise de variância (ANOVA) com distribuição F, seguidas de análise de contrastes para verificação da igualdade das médias dos tratamentos conforme CRAWLEY (2007).

Os dados referentes às diferentes diluições logarítmicas obtidas a partir da técnica de hemoaglutinação em função de diferentes tratamentos ao longo do tempo foram estimadas a partir de modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição quasibinomial para correção de sobredispersão dos dados, seguida de análise de contrastes para verificação da igualdade das probabilidades dos diferentes tratamentos conforme CRAWLEY (2007).

Todas as análises consideraram probabilidade de 0,5 e foram realizadas no programa estatístico R (R Development Core Team, 2009). R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation

for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL. <http://www.R-project.org>.

5.0 RESULTADOS

5.1 Curva de Crescimento

Para a análise do crescimento bacteriano, ETEC foi cultivada em balões com volume de 1.000 mL contendo 200 mL de meio LB utilizado como controle e (QS) meio condicionado a 50% adicionado de 500 μ M de adrenalina. As densidades óticas dos cultivos foram medidas ao longo de 18 h, onde podemos observar que durante as 6 h de cultivo o tratamento QS atingiu densidades óticas significativamente superiores quando comparado tratamento controle (Fig. 1; $p < 0,05$). A partir das 7 h ocorreu um equilíbrio entre os tratamentos.

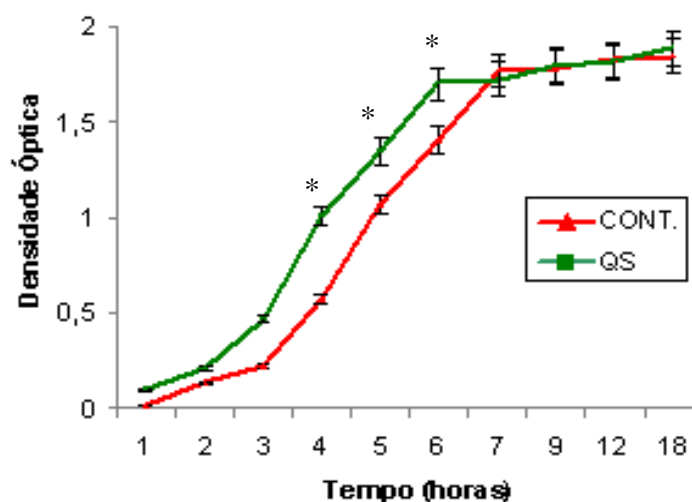


FIGURA 1. Curva de crescimento. Os dados representam as médias (+/- erro padrão da média) expressas em Densidade Óptica. CONT (controle) e QS (*Quorum Sensing* - meio condicionado a 50% e 500 μ M de adrenalina). Asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$).

5.2 Expressão de Antígeno Fimbrial

O ensaio de hemaglutinação foi realizado em placas de fundo U a partir de diluições logarítmicas base 2. O tratamento onde foi observada a menor capacidade hemoaglutinante foi o mc (meio condicionado) a 10%, que atingiu o título de 1:16, diferindo dos demais tratamentos, seguido dos tratamentos controle, meio com o dobro de LB, adrenalina 500 μ M, mc a 10% + 50 μ M de adrenalina, mc a 10% + 500 μ M de adrenalina, mc a 50%, mc a 50% + 50 μ M de adrenalina que atingiram o título de 1:32. A maior título hemoaglutinante foi observado no tratamento que utilizou mc a 50% + 500 μ M de adrenalina, atingindo 1:64, sendo significativamente superiores aos

demais tratamentos ($p < 0,001$). Na Fig. 2 (A) encontram-se os tratamentos mais relevantes.

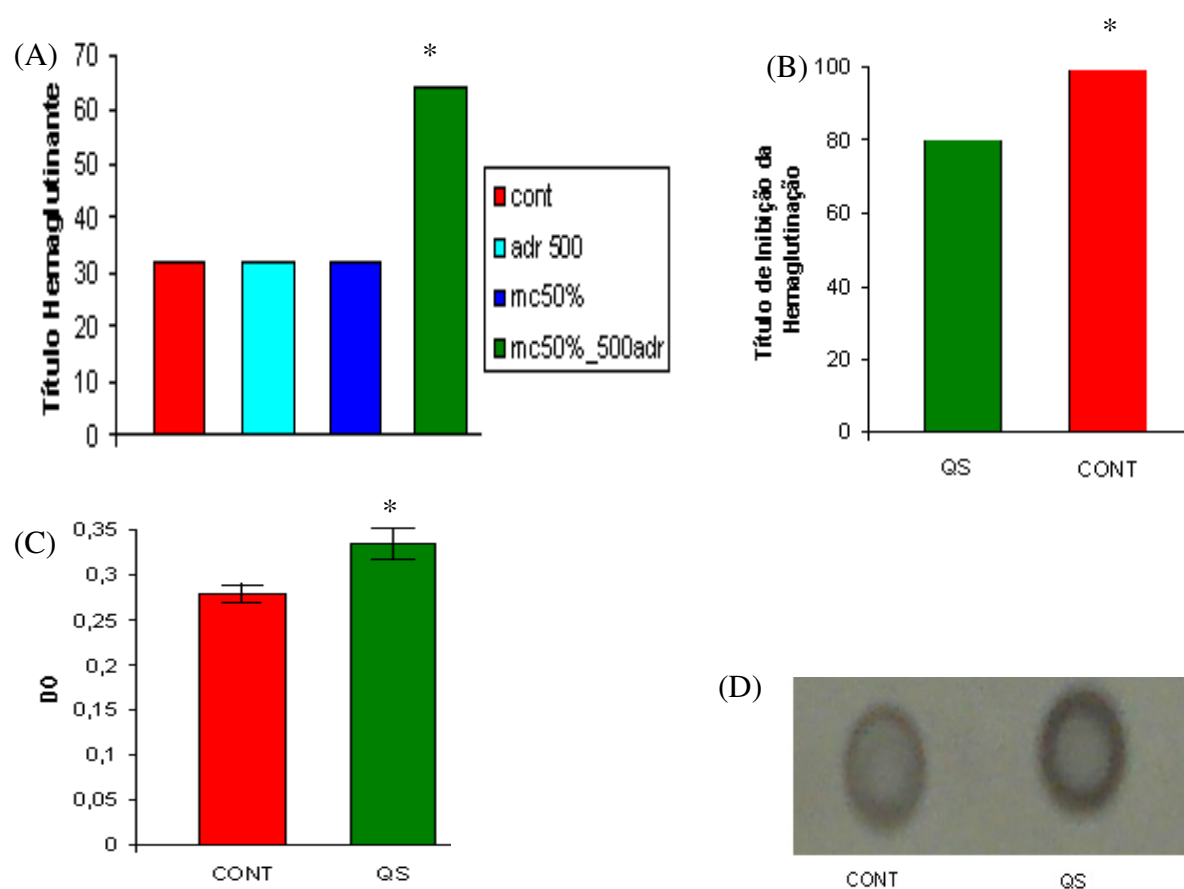


FIGURA 2. Expressão de antígeno fimbrial F4. (A) Hemaglutinação - dados representam as médias. cont - LB; adr 500 - adrenalina a 500 μ M; mc50% - mc a 50%; mc50%_500adr - mc a 50% e adrenalina a 500 μ M. (B) Inibição da hemaglutinação – dados representam os títulos de inibição da hemaglutinação. (C) ELISA - dados representam as médias ($\pm$ erro padrão da média) em densidade óptica. (D) Dot blot. Em B, C e D, CONT (controle) e QS (Quorum Sensing - meio condicionado a 50% adicionado de 500 μ M de adrenalina). Asterisco indica diferença significativa com relação ao controle ($p < 0,05$).

