

Camila Henrique Pinto

Modelos *in vitro* e *in vivo* e anticorpos recombinantes para o estudo da toxina termolábil produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Versão corrigida.

São Paulo
2022

Camila Henrique Pinto

Modelos *in vitro* e *in vivo* e anticorpos recombinantes para o estudo da toxina termolábil produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

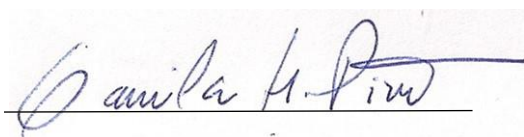
Versão corrigida.

São Paulo
2022

Versão corrigida

Este exemplar foi revisado e alterado em relação à versão original sob responsabilidade única do autor e com a anuência de seu orientador.

São Paulo, 27 de abril de 2022.



Camila Henrique Pinto



Roxane Maria Fontes Piazza

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Pinto, Camila Henrique

Modelos in vitro e in vivo e anticorpos recombinantes para o estudo da toxina termolábil produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica / Camila Henrique Pinto ; orientador(a) Roxane Maria Fontes Piazza - São Paulo, 2022.
103 p. : il.

Tese (Doutorado) - Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências (PPGTox) - Toxinologia. Linha de pesquisa: Toxinas microbianas.
Versão corrigida final

1, Diarreia 2, *Escherichia coli* enterotoxigênica, 3, Toxina termolábil, 4, Toxinas bacterianas I. Piazza, Roxane Maria Fontes . II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências (PPGTox) - Toxinologia. IV. Título,

CDD 615,9

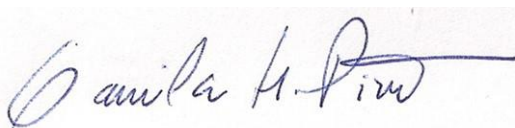
AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Camila Henrique Pinto, aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação/tese por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, imediatamente ou somente após defesa e publicação de trabalho em revista científica, assim como reprodução parcial ou total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação/tese após a data da defesa:

- Imediato
- 06 meses
- 12 meses

São Paulo, 25 de março de 2022



.....
aluno(a)



De acordo:.....
Orientador

POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

DOUTORADO

NOME DO ALUNO(A): Camila Henrique Pinto

DATA DO EXAME: 25/03/2022

BANCA EXAMINADORA: Prof^{as}. Dr^{as}.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Roxane Maria Fontes Piazza (Presidente)		(X)	()
Claudia Trigo Pedroso de Moraes		(X)	()
Fernanda Faria		(X)	()
Katia da Conceição		(X)	()
Juliana Falcão Rodrigues		(X)	()

DECISÃO FINAL: APROVADO(A) (X)

REPROVADO(A) ()

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) produzidas por *Escherichia coli* enterotoxigênica: padronização de um novo modelo in vivo (Zebrafish) para avaliação do potencial neutralizante de anticorpos", protocolada sob o CEUA nº 8592060918 (ID 001435), sob a responsabilidade de **Roxane Maria Fontes Piazza e equipe; Camila Henrique Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 17/10/2018.

We certify that the proposal "Heat-labile (LT) and heat-stable (ST) toxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*: standardization of a new in vivo model (Zebrafish) for the evaluation of antibodies with potential neutralizing activity.", utilizing 500 Fishes (males and females), protocol number CEUA 8592060918 (ID 001435), under the responsibility of **Roxane Maria Fontes Piazza and team; Camila Henrique Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 10/17/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [10/2018](#) a [09/2019](#)

Área: [Bacteriologia](#)

Origem: [LETA - Plataforma Zebrafish](#)

Espécie: [Peixes](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [16 a 18 horas](#)

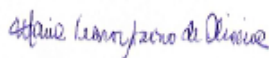
N: [500](#)

Linhagem: [Danio rerio \(zebrafish\)](#)

Peso: [1 a 1 g](#)

Local do experimento: Será realizado no LETA

São Paulo, 20 de janeiro de 2020



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

À minha família por todo o apoio, amor e carinho. Amo muito vocês.
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, pela oportunidade em ser sua aluna, compartilhando um pouco de seu conhecimento e vivência científica comigo. Agradeço imensamente o aprendizado, a amizade e convivência maravilhosa, bem como os amigos que me foram proporcionados nestes sete anos em seu laboratório, quatro deles neste trabalho. Obrigada sempre pelo carinho, compreensão e por propiciar um ambiente de pesquisa tão rico, colaborativo e prazeroso.

À minha amiga do coração e grande colaboradora, a pesquisadora Dra. Daniela Luz. Por partilhar um pouco do seu conhecimento, de forma tão humilde e parceira. Obrigada pelo apoio técnico, científico e emocional, principalmente nas últimas semanas de dezembro, que foram extremamente cansativas; obrigada pelas risadas, conversas e apoio. Amo você minha amiga e colaboradora.

À Dra. Elizabeth B. Norton e ao Dr. John Clements do Departamento de Microbiologia e Imunologia, da Universidade de Tulane, New Orleans, Louisiana, Estados Unidos da América, por gentilmente ceder a toxina termolábil, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Toxinologia Aplicada do Instituto Butantan, da Plataforma Zebrafish, em especial a Dra. Mônica Lopes Ferreira; Dra. Maria Alice Pimentel Falcão e Me. Adolfo Luís Almeida Maleski pela colaboração nos experimentos com *zebrafish*, conversas e todo aprendizado científico.

As colaboradoras Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio e Dra. Luciana Pimenta do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, pelo apoio técnico e científico nos ensaios *in vitro*.

Ao técnico Alexander Seixas de Souza, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, pelo auxílio técnico com a microscopia confocal.

Aos meus amigos de laboratório e da vida, Juliana Yassuda, Miriam Aparecida, Jéssika Cristina, Izabella Henrique, Raissa, Gabriel, Daniela Luz, Thaís Mitsunari e Danielle Munhoz pela amizade, risadas e colaborações. Obrigada por proporcionarem um ambiente de trabalho tão agradável e rico cientificamente, é sempre um prazer trabalhar e colaborar com vocês.

As minhas queridas amigas, Dra. Thaís Mitsunari, Dra. Danielle Munhoz e Dra. Daniela Luz pela amizade, desabafos, parcerias, risadas, auxílio intelectual e força durante todo o doutorado. Pois sem o apoio de vocês, tudo seria bem mais difícil. Muito obrigada batatistas, amo vocês.

À minha família, por todo apoio e amor, vocês são a minha base. Um agradecimento especial à minha mãe, por me confortar em vários momentos difíceis durante esse período, sempre com muito amor e otimismo.

Ao meu irmão Fernando Henrique e minha cunhada e amiga Thamiris Amorim, pelos inúmeros momentos de apoio, carinho e amor durante todo o decorrer do doutorado. Amo vocês!

Ao meu companheiro, Luis Felipe Loureiro. Por me apoiar tanto neste último ano...apoio emocional, técnico, dentre muitos outros. Você é um parceiro maravilhoso, sem o seu apoio e amor neste último ano, tudo seria muito mais difícil! Muito obrigada meu amor, te amo 3.000.

Aos funcionários do laboratório de Bacteriologia: Josiane, Suzi e Dirce pelo grande apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais alunos e pesquisadores do laboratório de Bacteriologia, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

As secretarias da Pós-graduação em Ciências - Toxinologia, Débora Gomes Ferreira, Rosana Coelho e Andréa Paziano dos Santos pela grande eficiência e apoio durante o doutorado. A Esib e ao Instituto Butantan por todo apoio.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP 2017/25406-0; 2018/13895-0 e Bolsa de Doutorado FAPESP 2017/17213-8. E auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de financiamento 001.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

PINTO, Camila Henrique. **Modelos *in vitro* e *in vivo* e anticorpos recombinantes para o estudo da toxina termolábil produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica.** 2022. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2022.

Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC), é um dos principais patótipos bacterianos causadores de diarreia, afetando principalmente crianças menores de cinco anos e viajantes em áreas onde esse patógeno é endêmico. A toxina termolábil do tipo I (LT-I) é um dos principais fatores de virulência deste patótipo e está associada à diarreia em humanos; é também descrita como potente adjuvante de mucosa e sistêmico. O diagnóstico precoce, a abordagem terapêutica e os modelos experimentais são importantes aspectos que merecem atenção em relação à diarreia causada por ETEC. Diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* já foram descritos, no entanto, seu uso nem sempre permite a triagem de biomoléculas e estudos mais sistêmicos com a toxina LT. Além disso, a geração de anticorpos específicos e de alta afinidade para uso no diagnóstico e terapia são de grande importância. Assim, o presente trabalho propôs estabelecer estratégias para geração de fragmentos de anticorpos do tipo scFv e Fab; bem como avaliar e validar as células Caco-2 e o *zebrafish* como modelos para estudos da LT-I. As células Caco-2 foram utilizadas na 62ª passagem e em diferentes densidades de célula por poço da microplaca de cultivo. A internalização da LT-I conjugada ao FITC foi visualizada com 3×10^4 células Caco-2, tanto associada à membrana celular, quanto ao núcleo, evidenciando seu transporte retrógrado e validando o uso deste modelo. Em *zebrafish*, pelo teste de sensibilidade em embriões, foi observada sensibilidade dos embriões frente a diferentes concentrações de LT-I e fenótipos de malformações, principalmente na região pericárdica e no vitelo. Por via sistêmica, a migração da LT-I foi observada na região cardíaca, vitelo e intestino, sugerindo que os fenótipos observados de edema cardíaco (100%), ausência de bexiga natatória (100%), edema de vitelo (80%), além de retardo no crescimento nas larvas, tenham sido ocasionados pela toxina. Nenhum desses efeitos foi encontrado no grupo controle de animais. Houve também diminuição dos batimentos cardíacos durante a cinética de sobrevivência, mostrando o efeito cardiotoxico da LT-I. Em testes por técnica de ELISA o scFv-LT obtido no presente estudo mostrou-se reativo contra a toxina LT purificada, reconheceu as cepas produtoras de LT-I e não reconheceu cepas não produtoras da toxina. Para o Fab-LT foi estabelecida a biblioteca sintética, mas não foram gerados clones reativos contra a toxina LT-I. Assim, podemos afirmar que os modelos *in vitro* e *in vivo* utilizados permitiram-nos validar e demonstrar características até então não exploradas da LT-I na sua relação com o hospedeiro. A geração do scFv-LT nos permitirá utilizar anticorpos recombinantes no diagnóstico de ETEC sem depender da imunização de animais.

Palavras-chave: Diarreia. *Escherichia coli* enterotoxigênica. Toxina termolábil. Toxinas bacterianas.

ABSTRACT

PINTO, Camila Henrique. **In vitro and in vivo models and recombinant antibodies for the study of heat-labile toxin produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli***. 2022. 103 p. Doctoral dissertation (Doctorate degree in Sciences - Toxinology) – Butantan Institute, São Paulo, 2022.

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the main bacterial pathotypes involved in diarrhea, mainly affecting children under 5 years old and travelers to areas where this pathogen is endemic. Heat-labile type I toxin (LT-I), one of the main virulence factors of this pathotype, is associated with diarrhea in humans and is described as a potent mucosal and systemic immune adjuvant. Early diagnosis, therapeutic approaches, and *in vitro* and *in vivo* models are the main concerns in diarrhea caused by ETEC. Different *in vitro* and *in vivo* models have already been described, however, its use does not always allow screening of biomolecules and more systemic studies with the LT toxin. In addition, the generation of specific and high-affinity recombinant antibodies for diagnosis and therapy are of great importance. Thus, the present work aimed to establish strategies for the generation of recombinant antibodies such as scFv and Fab and evaluate and validate Caco-2 cells and zebrafish as models for studies with LT-I. Caco-2 cells were seeded in the 62nd passage and at different cells density per microplate well. The internalization of LT-I conjugated to FITC was visualized in Caco-2 cells at a density of 3×10^4 cells per well, both associated with the cell membrane and with the nucleus, thus demonstrating its retrograde transport and validating the use of this model. In a zebrafish, the fish embryo test revealed the sensitivity of embryos to different concentrations of LT-I, as well as evident malformation phenotypes, mainly in the pericardial and yolk region. Systemically, migration of the FITC-labeled toxin was observed in the cardiac region, yolk, and intestine, suggesting the observed phenotypes of cardiac edema (100%), absence of swim bladder (100%), yolk edema (80%), in addition to growth delay in larvae, were caused by the toxin. None of these phenotypes were observed in the control group of animals. There was also a decrease in heart rate during the larvae' survival kinetics, showing the cardiotoxic effect of LT-I. In ELISA assays the scFv-LT obtained in the present study was reactive against the purified antigen as well to LT-I producing strains supernatant, but not to LT-I-non-producing strains. For the Fab-LT, a synthetic library was constructed, but no LT-I-reactive clones were generated. Therefore, herein we established *in vitro* and *in vivo* models that allowed us to validate and demonstrate unknown characteristics of the LT-I concerning its relationship with the host. Moreover, the generation of scFv-LT will allows us to employ recombinant antibodies for ETEC diagnosis avoiding animals immunization.