No ensaio de inibição da hemoaglutinação com soro anti-fimbria (Fig. 2 B) foi observado que o tratamento QS atingiu um título de 1:80, diferindo do tratamento controle que atingiu 1:100 ($p < 0,05$). Já no ELISA para detecção de antígeno fimbrial (Fig.2 C) no tratamento QS, foi observada uma maior absorbância quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$) e no ensaio de Dot Blot (Fig 2 D) foi observada uma maior intensidade na reação do tratamento QS, onde o cultivo de

ETEC foi cultivado na presença de meio condicionado, sugerindo uma maior expressão de antígeno fimbrial quando comparado com o tratamento controle.

5.3 Expressão da Toxina Termo-Lábil (LT)

O ensaio de ELISA (Fig. 3 A) foi realizado para estudar a expressão da toxina LT em um tratamento controle, seguido de um tratamento QS, onde também foi observada a maior expressão de fimbrias pelo ensaio de hemoaglutinação, inibição da hemaglutinação, ELISA e Dot Blot. Analisando as médias, no tratamento QS foi observada uma absorbância 34% maior, diferindo significativamente do tratamento controle ($p < 0,05$). No ensaio de Dot Blot (Fig. 3 B) foi observada uma maior intensidade no tratamento cultivado na presença de mc, sugerindo uma maior expressão de antígeno LT.

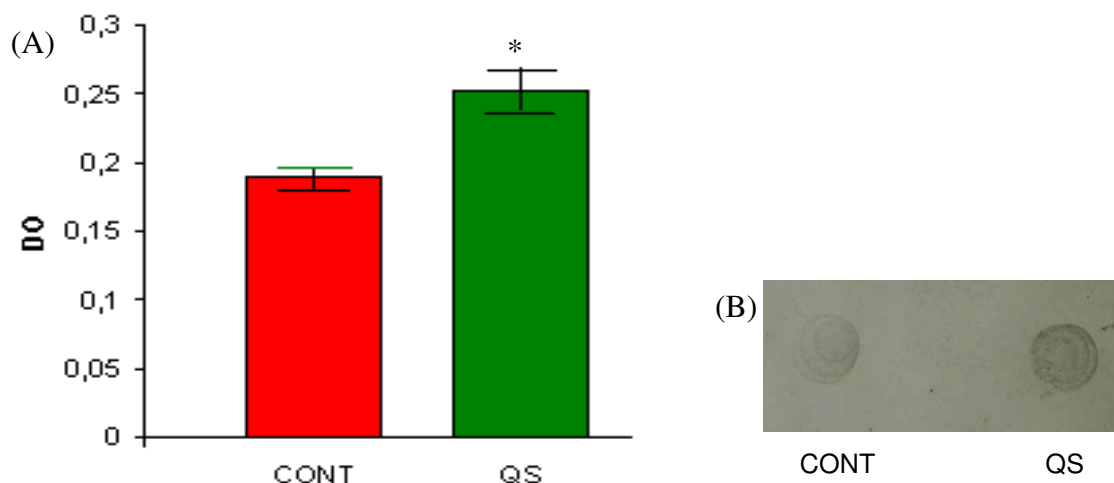


FIGURA 3. Expressão da Toxina Termo-Lábil (LT). (A) ELISA - dados representam as médias (+/- erro padrão da média). (B) Dot blot utilizando soro anti-ct. CONT (controle) e QS (Quorum Sensing - meio condicionado a 50% adicionado de 500 μ M de adrenalina). Asterisco indica diferença significativa com relação ao controle ($p < 0,05$).

5.4 Motilidade

O ensaio de motilidade foi realizado em placas de ágar MEM, sendo os halos medidos às 16 h de cultivo com auxílio de um paquímetro (Fig. 4). Foi observado um aumento significativo da motilidade em todos os tratamentos em relação ao controle, com exceção do tratamento que utilizou apenas adrenalina a 500 μ M ($p < 0,05$). Os

resultados encontrados nos tratamentos com 10% de meio condicionado e 50% de meio condicionado foram similares, não diferindo entre si. Os maiores halos de motilidade foram encontrados em 50% de mc adicionado de 500 μ M de adrenalina, diferindo significativamente dos demais tratamentos.

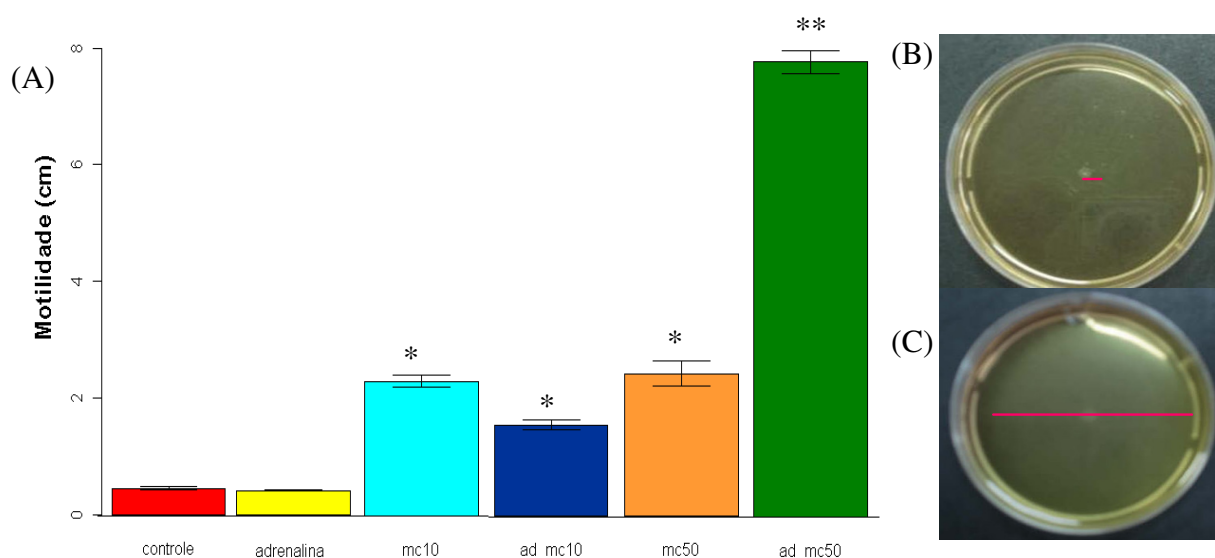


FIGURA 4. Motilidade. (A) Os dados representam as médias (+/- erro padrão da média) dos halos de motilidade (cm). Controle MEM; adrenalina 500 μ M; ad-mc10- adrenalina 500 μ M + 10% de meio condicionado; mc10- meio condicionado a 10%; mc50- meio condicionado 50%; ad-mc50- adrenalina 500 μ M + 50% de meio condicionado. (B) Controle; (C) ad-mc50- adrenalina 500 μ M + 50% de meio condicionado. Asterisco * indica diferença significativa em relação ao controle; ** indica diferença significativa em relação a todos os tratamentos ($p < 0,05$).

5.5 Expressão dos genes codificantes do 16S rRNA, fimbria F4 e LT por RT-PCR

Nesse ensaio observamos que ocorreu uma maior expressão do gene que codifica para Toxina Termo Lábil no cultivo QS (linha 7), quando comparado ao tratamento controle (linha 6). O mesmo não pode ser observado em relação ao gene codificante para a fimbria (*faeG*) (linhas 4 e 5) e para o 16S rRNA (linhas 2 e 3) utilizado como controle, onde o padrão de bandas se deu na mesma intensidade (Fig. 5).

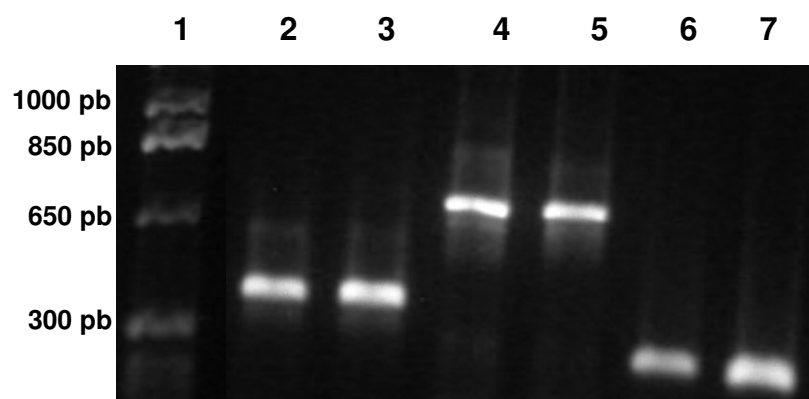


FIGURA 5. RT- PCR dos genes codificantes para 16S rRNA (393 pb), fimbria (*faeG*) (764 pb) e Toxina Termo-Lábil (273 pb). Linha 1- marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen); Linha 2- 16S rRNA, controle; linha 3- 16S rRNA, QS; Linha 4- *faeG*, controle; Linha 5- *faeG*, QS; Linha 6- Toxina Termo Lábil, controle; Linha 7- Toxina Termo Lábil, QS. (QS= meio condicionado a 50% + 500 μ M de adrenalina).

5.6 Avaliação da resposta imune

A análise da resposta imune individual expressa em média de soroconversão (Fig. 6 A) demonstra que os animais que receberam a bacterina QS atingiram títulos de anticorpos significativamente superiores ao grupo de animais que recebeu a bacterina sem a adição de mc e esse foi significativamente superior ao grupo que recebeu apenas adjuvante ($p < 0,001$). O mesmo ocorreu quando foi analisado o “pool” dos soros dos camundongos (figura 6 B). Também foi analisada a resposta imune contra LT (Fig. 6 C) onde o grupo de animais que recebeu a bacterina QS apresentou títulos de anticorpos significativamente superiores ao grupo de animais que recebeu a bacterina controle.

Em relação ao ensaio de inibição da hemoaglutinação (Fig. 6 D) utilizando o “pool” dos soros dos camundongos, a inibição se deu em um título de 1:60, no grupo vacinado com a bacterina QS, diferindo significativamente do grupo controle, onde a inibição se deu no título de 1:50.

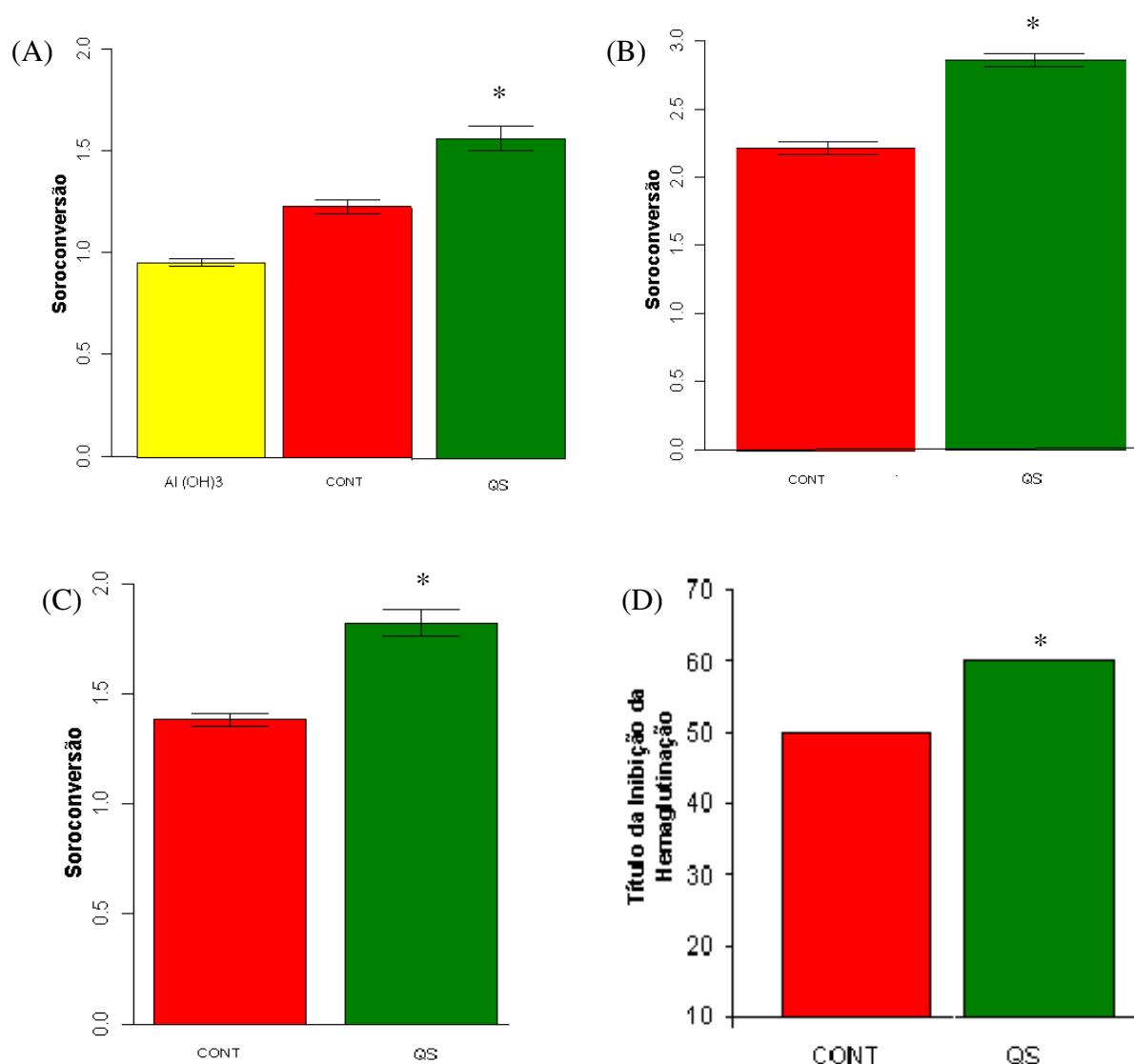


FIGURA 6. Avaliação da resposta imune. (A) ELISA; dados representam à média (+/- erro padrão da média) da soroconversão individual do soro dos camundongos. (B) ELISA; dados representam a média (+/- erro padrão da média) da soroconversão do “pool” dos soros dos camundongos. (C) ELISA; dados representam a média (+/- erro padrão da média) da soroconversão frente à LT do “pool” dos soros dos camundongos. (D) Inibição da hemoaglutinação; dados representam a média do título de inibição da hemaglutinação. CONT (controle) e QS (Quorum Sensing - meio condicionado a 50% adicionado de 500 μ M de adrenalina). Asterisco indica diferença significativa com relação aos grupos ($p < 0,05$).