Keywords: Diarrhea. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Heat-labile toxin. Bacterial toxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura cristalizada da toxina LT de ETEC.....	24
Figura 2 - Mecanismo de ação da toxina LT-I.....	27
Figura 3 - Estágios de desenvolvimento do <i>zebrafish</i>	31
Figura 4 - Representação dos diferentes tipos de fragmentos e derivados de anticorpos recombinantes.....	35
Figura 5 - Principais etapas de desenvolvimento deste trabalho.....	43
Figura 6 - Estrutura idealizada para o fragmento scFv-LT.....	45
Figura 7 - Ciclo de seleção do fragmento de anticorpo Fab contra a toxina LT-I, por técnica de <i>phage display</i>	54
Figura 8 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50.000) da extração de DNA plasmidial e reação de restrição para liberação do vetor pscFvHis-MBP.....	56
Figura 9 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50.000) da extração de DNA plasmidial e purificação do vetor pScFvHis-MBP.....	57
Figura 10 - Perfil eletroforético das ampliações dos domínios V _L e V _H submetidos a diferentes temperaturas de anelamento.....	58
Figura 11 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50.000) da purificação dos domínios V _H e V _L do scFv-LT.....	58
Figura 12 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50.000) padronização da junção dos domínios V _H e V _L	58
Figura 13 - Perfil eletroforético da amplificação dos domínios V _H , V _L , junção dos domínios sem e com adição de 0,75 e 1,5% de DMSO.....	60
Figura 14 - Perfil eletroforético da amplificação dos domínios V _H e V _L , bem como a junção dos domínios utilizando a Q5® TAQ <i>High-Fidelity DNA Polymerase</i>	60
Figura 15 - Perfil eletroforético da amplificação dos domínios V _H e V _L , bem como a junção dos domínios utilizando a Q5® TAQ <i>High-Fidelity DNA Polymerase</i> , submetidos a purificação.....	61
Figura 16 - Frações proteicas da purificação do fragmento scFv-LT.....	62
Figura 17 - Ensaio por técnica de ELISA indireto para análise da reatividade do scFv-LT frente a toxina LT purificada (2 µg/mL) e BSA (controle negativo)...	63
Figura 18 - Ensaio por técnica de ELISA indireto da análise preliminar da reatividade do scFv-LT frente ao sobrenadante de cepas produtoras e não produtoras de toxina LT.....	64
Figura 19 - Titulação do fago auxiliar.....	65
Figura 20 - Diluição seriada do <i>input</i> e <i>output</i> do primeiro ciclo de seleção.....	66
Figura 21 - Ensaio por técnica de ELISA para avaliar o enriquecimento dos quatro ciclos de seleção realizados, analisando-se os <i>inputs</i> e <i>outputs</i> de cada <i>round</i> (Rd)/ciclo de seleção.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Desenho dos iniciadores do fragmento scFv-LT.....	45
Tabela 2 - Cepas produtoras ou não de toxina LT pertencentes ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (IBU), utilizadas no ensaio por técnica de ELISA indireto com o scFv-LT	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC - Adenilato-ciclase
Amp - Ampicilina
AMPc - Monofosfato cíclico de adenosina
aEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica
BSA - *Bovine Serum Albumin* (Albumina sérica bovina)
Caco-2 - Células de adenocarcinoma de cólon humano
CDR - Região determinante da complementariedade
CDR3 - Terceira região determinante de complementariedade
CFs - fatores de colonização
CFTR - Regulador transmembrana da fibrose cística
CHO - Chinese Hamster Ovary (Células de ovário de hamster chinês)
CS - Antígeno de superfície coli
CT - Toxina colérica
C4 - Colônia 4
DAB - Diaminobenzidina
DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente
DEC - *Escherichia coli* diarreioagênica
DMSO - Dimetil sulfóxido
DNA - Ácido desoxirribonucleico
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO - Densidade óptica
FD - Fator de diluição
EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EatA - *ETEC autotransporter A* (autotransportador A)
E. coli - *Escherichia coli*
EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
EtpA - Adesina extracelular de ETEC
EtpB - Proteína de transporte de membrana externa de ETEC
EtpC - Glicosiltransferase de ETEC
ExPEC - *E. coli* Extraintestinal
Fab - Fragmento de ligação ao antígeno
Fw - Iniciador direto
GC-C - Guanilato ciclase C
GD1/ GD1a/ GD1b/ GD1α – Complexo dissialogangliosídeos 1
GM1/ GM1b - Complexo monossialogangliosídeo 1
GM2 - Gangliosídeo monossialilado 2
GM3 - Monossialogangliosídeo 3
GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina
GQ1b - Tetrassialogangliosídeo 1b
GT1b - Trissialogangliosídeo 1b
HAMA - *Human anti-mouse antibody* (Anticorpo humano anti-camundongo)
IBu - Instituto Butantan

Ig - Imunoglobulina
IgA - Imunoglobulina A
IgD - Imunoglobulina D
IgE - Imunoglobulina E
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
Km - Canamicina
LPS - Lipopolissacarídeos
LTI - Toxina termolábil tipo I
LTII - Toxina termolábil tipo II
LTh - Toxina termolábil isolada de humanos
LTP - Toxina termolábil isolada de porcos
MAb - Anticorpo Monoclonal
MTA - Transferência de material
MUC2 - Mucina 2
NAD - Dinucleotídio de nicotinamida e adenina
OMS – Organização Mundial de Saúde
OMVs - Vesículas de membrana externa
PAb - Anticorpo Policlonal
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão salina-fosfato)
PBST - Tampão salina-fosfato com detergente Tween 20
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
rAbs - Anticorpos recombinantes
Rv - *Reverse* (Iniciador reverso)
scFv - Fragmentos variáveis em cadeia única
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida)
SFB - Soro fetal bovino
SPATE - Autotransportadores de serina protease de *Enterobacteriaceae*
SRO – Sais de reidratação oral
ST - Toxina termoestável
STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga
STh - Toxina termo-estável isolada de humanos
Stp - Toxina termo-estável isolada de porcos
Stx1 - Toxina de Shiga 1
Stx2 - Toxina de Shiga 2
Tet - Tetraciclina
Tm - Temperatura de *melting* (temperatura de desnaturação)
TMB - Tetrametilbenzidina
T2SS - Sistema de secreção tipo II
UFC - Unidade de formadora de colônia
WHO - *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)
V_L - Cadeia/domínio leve do anticorpo
V_H - Cadeia/domínio pesado do anticorpo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. <i>Escherichia coli</i>.....	20
1.2. <i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica.....	21
1.2.1. Toxina termolábil (LT).....	24
1.2.2. Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> para as enterotoxinas de ETEC	27
1.2.2.1. Modelos <i>in vitro</i>	27
1.2.2.2. Modelos <i>in vivo</i>	28
1.3. <i>Zebrafish</i> como modelo experimental.....	30
1.4. Anticorpos recombinantes	32
1.5. Diagnóstico para ETEC por detecção da toxina LT-I	38
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVO GERAL.....	42
3.1. Delineamento experimental.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Toxina LT-I	44
4.2. Construção do fragmento scFv contra a LT-I (ScFv-LT).....	44
4.2.1. Desenho dos iniciadores.	42
4.2.2. Padronização das condições da PCR: Amplificação dos domínios leve e pesado do scFv-LT por PCR.....	45
4.2.3. Junção dos domínios leve e pesado do scFv-LT por PCR.....	46
4.2.4. Ligação do fragmento scFv-LT com o vetor e expressão periplasmático.....	46
4.2.5. Indução da expressão dos genes do scFv-LT	48
4.2.6. Purificação do scFv-LT por cromatografia de afinidade	48
4.2.7. <i>Immunoblotting</i>	49
4.2.8. Imunoensaio enzimático (ELISA) indireto.....	50
4.2.9. Técnica de ELISA indireto com cepas bacterianas	50
4.3. Seleção por <i>phage display</i> do fragmento Fab anti-LT	51
4.3.1. Amplificação do fago auxiliar (M13KO7) para <i>phage display</i>	51
4.3.1.1. Expansão e precipitação do fago auxiliar	51
4.3.1.2. Titulação do fago auxiliar.....	52

4.3.2. Seleção de fagos contra antígeno imobilizado	52
4.3.2.1. Técnica de ELISA para fago.....	54
5. RESULTADOS	56
5.1. Fragmento scFv-LT	56
5.1.1. Vetor de expressão <i>pScFv</i>	56
5.1.2. Junção dos domínios variáveis	57
5.1.3. Clonagem, indução e purificação do scFv-LT	61
5.1.4. Reatividade do scFv-LT.....	62
5.2. Seleção do fragmento Fab-LT	64
5.2.1 Fago auxiliar (M13KO7)	64
5.2.2 Seleção e ciclos de enriquecimento	64
6. DISCUSSÃO	68
7. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A	88

INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) é um bacilo gram negativo facultativo, da família *Enterobacteriaceae*, que faz parte da microbiota intestinal natural do intestino de humanos e de diversas outras espécies de animais, e na sua grande maioria é considerado inofensivo para humanos (JESSER; LEVI, 2020; CROXEN et al., 2013), fundamentais para manutenção da fisiologia gastrointestinal de um indivíduo saudável (JESSER; LEVI, 2020; YANG et al., 2017; CROXEN et al., 2013).