6.0 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstra pela primeira vez a utilização do sistema de sinalização *Quorum Sensing* para induzir a expressão de antígenos vacinais em ETEC. O trato gastrointestinal dos mamíferos é um local heterogêneo altamente complexo, onde a maioria da microbiota reside no intestino grosso (GUARNER; MALAGELADA, 2003). A microbiota é benéfica para o hospedeiro por facilitar a assimilação de nutrientes e competência imunológica (HOOPER; GORDON, 2001). Por outro lado, as interações negativas entre patógenos podem levar à doença. A alta densidade e diversidade de bactérias dentro do trato gastrointestinal sugerem que os membros desta comunidade se comunicam entre si, para coordenar algum processo vantajoso. Pouco é conhecido atualmente acerca da relação comunicativa entre a microbiota normal, patógenos bacterianos e do hospedeiro. Segundo Sperandio et al., (2003) as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) produzidas pelo sistema simpático, utilizam a via de sinalização do AI-3, atuando como molécula sinalizadora para as bactérias, alterando o padrão de expressão gênica.

A expressão de fatores de virulência, quando há uma maior densidade populacional, associado a períodos de estresse onde ocorre a liberação de adrenalina pelo sistema simpático, pode contribuir significativamente para que a bactéria se estabeleça no hospedeiro. Segundo Donabedian, (2003) nos patógenos, por exemplo, uma expressão gênica de fatores de virulência reduzida é mantida quando a densidade populacional encontra-se baixa, evitando que o organismo do hospedeiro inicie uma resposta imune. Quando um número suficiente de bactérias é alcançado, há a expressão dos genes de virulência e, assim, as bactérias são capazes de vencer as defesas do hospedeiro.

As diarreias constituem um fator limitante da produção suína, e afetam animais em todas as fases de crescimento, provocando atraso no desenvolvimento ou até a morte dos animais (MOOI; GRAAF 1985). A vacinação das porcas prenhas tem sido uma estratégia para conferir uma resposta imune passiva aos leitões via amamentação, porém, podem ocorrer falhas no processo de produção das bacterinas que deixam de expressar importantes antígenos protetores. Através da indução da expressão gênica pelo método de *Quorum Sensing* visou-se induzir a expressão gênica de antígenos vacinais, como a fimbria, a toxina LT e o flagelo.

Em nosso estudo, constatamos que a presença de meio condicionado (mc) atua no processo de multiplicação de ETEC, onde podemos observar que o cultivo com 50% de meio condicionado adicionado de adrenalina a 500 μ M atingiu absorbâncias significativamente superiores ao tratamento controle nas primeiras horas de cultivo (Fig 1). Como o mc ativou a multiplicação no período inicial essa foi superior quando comparada com o controle que apresentou um crescimento mais lento. Porém a partir das 7 h os grupos apresentaram crescimentos semelhantes. Este fenômeno sugere que a sinalização ocorreu acelerando a multiplicação bacteriana, até o ponto de atingir uma densidade populacional que saturou o meio. Apartir das 7 h de cultivo não foi observado essa diferença entre o tratamento QS e o controle. Este fato é importante, pois o tempo de cultivo para produção de bacterinas pode ser encurtado, desta forma reduzindo custos operacionais e aumentando a expressão de antígenos vacinais importantes.

Em nosso estudo também observamos que a adição de mc potencializa a expressão fimbrial, sendo assim, ETEC, quando cultivada na presença de adrenalina e meio condicionado nas concentrações utilizadas, foi capaz de induzir a expressão fimbrial (Fig. 2), antígeno esse com grande importância na proteção contra infecções causadas por ETEC (NAGY et al., 1978; TURNÊS et al., 1999).

Nos ensaios de hemaglutinação, observamos um título hemaglutinante duas vezes superior no tratamento QS. Por ELISA esse aumento foi de 19% quando comparado com o tratamento controle. Na inibição da hemaglutinação e Dot blot também foi detectada uma maior expressão fimbrial quando comparado com o tratamento controle (Fig. 2). A aderência é um fenômeno específico entre o microrganismo e a célula e ocorre entre adesinas fimbriais com os receptores correspondentes na superfície celular (SHARON; LIS, 1993). A hemoaglutinação é uma técnica utilizada para detecção de fimbrias (DE GRAFF; MOOI, 1986). Portanto quanto maior o título hemaglutinante, maior será o número de fimbrias por bactéria. Desde a década de 70, quando foi comprovada a participação das fímbrias como fatores primários de patogenicidade, estas estruturas têm sido utilizadas como imunógeno para induzir à síntese de anticorpos que bloqueiam a aderência bacteriana. Vacinas contendo fimbrias purificadas associada com *E. coli* inativadas por formol ou ainda cepas engenheradas que expressam fimbrias têm sido utilizadas para vacinar as porcas gestantes ocorrendo transferência passiva de anticorpos via

colostro para proteger os leitões contra infecções por ETEC (FURER et al., 1982; BARMAN; SARMA, 1999). Inicialmente as vacinas eram produzidas com culturas de ETEC inteiras (bacterinas), mas foi demonstrado que a adição de fimbria purificada em tais vacinas aumentaram a proteção dos leitões (NAGY et al., 1978). Portanto, uma bacterina contendo uma maior quantidade de antígeno fimbrial confere uma maior produção de anticorpos protetores.

Quando analisado por RT-PCR não pôde ser observada uma maior expressão fimbrial. Entretanto, houve uma limitação em nosso estudo quanto a este fato. As amostras de RNA total coletadas para a análise foram realizadas em um só ponto de durante o cultivo (5 h), período que provavelmente perdemos a fase de maior expressão do gene *faeG* (Fig 5). Este fato é significativo, pois observando a curva de crescimento neste ponto de cultivo havia uma diferença significativa em relação ao controle. A maior expressão pode ter ocorrido anterior às 5 h de cultivo, e como a duração do mRNA é curta, não coletamos o RNA a tempo para detectar uma possível diferença.

Nosso estudo também encontrou diferenças significativas quanto à expressão da LT, nos ensaios de ELISA, Dot Blot, e RT-PCR. Segundo Riising e colaboradores (2005) a presença de LT na composição de uma vacina atua de forma eficiente, induzindo a formação de anticorpos específicos e protetores. Vários estudos indicam que expressão de LT é encontrada com grande freqüência nas cepas isoladas de surtos de diarreia em suínos (HAREL et. al., 1991; BERBEROV et. al., 2004; ZHANG et al., 2006; ZHANG et al., 2007) e como antígeno vacinal está confirmada sua importância (RIISING; MURMANS; WITVLIET, 2005). Desta forma, um aumento na sua expressão no fabrico de uma bacterina é importante na obtenção de um bom imunógeno. Também podemos sugerir que um aumento de LT em uma bacterina pode ter uma função de adjuvante, já que sua associação com diferentes antígenos possui esse efeito (CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006). Segundo Johnson et al., (2009), a LT também atua no processo de aderência de ETEC as células intestinais de suínos, portanto, a geração de anticorpos contra essa toxina dificultaria a aderência bacteriana no trato gastrointerstinal. Devido ao alto índice de cepas de ETEC que expressam LT como fator de patogenicidade, esse antígeno é um excelente candidato a ser utilizado como imunógeno.

Flagelina é a principal proteína constituinte do flagelo, que são apêndices superficiais que estão envolvidos na locomoção bacteriana. Em nosso estudo foi observado que a maior motilidade ocorreu no tratamento que utilizou a adrenalina associada com 50% de meio condicionado, sugerido que ETEC utiliza moléculas do hospedeiro e moléculas próprias, para ativar a motilidade. Porém em nosso estudo não foi possível a análise por RT-PCR para verificar a expressão da flagelina, pois os oligonucleotídeos iniciadores utilizados não reconheciam a sequência gênica desta proteína. Tampouco podemos afirmar que houve um aumento na expressão de flagelo, ou se ocorreu somente um aumento de motilidade, ou ambos, como já relatado na literatura (SPERANDIO et al., 2002). Entretanto, Bearson e Bearson (2008) utilizando a noradrenalina associada com sobrenadante produzido em meio DMEM, também encontraram aumento da motilidade de *Salmonella* Typhimurium. Sperandio e colaboradores (2002) em estudo com *E. coli* Enterohemorrágica e *E. coli* K12, observaram que a regulação da expressão do flagelo é regulado pelo mecanismo de *Quorum Sensing*, concordando com nossos resultados. Os receptores Toll-like 5 (TLR5) reconhecem a flagelina, principal componente estrutural do flagelo bacteriano (GOLDSBY et al., 2003). A sinalização do TLR atua no recrutamento e ativação de agentes cruciais na apresentação de antígeno às células T, tais como, células dendríticas, macrófagos e células “natural killer”. A flagelina pode induzir uma maior inflamação e a presença de anticorpos impediria essa ativação, sendo uma estratégia importante no controle da enfermidade. Segundo Bambou et al., (2004), a flagelina de *E. coli* estimula os enterócitos a secretar a citocina IL-8 que é um potente quimiotático e ativador de neutrófilos. Estudos também indicam o potencial da flagelina como adjuvante. Braga et al., (2008) demonstraram que as flagelinas de *Salmonella* são dotadas de efeitos adjuvantes tipo-específico frente a células T CD8 “*in vivo*”, uma característica que pode gerar impactos no uso dessas proteínas como adjuvantes em vacinas profiláticas ou terapêuticas. Mcsorley et al (2002) relataram um efeito adjuvante para flagelina que tem implicações importantes para o desenvolvimento de vacinas e na geração de respostas de células T CD4 de bactérias entéricas. Assim, sugere-se que uma bactéria expressando uma maior quantidade de flagelina será mais eficiente quanto ao recrutamento de células e a montagem da resposta imune. Em relação à resposta imune conferida aos camundongos analisada pela técnica de ELISA e inibição da hemaglutinação, a bactéria produzida utilizando mc, que apresenta uma

maior quantidade de antígenos protetores, induziu um título de anticorpos significativamente superior ao grupo vacinado com a bacterina convencional.

A utilização de QS na produção de bacterinas permite a indução da expressão de antígenos que não são ou que são fracamente expressos *“in vitro”* e com esse sistema haveria semelhança com o que ocorre *“in vivo”*, sendo assim, induzindo uma maior expressão de antígenos protetores. Portanto, a utilização de bacterinas que possuem uma maior quantidade de importantes antígenos vacinais proporciona uma resposta imune mais eficiente, pois são gerados um número maior de anticorpos contra diferentes epítomos, sugerindo uma ampliando a proteção contra a enfermidade.

7.0 CONCLUSÃO

A adição de meio condicionado aos meios de cultivo bacteriano é capaz de aumentar a expressão de importantes antígenos vacinais em *E. coli* Enterotoxigênica.

A adição de meio condicionado estimula a multiplicação bacteriana, a expressão da Fimbria, da Toxina Termo-Lábil e ativa a motilidade em *E. coli* Enterotoxigênica.

Os animais vacinados com a bacterina produzida com a adição de meio condicionado (*Quorum Sensing*) produziram títulos de anticorpos significativamente superiores aos animais vacinados com a bacterina produzida convencionalmente.

Nossos dados sugerem que o sistema *Quorum Sensing* pode ser um promissor processo na obtenção de bacterinas expressando uma maior quantidade de importantes antígenos vacinais contra enfermidades causadas por *E. coli* Enterotoxigênica.

8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Essential Cell Biology: Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. 1998.

AMEZCUA, R.; FRIENDSHIP, M.; DEWEY, E. An investigation of the presence of *Escherichia coli* O149:K91:F4 on pig farms in southern Ontario and the use of antimicrobials and risk factors associated with the presence of this serogroup. **The Canadian Veterinary Journal**. La Revue Vétérinaire Canadienne, v. 49(1), p. 39-45, 2008.

ÁVILA, F. A.; ÁVILA, S.H.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MARQUES, M. A. Evidence of pili k88 and K99 as protecting antigens: immunization against enteric swine colibacillosis by sow vaccination. **Revue Elev Méd Vet Pays Trop**, Paris, v. 39, p. 293-296, 1986.

BAKKER, D.; WILLEMSSEN, PT; WILLEMS, R.H; HUISMAN, T.T; MOOI, F.R OUDEGA, B; STEGEHUIS F ; DE GRAAF, F K. Identification of minor fimbrial subunits involved in biosynthesis of K88 fimbriae. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 6350-6358, 1992.

BAMBOU, A.; GIRAUD, S.; MENARD, B.; BEGUE, S.; RAKOTOBÉ, M.; HEYMAN.; TADDEI, F.; BENSUSSAN N.; GABORIAU-ROUTHIAU, V. In vitro and ex vivo activation of the TLR5 signaling pathway in intestinal epithelial cells by a commensal *Escherichia coli* strain. **Journal of Biology**, v. 279, p. 42984-42992, 2004.

BARMAN, N. N.; SARMA. D. K. Passive immunization of piglets against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with K88ac pili bearing bacterins. Indian. **Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 1132-1135, 1999.

BASSLER, B. L.; WRIGHT, M.; SHOWALTER, R. E.; SILVERMAN, M. R. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 773-786, 1993.

BERBEROV, E. M.; ZHOU, Y.; FRANCIS, D. H.; SCOTT, M. A.; KACHMAN, S. D.; MOXLEY, R. A. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of

severer diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *E. coli* that produces multiple enterotoxins. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3914–3924, 2004.

BERBEROV, E. M.; ZHOU, Y.; FRANCIS, D. H.; SCOTT, M. A.; KACHMAN, S. D.; MOXLEY, R. A. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severer diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *E. coli* that produces multiple enterotoxins. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 3914–3924, 2004.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L. STRYER, L. **Biochemistry**, W. H. Freeman and Co. New York, 2002.

BERTOL T. M.; BRITO B. G. Efeito de altos níveis de zinco suplementar no desempenho e na mortalidade de leitões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33: p. 451-459, 1998.

BERTSCHINGER H. U.; FAIRBROTHER J. M. *E. coli* INFECTIONS. IN: DISEASES OF SWINE. STRAW BE, D'ALLAIRE S, MENGELING W. L; TAYLOR D. J . **Iowa State University Press**, Ames, Iowa, USA, v. 32, p. 431-468, 1999.