Embora seja um membro benigno da microbiota intestinal comensal, tais bactérias possuem uma grande habilidade de adaptação extraintestinal, o que aliada à sua plasticidade genômica favorece a aquisição de diversos elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos contendo genes de resistência e DNA exógeno. (JESSER; LEVI, 2020; MARTINEZ; TRABULSI, 2008). Estes fatores de virulência adquiridos permitem com que cepas de *E. coli* causem diferentes doenças intrainestinais, como a diarreia, ocasionada por cepas de *E. coli* diarreiogênicas (DEC), ou extraintestinais (ExPEC). As cepas de *E. coli* diarreiogênicas são agrupadas de acordo com seus mecanismos de virulência específicos, síndromes clínicas que causam os aspectos epidemiológicos e os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*, denominados como patotipos (JESSER; LEVI, 2020; VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015; KAPER et al., 2004). Embora essa categorização seja imperfeita, pois as cepas dentro de cada alguns desses patotipos são geneticamente heterogêneas e desafiaram definições moleculares de patogenicidade (SERVIN, 2014; RASKO et al., 2008), ela é extremamente importante para entender as diferenças na patogenicidade, diagnosticar e tratar eficazmente, bem como projetar vacinas específicas (JESSER; LEVI, 2020).

Deste modo, os patotipos de DEC incluem a *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC); *E. coli* produtora da toxina de Shiga [(STEC e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)], *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), foco deste trabalho (JESSER; LEVI, 2020; VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015; KAPER et al., 2004; NATARO; MOBLEY, 1998).

1.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

ETEC é um dos principais patótipos bacterianos causadores de diarreia, afetando principalmente crianças menores de 5 anos em países em desenvolvimento, pessoas em trânsito em áreas onde esse patógeno é endêmico, bem como animais neonatais e pós-desmame (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2020; DUAN et al., 2019). A infecção intestinal por este patótipo é geralmente adquirida de forma indireta pela via fecal-oral, pela ingestão de alimentos e água contaminada, levando a um quadro de diarreia, que pode variar entre aquosa autolimitada à diarreia do tipo colérica desidratante, sem sangue ou muco (SCHUETZ, 2019; DUAN et al., 2019).

Este patótipo também é considerado o principal causador da chamada “diarreia do viajante”, uma infecção gastrointestinal associada a visitantes em trânsito por países onde este patógeno ocorre de maneira endêmica, principalmente para destinos tropicais ou subtropicais (JESSER; LEVI, 2020; FEDOR; BOJANOWSKI; KORZENIEWSKI, 2019). Em estudos realizados entre 2010 e 2016, ETEC foi o patógeno mais comumente identificado nos casos de diarreia do viajante em visitantes da América Latina (42%) e Ásia (28%) (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2020; JIANG; DUPONT, 2017). Outros dados publicados em 2016 mostram ETEC em 20% das amostras clínicas de 382 viajantes sintomáticos e assintomáticos, o que evidencia sua persistência como patógeno associado ao acometimento de viajantes (LÄÄVERI et al., 2016).

Diversos fatores de risco estão associados a um aumento na taxa de diarreia do viajante, principalmente os relacionados ao nível de higiene dos países de origem e destino; exposição anterior ao patógeno (sugerindo suscetibilidade aumentada); fatores genéticos, dentre outros (MIRHOSEINI; AMANI; NAZARIAN, 2018; BAUCHE; DUPONT, 2011).

No Brasil, de acordo com o dados do Ministério da Saúde, atualizados em janeiro de 2022, ocorrem anualmente, mais de 4 milhões de casos de doenças diarreicas agudas e mais de 4 mil óbitos, registrados por meio da vigilância epidemiológica e pelo Sistema de Informação sobre Mortalidade. No entanto, os dados epidemiológicos referentes as DECs, incluindo-se ETEC, são limitados, sugerindo a subnotificação dos casos e/ou um déficit no diagnóstico de casos diarreicos ocasionados por ETEC.

Na literatura, foram relatadas cepas de ETEC isoladas de casos diarreicos nas cidades de Salvador (BUERIS et al., 2007), Teresina (NUNES et al., 2011), João Pessoa (MORENO et al., 2010) e Porto Velho (ORLANDI et al., 2006), sendo identificadas

em, respectivamente: 3,7%; 9,2%; 10% e 4,4% desses casos diarreicos. Em outro estudo, com 253 crianças de comunidades quilombolas no Espírito Santo, das 1.943 *E. coli* isoladas e categorizadas em diferentes patotipos, 2,3% delas foram associadas à diarreia por ETEC (LOZER et al., 2013). ETEC também foi identificada nos estudos de Lima e colaboradores (2019) como um dos enteropatógenos responsáveis pela diarreia infantil de seis cidades de quatro estados do semiárido brasileiro, sendo eles: Paraíba, Ceará, Pernambuco e Piauí.

A diarreia observada na infecção intestinal por ETEC manifesta-se cerca de 2-3 dias após a aquisição do organismo como diarreia tipo secretória, iniciada por evacuações líquidas que variam de diarreia leve a grave, ausentes de sangue, e podem ocasionar náuseas e vômitos no indivíduo. Tais manifestações clínicas podem ocasionar à desidratação severa do indivíduo, causada pela perda de fluidos e eletrólitos nas fezes (VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015).

De um modo geral, o tratamento da diarreia, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) baseia-se na reposição de água e eletrólitos por gotejamento intravenoso e/ou solução de reidratação oral, realizada pela ingestão de sais de reidratação oral (SRO), composta de glicose, cloreto de sódio e citrato de sódio (WHO, 2017). A SRO é absorvida no intestino delgado e repõe a água e os eletrólitos perdidos nas fezes. Além disso, um tratamento suplementar de 10 a 14 dias com comprimidos dispersíveis de 20 mg de zinco tem sido recomendado, por reduzir a duração dos episódios de diarreia em 25%, bem como estão associados a uma redução de 30% no volume das fezes (WHO, 2017).

Em relação a patogenicidade de ETEC, ela é iniciada pela sua aderência à mucosa intestinal, facilitada pela expressão de estruturas fimbriais, conhecidas como fatores de colonização (CFs), que têm como alvo os receptores presentes nas células epiteliais na superfície do lúmen intestinal (GHANY et al., 2021; SVENNERHOLM; LUNDGREN, 2012; ISIDEAN et al., 2011). Atualmente, mais 25 CFs foram identificados, dos quais o antígeno do fator de colonização I (CFA/I) e o antígeno de superfície coli (CS1–CS6) são os principais, onde algumas estirpes de ETEC coexpressam CS4 e CS3 ou CS2 e CS3; e outros podem expressar CS4 e CS6 ou CS5 e CS6 (GHANY et al., 2021; SVENNERHOLM; LUNDGREN, 2012). De acordo com alguns estudos de prevalência de ETEC, cerca de 50-80% dos isolados clínicos de ETEC expressam um CF conhecido e muito provavelmente este número aumente em decorrência da

identificação de novos CFs (GHANY et al., 2021; FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2020; SVENNERHOLM; LUNDGREN, 2012).

Além disso, estudos recentes demonstram que o CFA/I carrega pelo menos dois *locus* de virulência adicionais, o gene *eatA* que codifica EatA (PATEL et al., 2004), uma serino-protease autotransportadora, da família *Enterobacteriaceae* (SPATE), e o *locus etpBAC* que codifica EtpA (uma adesina extracelular), EtpB (uma proteína de transporte de membrana externa do domínio) e a glicosiltransferase EtpC (FLECKENSTEIN; FISCHER; BURKITT, 2006). Dados recentes sugerem que EatA pode aumentar o acesso de ETEC às células intestinais por degradar a principal mucina (MUC2) secretada pelas células caliciformes intestinais (KUMAR et al., 2014); além de também degradar o EtpA, prevenindo potencialmente o acúmulo da adesina e acelerando a entrega da toxina termolábil (LT) produzida por ETEC (DUAN et al., 2019; ROY et al., 2011).