BLOOM, B. R. New approaches to vaccine development. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.11, p. 460-466, 1989.

BONATO, M. C. M. Moldes, Módulos e Forma: do DNA às Proteínas. <http://www.biologianaweb.com/Livro2/Moldes.htm>, acesso em 30 set. 2008.

BOUCKENOOGHE, A.R.; JIANG, Z. D.; DE LA CABADA, F. J.; ERICSSON, C. D.; DUPONT, H.L. Enterotoxigenic *Escherichia coli* as cause of diarrhea among Mexican adults and US travelers in Mexico. **Journal of Travel Medicine**, v. 9, p. 137-140, 2002.

BEARSON; B. L.; BEARSON, S. D. The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbial Pathogenesis**, v. 44, p. 271-278, 2008.

BRAGA, C.; MASSIS, L.; ALENCAR, B.; RODRIGUES, M.; SBROGIO-ALMEIDA, M.; FERREIRA, L. Cytotoxic T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 44-49, 2008.

CÂMARA, M.; DAYKIN, M.; CHHABRA, S. R. Detection, purification, and synthesis of N-acyl-homoserine lactone quorum sensing signal molecules. **Methods Microbiology**, v. 27, p. 319-330, 1998.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 3 ed. cap. 28. p. 215-228, 1999.

CAVALIERI, S. J.; BOHACH, G. A.; SNYDER, I. S. *Escherichia coli* _hemolisin: characteristics and probable role in pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v.48, p. 326-343, 1985.

CHAE C.; CHEON D. S.; MIN K.; KNO, D.; LEE Y. S. Edema disease: seasonal prevalence and O serogroup. In: **Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society**. (Birmingham, England), p.103, 1998.

CHAPMAN, T.; WU, X, BARCHIA I.; KARL, A.; BETTELHEIM, DRIESEN, S; DARREN, T; WILSON, M.; CHIN, J. Comparison of Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy and Diarrheic Swine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4782-4795, 2006.

CLARKE, M. B.; SPERANDIO, V. Transcriptional autoregulation by quorum sensing *E. coli* regulators B and C (QseBC) in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). **Molecular Microbiology**, v. 58, p. 441-455, 2005.

CONCEIÇÃO, F. R; MOREIRA, A. N.; DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, v. 24, p. 5734-5743, 2006.

CRAWLEY, M. J. The R book. **John Wiley & Sons Ltd**, p. 942, 2007.

DALTON, C. B., MINTZ, E. D., WELLS, J. G., BOPP, C. A., TAUXE, R. V. Outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in American adults: a clinical and epidemiologic profile. **Epidemiology Infection**, v. 123, p. 9-16, 1999.

DAVIES, D.G.; PARSEK, M.R.; PEARSON, J.P.; IGLEWSKI, B.H.; COSTERTON, J.W.; GREENBERG, E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm **Science**, v. 280, p. 295-298, 1998.

DE GRAFF, F. K.; MOOI, F. R. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. **Advances In Microbial Physiology**, v.28, p.65-143, 1986

DEFOIRDT, T.; VERSTRAETE W.; BOSSIER, P. Luminescence, virulence and quorum sensing signal production by pathogenic *Vibrio campbellii* and *Vibrio harveyi* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104(5). p. 1480-1487, 2008.

DO, T.; STEPHENS, C.; TOWNSEND, K.; WU, K., CHAPMEN, T.; CHIN, J.; BARA, M.; TROT, D. J. Radip identification of virulence genes in enterotoxigenic *E. coli* isolated with diarrhoea in Queensland piggeries. **Australian Veterinary Journal**, v. 83, p. 293-299, 2005.

DONABEDIAN, H. Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. **Journal of Infection**, v. 46, p. 207-214, 2003.

DOYLE, M. P.; CLIVER, D. O. *Escherichia coli*. In: CLIVER, D.O. **Foodborne diseases**. San Diego, California: Academic Press, cap. 13, p. 209-216, 1990.

DYKES, C. W.; HALLIDAY, I. S.; READ, M. J.; HOB DEN, A. D.; HARFORD, S. Nucleotide sequence of four variants of the K88 gene of porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 50(1) p. 279-283, 1985.

ENGEBRECHT, J.; NEALSON, K.; SILVERMAN M. Bacterial bioluminescence: isolation and genetic analysis of functions from *Vibrio fischeri*. **Cell**, v. 32(3) p. 773-781, 1983.

ENGEBRECHT, J.; SILVERMAN, M. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81(13) p. 4154-4158, 1994.

FAIRBROTHER, J. M.; NADEAU, E.; GYLES, C. L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research**, v. 6, p. 17-39, 2005.

FRANCIS D. H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **Journal of Swine Health Production**, v. 10, p. 171-175, 2002.

FREEMAN, J. A.; LILLEY, B. N.; BASSLER, B. L. A genetic analysis of the functions of LuxN: a two-component hybrid sensor kinase that regulates quorum sensing in *Vibrio harveyi*. **Molecular Microbiology**, v. 35, p.139-149, 2000.

FRYDENDAHL, K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *E. coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. **Veterinary Microbiology**, v. 85, p. 169-182, 2002.

FUJII, Y., KONDO, Y.; OKAMOTO, K. Involvement of prostaglandin E2 synthesis in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **FEMS Microbiology Letters**, v. 130, p. 259-65, 1995.

FUQUA C.; EBERHARD, A. Signal generation in autoinduction systems: synthesis of acylated homoserine lactones by LuxI-type proteins. In: **Cell-Cell Signaling in Bacteria**, ed. GM Dunny, SCWinans, p. 211-30, 1999

FURER, E. J., CRYZ, S. J. DORNER, J. R. F.; NICOLET, J.; WANNER, M.; GERMANIER, R.. Protection against colibacillosis in neonatal piglets by immunization of dams with procholeraegenoid. **Infection and Immunity**, v. 35(3), p. 887-894, 1982.

GAASTRA W.; GRAAF, F. K. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiological Reviews**, v. 46(2), p. 129-161, 1982.

GRAM, L.; RAVN, L.; RASCH, M.; BRUHN, J. B.; CHRISTENSEN, A. B.; GIVSKOV, M. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, p.79-97, 2002.

GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in bacteria. **Journal of Microbiology**, v.38, p. 117-121, 2000.

GOLDSBY, R. A.; THOMAS, J. K.; OSBORNE, B. A.; KUBY, J. **Immunology**, fifth edition; W. H. Freeman and Company, New York, 2003.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 360, p. 512-518, 2003.

GYLES, C. L. *Escherichia coli* enterotoxins. In Gyles CL (ed) *Escherichia coli* in domestic animals and humans. **CAB International, Wallingford, UK**, p. 337-364, 1994.

HAREL, H.; LAPOINTE, A.; FALLARA, L. A.; LORTIE, M.; BIGRAS-POULIN, S.; LARIVIERE.; FAIRBROTHER, J. M. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. **Journal Clinical Microbiology**, v. 29(4), p. 745-752, 1991.

HE, X; CHANG, W.; PIERCE, DL., SEIB, L.; WAGNER, J; FUQUA C. Quorum sensing in *Rhizobium sp.* Strain NGR234 regulates conjugal transfer (tra) gene expression and influences growth rate. **Journal of Bacteriology**, v. 185(3) p. 809-822, 2003.

HITOTSUBASHI, S.; FUJII, Y., YAMANAKA, H.; OKAMOTO, K. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 4468-74, 1992.

HOLMES, R. K.; TWIDDY, E. M.; PICKETT, C. L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 53. p. 464-473, 1986.

HOLT, J. G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Facultatively anaerobic Gram negative. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9. ed. Baltimore: Williams e Wilkins. p. 787, 1994.

HONKO, A. N.; SRIRANGANATHAN, N.; LEES, C. J.; MIZEL, S. B. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. **Infection and Immunity**, v. 74(2), p. 1113-20, 2006.

HOOPER, L. V.; WONG, M. H.; THELIN, A; HANSSON, L.; FALK, P.G.; GORDON JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v. 291, p. 881-884, 2001.

HOVELIUS, B; MARDH, P. A. Haemagglutination by *S. saprophyticus* and other Staphylococcal species. **Acta pathologica Microbiologica Immunologica**, v. 87, p. 45-50, 1979.

HUANG, Y.; LIANG, W.; PAN, A.; ZHOU, Z; HUANG, C.; CHEN, J.; ZHANG D. Production of FaeG, the Major Subunit of K88 Fimbriae, in Transgenic Tobacco Plants and Its Immunogenicity in Mice. **Infection and Immunity**, v. 91, p. 5436-5439, 2003.

HUNG, D. L.; HULTGREN, S. J. Pilus biogenesis via the chaperone/ usher pathway: an integration of structure and function. **Journal of Structural Biology**, v. 124, p. 201-220, 1998.

JOHNSON, A. M.; KAUSHIK, R. S.; FRANCIS, D. H.; FLECKENSTEIN, J. M.; HARDWIDGE, P. R. Heat-Labile Enterotoxin Promotes *Escherichia coli* Adherence to Intestinal Epithelial Cells. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 178-186, 2009.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*". **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.139, p. 155-162, 2002.

JOO, H. S.; DONALDSON-WOOD, C. R.; JOHNSON, R. H. A standardized hemmagglutination inhibition test for porcine parvovirus antibodies. **Australian Veterinary**, v. 52, p. 422-424, 1976.

KHAC, H.; HOLODA, E.; PILIPCINEC, E.; BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; MORA, A.; DAHBI, G.; LÓPEZ, C.; GONZÁLEZ, E. A.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. **Veterinary Journal**, v. 174, p. 176-187, 2006.

KOOYK, Y, GEIJTENBEEK T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 697-709, 2003.

KOHLER, E. M. Protection of pigs against neonatal enteric colibacillosis with colostrum and milk from orally infected sows. **Journal of the American Veterinary**, v. 35, p. 331-338, 1974.

KÖNIG, B.; KÖNIG, W.; SCHEFFER, J.; HACKER, J.; GOEBEL, W. Role of *Escherichia coli* alpha-hemolysin and bacterial adherence in infection: requirement for release of inflammatory mediators from granulocytes and mast cells. **Infection and Immunity**, v. 54, p. 886-892, 1986.

LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I.; STURGIS, J. N. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. Nature reviews. **Microbiology**, v.2, p. 581-592, 2004.

LEE, S. E.; KIM, S.Y.; JEONG, B. C.; KIM, Y. R.; BAE, S. J.; AHN, O. S.; LEE, J. J.; SONG, H. C.; KIM, J. M.; CHOY, H. E.; CHUNG, S. S.; KWEON, M. N.; RHEE, J. H. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. **Infection and Immunity**, v. 74(1), p. 694-702, 2006.

LYON, G.; MUIR, T. Chemical signaling among bacteria and its inhibition. **Chemistry and Biology**, v. 10(11), p. 1007-1021, 2003.

MANEFIELD, M.; TURNER, S. L. Quorum sensing in context: out of molecular biology and into microbial ecology. **Microbiology**, v. 148, p. 3762-64, 2002.

MATHEWS, C. K.; VAN HOLD, K. E.; AHERN, K. G. **Biochemistry**, 3 ed. Addison Wesley Longman, 2000.

MCLEAN, R. J.; WHITELEY, M.; STICKLER, D. J.; FUQUA, W. C. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. **FEMS Microbiology**, v. 154(2), p. 259-263, 1997.

MCSORLEY, S.; EHST, B.; YU, Y.; GEWIRTZ, A. Bacterial Flagellin Is an Effective Adjuvant for CD4⁺ T Cells In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 169, p. 3914-3919, 2002.

MEIGHEN, E. A. Genetics of bacterial bioluminescence. **Annual Review of Genetics**, v. 28, p. 117-139, 1994.

MEIJERINK, E.; NEUENSCHWANDER, S.; FRIES R.; DINTER, A.; BERTSCHINGER, H. U.; STRANZINGER, G.; VÖGELI, P. A. DNA polymorphism influencing alpha (1,2) fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to *Escherichia coli* F18 adhesion. **Immunogenetics**, v. 52, p. 129-136, 2000.

MELIN, L.; HOLMGREN, N.; WALLGREAN, P.; FRANKLIN, A. Sensitivity to quinolones and zinc oxide in coliform bacteria from weaned piglets. In: **Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society**. (Birmingham, England). p. 213, 1998.

MILON, A. Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *Escherichia coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal. **Révue Méd. Vétérinaire**, v. 144, p. 858-878, 1993.

MOOI, F. K.; DE GRAAF, F. K. Molecular biology of fimbriae enterotoxigenic *Escherichia coli*. Current Topics in Microbiology. **Immunology**, v. 118, p. 119-138, 1985.

MOOI, F. R.; DE GRAAF, F. K.; VAN EMBDEN, J. D. Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen. **Nucleic Acids Research**, v. 6(3), p. 849-865, 1979.

MOON, H. W.; BUNN, T. O. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. **Vaccine**, v. 11, p. 213-220, 1993.

MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156(7) p. 793-806, 2005.

MORES, N.; AMARAL, A. L.. Patologias associadas ao desmame. In: Resumos do X **Congresso Nacional da Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos**, (Porto Alegre, Brasil). p. 215-224, 2001.

MORGAN, R. L.; ISAACSON, R. E.; MOON, H. W.; BRINTON, C. C.; TO, C. C. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *E. coli* induced diarrhoeal disease by vaccinating dams with purified 987 or K99 pili. **Infection and Immunity**, v. 22, p.71-777, 1978.

MOSELEY, S. L.; DOUGAN, R. A.; SCHNEIDER, H. W. MOON. Cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* and genetic homology between adhesions F41 and K88. **Journal of Bacteriology**, v. 167, p. 799-804, 1986.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Veterinary Research and Animal**, v. 30, p. 259-284, 1999.

NAGY, B.; FEKETE, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. **Int. Journal Medical Microbiology**, v. 295, p. 443-454, 2005.

NAGY, L. K.; WALKER, P. D.; BHOGAL, B. S.; MACKENZIE, T. Evaluation of *E. coli* vaccines against experimental enteric colibacillosis. **Research in Veterinary Science**, v. 24, p. 39-45, 1978.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, v. 104, p. 313-322, 1970.

OTTOW, J. C. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. **Annual Review Microbiology**, v. 29, p. 79-108, 1975.

PARSEK, M. R.; GREENBERG, E. P. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 97, p. 8789-8793, 2000.