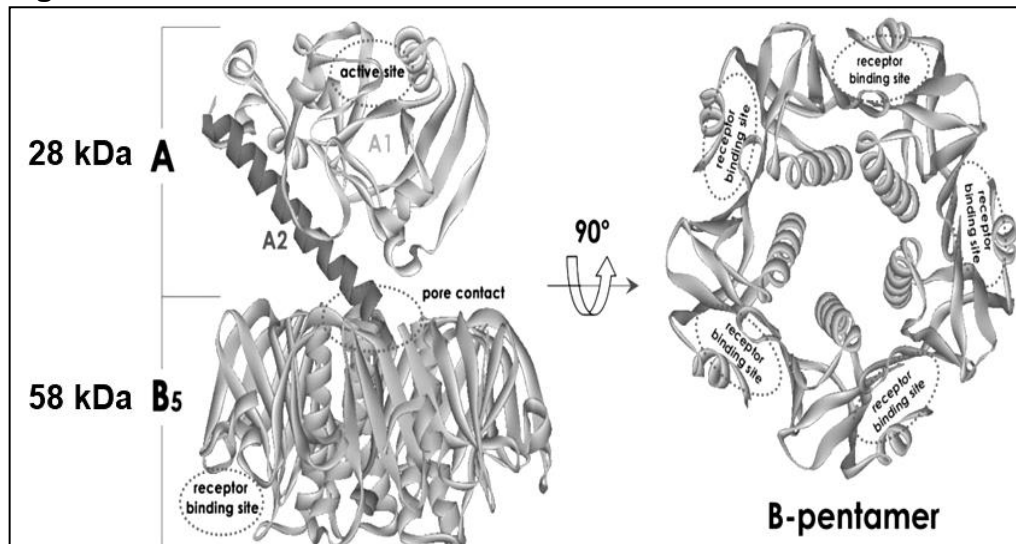
Assim, a interação coordenada desse conjunto de fatores de virulência de ETEC conduz as interações patógeno-hospedeiro necessárias para sua adesão ao epitélio intestinal. Cabe ressaltar que embora as moléculas de virulência específicas de ETEC atualmente descritas sejam codificadas em plasmídeos, diversos estudos de patogenicidade evidenciam a atuação em conjunto com características codificadas cromossomicamente e altamente conservadas dos genomas de *E. coli*. (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2020; SHEIKH et al., 2017; LUO et al., 2014; SHEIKH et al., 2014; KANSAL et al., 2013; HARRIS et al., 2011).

Desde modo, a interação eficaz ETEC-hospedeiro é um pré-requisito essencial para a liberação e consequente ação de suas potentes enterotoxinas: a termoestável (ST) e termolábil (LT), foco deste trabalho. Estas duas toxinas se destacam como principais fatores de virulência de ETEC, ao qual as cepas podem produzir isoladamente ou simultaneamente os dois tipos de enterotoxinas, que diferem em estrutura e mecanismo de ação (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2019; DUAN et al., 2019; MUNSON, 2013).

1.2.1 Toxina termolábil (LT)

A LT é uma enterotoxina oligomérica de 86 kDa com estrutura do tipo AB₅, codificada no *operon eltAB* presente no plasmídeo Ent. Essa toxina é composta por uma subunidade A (28 kDa) formada por dois domínios (A1 e A2) ligados por uma ponte dissulfeto, sendo A1 enzimaticamente ativa e A2 servindo como suporte, ligada não covalentemente a subunidade B pentamérica de 58 kDa (**Figura 1**) (DUAN et al., 2019; MIRHOSEINI; AMANI; NAZARIAN, 2018; VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015; MUSON, 2013; OCHI et al., 2009). LT é sensível ao aquecimento, perdendo sua atividade quando incubada a 70 °C por 10 minutos (GILL et al., 1981).

Figura 1 - Estrutura da toxina LT-I de ETEC.



Adaptado de: FAN *et al.*, 2004.

A estrutura da toxina LT-I possui 86 kDa e uma estrutura do tipo AB₅, formada por uma subunidade A, de 28 kDa composta pelos domínios A1 (porção ativa da toxina) e A2. Esta subunidade A é ligada a uma subunidade B pentamérica de 58 kDa. A subunidade B pentamérica possui sítios de ligação aos receptores presentes no epitélio intestinal, necessários para a sua internalização por endocitose.

A toxina LT é dividida em dois grupos, classificadas de acordo com as características genéticas, bioquímicas e imunológicas. A toxina tipo I (LT-I) é geralmente associada à diarreia em humanos (LTh) e leitões (LTp), e apresenta aproximadamente 82% de identidade a nível de aminoácidos com a toxina colérica (CT) produzida por *Vibrio cholerae*, compartilhando estrutura, afinidade ao receptor monossialogangliosídeo (GM₁) em células eucarióticas e atividade enzimática (DUAN et al., 2019; VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015; SANTOS, 2014; DUBREUIL, 2013; SPANGLER, 1992). No entanto, LT e CT apresentam diferenças em relação ao mecanismo de

regulação gênica, processamento, secreção e padrão de resposta imunológica que induzem (DUAN et al., 2019; NATARO; KAPER, 1998).

Já a LT do tipo II (LT-II) é produzida por linhagens de ETEC isoladas de animais, produtos alimentícios e raramente de humanos (DUAN et al., 2019; DUBREUIL, 2013). Os genes que codificam para LT-II são cromossomais, já para LT-I o operon *eltx* se apresenta em plasmídeo, mas também pode ser codificado por genes cromossomais (LASARO et al., 2008; GREEN et al. 1983). Em comparação molecular, LT-II compartilha 55 e 57% de identidade em relação à subunidade A de LT-I e CT, respectivamente, e baixa identidade (menor que 14%) em relação à subunidade B das mesmas (DUAN et al., 2019; PICKETT et al., 1989). ETEC também pode produzir três variantes de LT-II: LT-IIa, LTII-b e LT-IIc que foi isolada de um hospedeiro aviário (DUAN et al., 2019; BERENSON et al., 2013; NAWAR, 2010).

As variantes da toxina LT também diferem quanto à especificidade de ligação ao receptor principal. A toxina LT-I (LTh e LTp) e a toxina CT se ligam com maior afinidade ao receptor monossialogangliosídeo (GM1), em decorrência da interação com a galactose terminal e o ácido sialico desse gangliosídeo. Essas toxinas também podem se ligar com baixa afinidade a outras glicoproteínas e gangliosídeos que mantêm a galactose na porção terminal, como por exemplo o asilo-GM₁, GD_{1b} e paraglobosídeos (MUDRAK; KUEHN et al., 2010).

Já as variantes da toxina do tipo II, se ligam a diferentes receptores, sendo que LT-IIa possui afinidade para os receptores GD_{1b}, GM₁, GT_{1b}, GQ_{1b}, GM₂, GD₁ e GM₃ (DUAN et al. 2019; SANTOS, 2014; BERENSON et al., 2013). LTII-b possui alta afinidade com o receptor GD_{1a}, no entanto, pode se ligar com menos afinidade aos receptores: GT_{1b}, GM₂, GM₃, GM_{1b} e GD_{1α} (SANTOS, 2014; BERENSON et al., 2010). A variante LT-IIc, descrita por Nawar et al., (2010) foi isolada de hospedeiro aviário e seu efeito citotóxico *in vitro* em células Y-1 foi menor quando comparado aos efeitos das demais toxinas tipo I e II de LT, bem como CT. Além disso, a sua citotoxicidade foi parcialmente neutralizada por anticorpos anti-LT-IIa ou LT-IIb, não havendo neutralização por anticorpos anti-CT (DUAN et al., 2019; BERENSON et al., 2013; NAWAR, 2010). A variante LT-IIc se liga aos receptores GM₃, GD_{1a}, GM_{1b} e GD_{1α} (BERENSON et al., 2013; NAWAR, 2010).

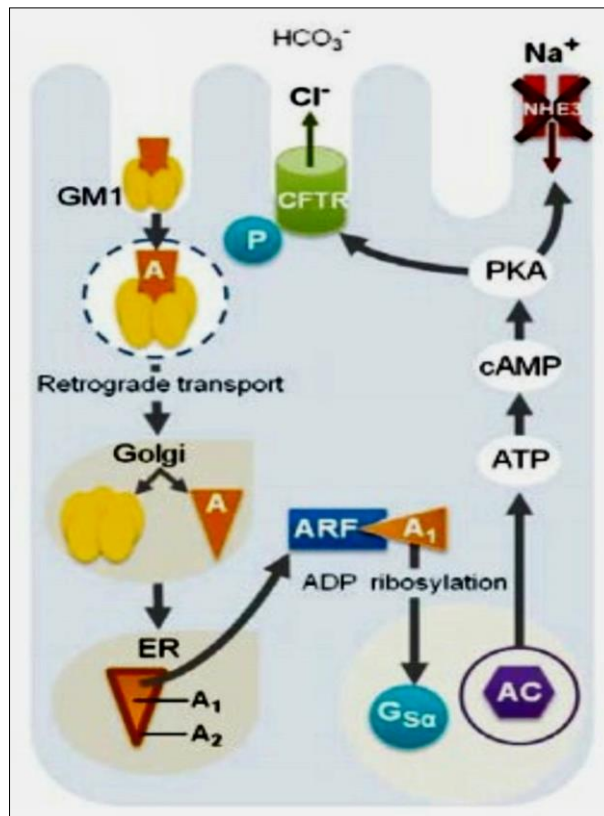
Em relação a sua secreção, a holotoxina LT é inicialmente montada no periplasma e então secretada para a membrana externa ou pelo sistema de secreção tipo II clássico (T2SS) ou via vesículas de membrana externa (OMVs) liberadas por ETEC

(FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2020; DUAN et al., 2019). A liberação da toxina LT-I durante a infecção do trato gastrointestinal leva a um quadro clínico de diarreia aquosa profusa. Ela exerce seu efeito tóxico sobre os enterócitos após internalização, mediada pela ligação da subunidade B aos gangliosídeos, principalmente ao GM₁ ao qual possui maior afinidade, presente na superfície do epitélio intestinal.

Posteriormente, LT-I é internalizada por endocitose e transportada através do Golgi e do retículo endoplasmático; a subunidade A sofre processamento pós-traducional para gerar os peptídeos A1 e A2. A1 é então translocado para o citosol atuando como ADP-ribosil transferase do NAD para subunidade alfa da proteína G estimulatória (proteína que regula adenilato ciclase). Esta ativação permanente inibe a atividade GTPásica da proteína G estimulatória e induz a ativação celular da adenilato ciclase, levando a elevação descontrolada do AMP cíclico (AMPc) intracelular, que por sua vez catalisa a formação de AMPc a partir de ATP. Com o aumento descontrolado de AMPc intracelular, ocorre a ativação das vias dependentes da proteína quinase A (PKA), que inibe a absorção de Na⁺ através de trocadores de sódio-hidrogênio e também estimula a secreção de íons Cl⁻ pela fosforilação do regulador transmembrana da fibrose cística (CFTR).

Com isso, ocorre acúmulo de sal e água no lúmen intestinal, levando a uma quadro de diarreia aquosa no indivíduo (DUAN et al., 2019; VILLAMIL; NAVARRO-GARCIA, 2015; MUSON, 2013; SPANGLER, 1992). A **Figura 2** ilustra o mecanismo de ação da toxina LT-I.

Figura 2 - Mecanismo de ação da toxina LT.



Fonte: DUBREUIL, 2012.

Além de seu mecanismo de ação no lúmen intestinal, ocasionando o quadro clínico de diarreia, a LT-I e suas subfamílias (LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc) também foram descritas como potentes adjuvantes de mucosa e sistêmicos (HU et al., 2014; CONNELL, 2007). A compreensão dos mecanismos moleculares dessa importante toxina na patogenicidade da ETEC, bem como o seu efeito adjuvante, vem sendo estudada em diversos modelos *in vitro* e *in vivo*.

1.2.2 Modelos *in vivo* e *in vitro* para as enterotoxinas de ETEC

1.2.2.1 Modelos *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram utilizados para visualizar o efeito citotônico da toxina LT em culturas de células tumorais adrenais Y-1 (ATCC®CCL-79™), uma linhagem celular tumoral de origem murina, gerada a partir de um tumor adrenocortical; e em células de ovário de hamster chinês [(CHO, do inglês *Chinese Hamster Ovary* (ATCC®CCL-61™)], (OZAKY et al., 2015; LASARO et al., 2009; DONTA et al., 1974;

GUERRANT et al., 1974). Nos ensaios, são observadas alterações morfológicas causadas pelo efeito citotônico da toxina LT, após o período de incubação com sobrenadante de cultura de cepas de ETEC. As células Y1 tornam-se arredondadas, enquanto as células CHO tornam-se alongadas (OZAKY et al., 2015; DONTA et al., 1974; GUERRANT et al., 1974). Outro importante estudo *in vitro* foi realizado por Dorsey et al. (2006), o qual demonstrou a importância da interação patógeno-hospedeiro no que se refere a secreção de LT por ETEC, bem como a maior elucidação quanto ao T2SS.

Em estudos referentes à adjuvância de LT-I, também foi utilizada a linhagem celular humana derivada do adenocarcinoma do colorretal (Caco-2), a fim de observar a sua ação e efeito no sistema imunológico (BOWMAN; CLEMENTS, 2001; LOPES, 2000). Isto porque essas células humanas apresentam características de diferenciação espontânea em enterócitos, manutenção das características morfológicas e funcionais do enterócito maduro, bem como expressam a maioria dos transportadores, enzimas metabolizadoras de drogas e receptores epiteliais normais, incluindo o gangliosídeo GM₁ (LEA, 2015; JAHN; BIAZIK; BRAET, 2011), ao qual a sua expressão é dependente de um aumento no número de passagens de cultura celular (JAHN; BIAZIK; BRAET, 2011).

Esta linhagem celular humana também foi utilizada no estudo recente de Hoffmannid e colaboradores (2021), a qual foi proposto um modelo de co-cultura entre as células Caco-2 e células HT29-MTX do tipo caliciforme como modelo funcional do epitélio intestinal humano, para estudar os mecanismos da doença induzida pelas toxinas CT e LT. No entanto, LT mostrou apenas um aumento na corrente de curto-circuito nas células Caco-2, indicando um aumento da secreção apical de cloreto, evidenciando que somente as células Caco-2 foram eficientes para LT-I. Tal estudo, reafirma a viabilidade na utilização de células Caco-2 para estudos com a LT.

1.2.2.2 Modelos *in vivo*

Os estudos para entender a colonização e patogênese causada pelas enterotoxinas de ETEC *in vivo* foram conduzidos em modelos de camundongos tratados com antibióticos e/ ou coelhos, ou também é utilizada a inoculação de LT pela via parenteral.

O ensaio mais difundido para detecção *in vivo* de LT-I é realizado na alça ligada do intestino de coelhos adultos (DE et al., 1956). Nesta técnica, os cultivos

bacterianos são inoculados nas alças ligadas de intestino de coelho (mantidos em jejum por 48 h pré-infecção), com leitura realizada de 5 (toxina ST) a 18 horas (toxina LT) após infecção e a positividade observada quanto à presença de acúmulo de fluidos, maior ou igual a 1 mL/cm (DE et al., 1956; DEAN et al., 1972; EVANS et al., 1973, 1975).