PEJSAK, Z.; MARKOWSKA, L. D.; MOKIZYCKA, A.; SZKODA, J. The effects of zinc supplementation on pig productivity and zinc concentration in tissues. In:

Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society. (Birmingham, England), p.17, 1998.

PINO, O.; MARTIN, M.; MICHALEK, S. M. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. **Infection and Immunity**, v. 73(10) p. 6763-6770, 2005.

R. Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.** ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>, 2009.

RADCLIFF, R. P.; MCCORMACK, B. L.; KEISLER, D. H.; CROOKER, B. A.; LUCY, M. C. Partial Feed Restriction Decreases Growth Hormone Receptor 1A mRNA Expression in Postpartum Dairy Cows. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 611-619, 2006.

RANTZER, D.; SVENDSEN, E. *E. coli* associated post weaning diarrhea in pigs: Effects of frequent feeding [paper 383]. In: **Proceedings of the 17th Congress of the International Pig Veterinary Society.** (Ames, Iowa).1 CD ROOM, 2002.

RASMUSSEN, T. B.; MANEFIELD, M.; ANDERSEN, JB.; EBERL L.; ANTHONI, U.; CHRISTOPHERSEN, C.; STEINBERG, P.; KJELLEBERG, S.; GIVSKOV, M. HOW *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. **Microbiology**, v. 12, p. 3237-3244, 2000.

RIISING, J.; MURMANS, M; WITVLIET, M. Protection Against Neonatal *Escherichia coli* Diarrhoea in Pigs by Vaccination of Sows with a New Vaccine that Contains Purified Enterotoxic *E. coli* Virulence Factors F4ac, F4ab, F5 and F6 Fimbrial Antigens and Heat-Labile *E. coli* Enterotoxin (LT) Toxoid. **Journal Veterinary Medical**, v. 52, p. 296-300, 2005.

ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 467-75, 2002.

RODRIGUES JÚNIOR, J. M.; LIMA, K. M.; CASTELO, A. A. M.; MARTINS, L. D. B.; SANTOS, S. A. S.; FACCIOLI, L. H.; SILVA, C. L. É possível uma vacina gênica

auxiliar no controle da tuberculose? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 468-477, 2004.

RUBY, E. G. Lessons from a cooperative, bacterial-animal association: the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* light organ symbiosis. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 50, p. 591- 624, 1996

RUBY E. G.; MCFALL-NGAI M. J. A squid that glows in the night: development of an animal-bacterial mutualism. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 4865-4870, 1992.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal Infection Diseases**, v.181, p. 1753-1754, 2000.

RUTTER, J. M, JONES G. W, BROWN G. T. H, BURROWS M. R.; LUTHER P. D. Antibacterial activity in colostrum and milk associated with protection of piglets against enteric disease caused by K88-positive *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 3, p. 667-676, 1976.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 14-56, 2004.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews**, v. 60, p. 167-215, 1996.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohidrates in cell recognition. **Scientific American**, v.1, p. 82-89, 1993.

SCHAUDER, S. K.; SHOKAT, K.; SURETTE, M. G; BASLLER, B. L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. **Molecular Microbiology**, v. 41(2): p. 463-76, 2001.

SIMIONATTO, S.; VAZ, E.; MICHELON, A.; SEIXAS, F.; DELLAGOSTIN, O. Desenvolvimento e avaliação de novas estratégias de imunização contra colibacilose suína. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25(2), p. 84-90, 2005.

SIXMA, T.K. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, p. 890-918, 1993.

SJÖLING, A.; WIKLUND, G.; SAVARINO, J.; COHEN, D.; SVENNERHO, L. M. Comparative Analyses of Phenotypic and Genotypic Methods for Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Toxins and Colonization Factors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3295-3301, 2007.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n.5, p. 1053-1070, 2004.

SNOECK V; VERFAILLIE T; VERDONCK F; GODDEERIS, B. M; COX, E. The jejunal Peyer's patches are the major inductive sites of the F4-specific immune response following intestinal immunisation of pigs with F4 (K88) fimbriae. **Vaccine**, v. 24(18) p. 3812-3820, 2006.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; GIRÓN, J.A.; KAPER, J. B. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 5187-5197, 2001.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; KAPER, J. Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E.coli*. **Molecular Microbiology**, v. 43, p. 809-21, 2002.

SPERANDIO, V.; TORRES, A. G.; JARVIS, B.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Bactéria – host communication: the language of hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 8951- 8956, 2003.

STOCK, A. M.; ROBINSON, V. I.; GOUDREAU, P. N. Two-component signal transduction. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 183-215, 2000.

SURETTE, M. G.; MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, p.1639-1644, 1999.

TJALSMA, H.; KOETJE, E. J.; KIEWIET, R.; KUIPERS, O. P.; KOLKMAN, M.; VAN DER LAAN, J.; DASKIN, R.; FERRARI, E.; BRON, S. Engineering of quorumsensing

systems for improved production of alkaline protease by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 569-578, 2004.

TSILOYANNIS, V. K., KYRIAKIS, S. C., VLEMMAS, J.; SARRIS K. The effect of organic acids on the control of post weaning oedema disease of piglets. In: **Proceedings of the 15th Congress of the International Pig Veterinary Society**. (Birmingham, England). p.152, 1998.

TURNES, G.; ALEIXO, A.; MONTEIRO, A.; DELLAGOSTIN, O. DNA inoculation with a plasmid vector carrying the faeG adhesin gene of *Escherichia coli* K88ab induced immune responses in mice and pigs. **Vaccine**, v. 17, p. 2089-2095, 1999.

VAN DEN BROECK, W.; COX, E.; GODDEERIS, B. M. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 520-526, 1999.

VAN DEN BROECK, W.; COX, E., OUDEGA, B.; GODDEERIS, B. M. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 223-44, 2000.

VEENING, J. W, HAMOEN, L. W, KUIPERS, O. P. Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 56(6), p. 1481-1494, 2005.

VU-KHAC, H.; HOLODA, E.; PILIPCINEC, E. Distribution of virulence genes in *E. coli* strains isolated from diarrhoeic piglets in the Slovak Republic. **J. Vet. Med. B. Infection Diseases. Vet. Public Health**, v. 51, p. 343-347, 2004.

WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p. 365-404, 2001.

WILSON, R. R.; FRANCIS, D. H. Fimbriae and enterotoxins associated with *E. coli* serotypes isolated from pigs with colibacillosis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p. 213-217, 1986

WITHERS, H.; SIMON, S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. **Microbiology**, v.4, p. 186-193, 2001.

WÖSTEN, M. M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS Microbiology**, v.22, p.127-150, 1998.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. L. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 191-197, 2003.

ZHANG, W.; ZHAO, M.; RUESCH, L.; OMOT, A.; FRANCIS, D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. **Veterinary Microbiology**, v. 123, p. 145-152, 2007.

ZHANG, W., BERBEROV, E., FREELING, J., HE, D., MOXLEY, R., FRANCIS, D. H. Significance of heat stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity study. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 3107-3114, 2006.

ZIDJERVELD, F. G.; ANAKOTTA, J.; BROUWERS, R. A. M.; ZIJDERVELD, A. M.; BAKKER, D.; GRAAF, F.K. Epitope analysis of the F4 (K88) fimbrial antigen complex of enterotoxigenic *Escherichia coli* by using monoclonal antibodies. **Infection and Immunity**, v. 58(6), p. 1870-1878, 1990.