Como alternativa ao uso de coelhos, a técnica descrita por Dean et al. (1972), propôs o uso de camundongos recém-nascidos, administrando injeção percutânea ou gástrica do sobrenadante de cultura no intestino dos mesmos, juntamente com solução azul de Evans. Após a inoculação, os animais são mantidos a temperatura ambiente por quatro horas e eutanasiados para a retirada dos intestinos. Os intestinos dos camundongos cujos estômagos mostram-se corados, são pesados separadamente e a positividade é observada quando detectada a presença quantitativa de acúmulo de fluido no lúmen intestinal (DEAN et al., 1972).

Cabe ressaltar que essas metodologias são extremamente trabalhosas, difíceis de reproduzir e exigem técnicas cirúrgicas, sendo muitas vezes incompatíveis com as regras dos comitês que regulam a ética no uso de animais atualmente. Outros modelos foram estudados com esta técnica, como porcos, bezerros e cordeiros, bem como a inoculação por via oral (SMITH, HALLS, 1967, 1963), no entanto, os modelos mais disseminados para estudar e detectar isolados de ETEC são coelhos e camundongos.

Além da patogênese, estes modelos *in vivo* também são utilizados para análise de imunogenicidade e eficácia de candidatos a vacinas contra ETEC, incluindo modelos de camundongos adultos orogástricos e intranasais (BOLICK et al., 2018; ALLEN et al., 2006; BYRD, CASSELS, 2003; BYRD, MOG, CASSELS, 2003), modelo de desafio de camundongo recém-nascidos (LUIZ et al., 2015) e modelo de rato (KLIPSTEIN et al., 1981).

Esses modelos, no entanto, não imitam adequadamente todo o espectro da doença observada com a infecção humana por ETEC e são ainda mais limitados, pois são difíceis de reproduzir ou requerem cirurgia como desfecho. Um modelo ideal requer a ausência de antibióticos ou intervenção cirúrgica, incorpora um desafio orogástrico de bactérias e deve demonstrar a colonização intestinal, doença diarreica e desenvolvimento de imunidade protetora.

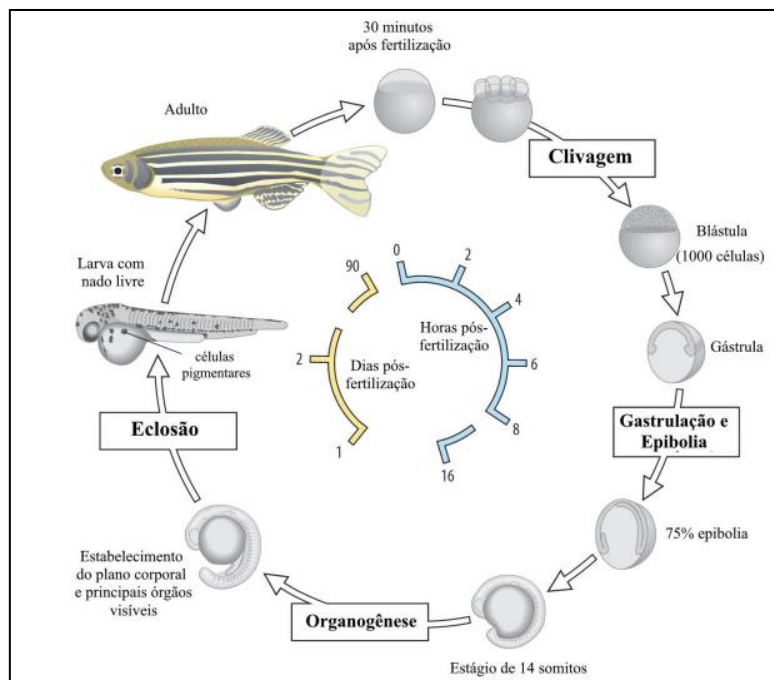
1.3 Zebrafish como modelo experimental

O peixe *Zebrafish* (*Danio rerio*) conhecido também como paulistinha ou peixe-zebra, é um peixe da subclasse *teleóstei*, da classe *Actinopterygii*, ordem *Cypriniformes* e pertencente à família *Cyprinidae*; originário de água doce do sudeste da Ásia (FONTANA et al., 2018; VARAS et al, 2017; BASU; SACHIDANANDAN, 2013; LIESCHKE; CURRIE, 2007). O uso do *zebrafish* como modelo de vertebrado em estudos foi inicialmente proposto por Streisinger et al. (1981) que demonstrou viabilidade na utilização dessa espécie para pesquisa básica, baseada em seus embriões e características genéticas. O genoma do *zebrafish* foi sequenciado, sendo que, 70% de seus 26 mil genes são semelhantes aos humanos, incluindo aqueles que codificam citocinas, moléculas do sistema de histocompatibilidade, conhecidas como reguladoras da resposta imune (BAMBINO; CHU, 2017; LIESCHKE et al., 2007).

Assim, o *zebrafish* é uma espécie de vertebrado com várias características vantajosas que preenche a lacuna entre cultura de células e roedores, permitindo uma validação *in vivo* precoce, bem como vários estudos de patógenos humanos (LANGHEINRICH, 2003; VARAS et al., 2017), estudos avaliando a neutralização de toxinas por anticorpos (MELO et al., 2020), eficiência de moléculas como adjuvantes de vacinas (KAVALIAUSKIS et al., 2016; LIU, et al., 2015) e testes de eficácia e segurança de vacinas (BAILONE et al., 2020).

Este modelo experimental possui diversas características vantajosas, quando comparadas a modelos já estabelecidos em roedores, como claridade ótica dos embriões e larvas, permitindo imagens em tempo real de patologias em desenvolvimento; alta taxa reprodutiva (podendo colocar de 200 a 500 ovos de 2 a 3 dias); e rápido e fácil desenvolvimento, podem crescer e se desenvolver facilmente em microplacas poços de 96 poços (o que facilita seu uso de manutenção e pesquisa, quando comparados com roedores). Além disso, evolui do estágio embrionário para larva entre 24 a 72 horas e torna-se adulto aos três meses de vida (FONTANA et al., 2018; VARAS et al, 2017; BASU; SACHIDANANDAN, 2013). Deste modo, permite o acesso rápido a todos os estágios de desenvolvimento (**Figura 3**).

Figura 3 - Estágios de desenvolvimento do *zebrafish*.



Fonte: TERRAMOTO, 2020.

A fase embrionária é observada de 0 a 16 h pós-fertilização, seguida pela fase larval (24 a 72 h pós-fertilização) e adulta.

Embora o *zebrafish* tenha sido utilizado inicialmente como um modelo para estudar o desenvolvimento embrionário, ele ganhou crescente atenção como um sistema vantajoso para investigar doenças humanas, incluindo estudos com vírus (WANG et al., 2021; SANDERS; BATTIS; WINTON, 2003), como por exemplo com a proteína Spike de SARS-CoV-2 (ZHENG et al., 2021; FERNANDES et al., 2021) e bactérias e/ou enterotoxinas produzidas por elas (NAG et al., 2018; RUNFT et al., 2013; VARAS et al., 2017; DEBNATH et al., 2013; SASLOWSKY et al., 2010; SZABADY et al., 2009; MEIJER et al., 2004; TOOLE et al., 2004; VAN DER SAR et al., 2003; NEELY; PFEIFER; CAPARON, 2002;). Neste último caso, estudos para investigar patologias humanas, incluindo distúrbios intestinais ocasionado por bactérias em modelo *zebrafish* tem sido crescente, pois o seu sistema digestivo é totalmente funcional e visível 5 dias pós fertilização, além de apresentar grande homologia com organismos vertebrados superiores em termos de composição celular (ZHAO; PACK, 2017).

Isso possibilitou vários estudos de patologias gastrointestinais em larvas e peixes adultos, como o observado em estudos realizados com *Vibrio cholerae* (NAG et al., 2018; RUNFT et al., 2013), evidenciando o potencial desse modelo animal para análise de colonização intestinal usando esse tipo de bactéria. Esse modelo, além da

colonização intestinal, também permitiu o estudo específico de fatores de virulência produzidos por bactérias diarreogênicas, tendo como exemplo a toxina colérica (CT) produzida pelo *Vibrio cholerae*. No estudo realizado por Saslowsky e colaboradores (2010), a intoxicação de embriões de *zebrafish* por absorção transdérmica de CT, possibilitou avaliar o papel de duas proteínas na retrotranslocação do CT, após a internalização no epitélio intestinal.

Assim, estes e outros estudos utilizando o modelo *zebrafish* foram bem-sucedidos, devido às suas diversas vantagens, em relação a outros mamíferos (ALI et al., 2011; DAHM; GEISLER, 2006; KIMMEL et al., 1995). Cabe ressaltar que, embora o *zebrafish* possa conectar a lacuna entre ensaios baseado em culturas de células e validação biológica em animais vertebrados superiores, ele não substitui o uso de animais roedores, pois estes fornecem dados que são mais facilmente extrapolados para humanos, mas pode servir como uma importante ferramenta de triagem para biomoléculas terapêuticas, como por exemplo os anticorpos.

1.4. Anticorpos recombinantes

Anticorpos são moléculas versáteis produzidas pelo sistema imunológico adaptativo de todos os vertebrados para identificar, matar ou neutralizar bactérias invasoras, parasitas, toxinas e vírus, assim como destruir outros antígenos não próprios (BASU et al., 2019; EWERS, 2018). As moléculas de anticorpos possuem uma forma de Y e consistem em três segmentos de igual tamanho, conectados por uma porção flexível. Todos os anticorpos são construídos da mesma forma, a partir de pares de cadeias/domínios polipeptídios pesadas e leves, denominadas imunoglobulinas (Igs) (BASU et al., 2019; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2013; SCHROEDER; CAVACINE, 2010).

Dentre as Igs de mamíferos, há 5 diferentes classes: Imunoglobulina do tipo M (IgM); Imunoglobulina do tipo do tipo A (IgA); Imunoglobulina do tipo D (IgD); Imunoglobulina do tipo E (IgE) e Imunoglobulina do tipo G (IgG); cada uma delas desempenha uma função específica no sistema imunológico adaptativo (EWERS, 2018; HOLLIGER; HUDSON, 2005). Os anticorpos do tipo IgM, por exemplo, são os primeiros a serem produzidos em uma resposta imune adaptativa, pois podem ser expressos sem a troca de classe. Eles possuem estrutura pentamérica e são especializados em

ativar o complemento eficientemente após a ligação ao antígeno (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2013; SCHROEDER; CAVACINE, 2010).

Já os anticorpos IgA, são sintetizados como monômeros que penetram no sangue e em líquidos extracelulares, ou como moléculas diméricas pelas células plasmáticas na lâmina próprias de vários tecidos de mucosa. Assim, esta Ig está principalmente relacionada a imunidade de mucos e presente nas secreções como colostro, saliva, trato respiratório, gastrointestinal, urinário e genital (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2013; SCHROEDER; CAVACINE, 2010).

Em relação a IgD, este anticorpo está presente na membrana de linfócitos imaturos, mas a sua função quando circulante ainda não é clara, pois é desconhecida a sua participação nos principais mecanismos efetores de anticorpos (SCHROEDER; CAVACINE, 2010). Outra importante e potente imunoglobulina é a IgE, relacionada a hipersensibilidade e reações alérgicas, bem como à resposta a infecções por vermes parasitas. Atualmente o desenvolvimento de anticorpos anti-IgE como terapia para alergia e asma têm sido amplamente utilizados (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2013; SCHROEDER; CAVACINE, 2010).

Dentre os isotipos mencionados, a IgG é a principal classe encontrada no sangue e no líquido extracelular e, tem a meia-vida sérica mais longa de todos os isotipos de imunoglobulina (MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2013; SCHROEDER; CAVACINE, 2010). Por ser predominantemente secretada pelo sistema imunológico dos animais homeotérmicos, é a classe de imunoglobulinas mais estudada e amplamente utilizada como ferramenta para terapêutica e pesquisa em anticorpos (BASU et al., 2019).

Desde o desenvolvimento das técnicas para produção de anticorpos, várias Igs foram desenvolvidas em larga escala usando métodos convencionais. A tecnologia de hibridoma (células obtidas a partir da fusão de mielomas com plasmócitos de animais previamente imunizados com o antígeno alvo) abriu um novo horizonte na produção de anticorpos, pois além dos anticorpos policlonais (pAbs) (produzidos a partir do soro de animais imunizados), pode-se obter anticorpos mais específicos, que secretam normalmente uma IgG de especificidade única, estes denominados monoclonais (mAbs) (BASU et al., 2019; EWERS, 2018; SAEED et al., 2017).

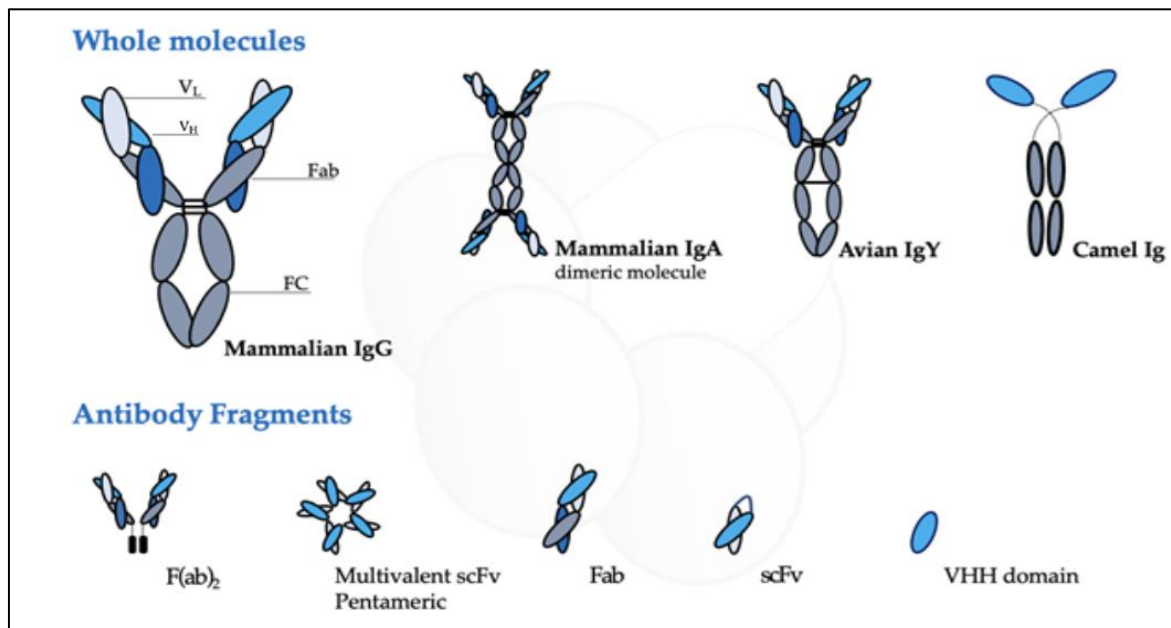
Embora os mAbs apresentem características como homogeneidade, especificidade e produção ilimitada, a tecnologia tradicional de hibridoma tem várias limitações, como ser exclusivamente baseada em murinos, o que, para anticorpos

terapêuticos leva a uma resposta do paciente denominada *Human anti-mouse antibody* – HAMA, também conhecida como doença do soro (HOLLIGER e HUDSON, 2005).

Essa resposta é uma reação de hipersensibilidade do tipo III, na qual os pacientes produzem anticorpos contra proteínas e complexos imunes compostos pelos anticorpos injetados. A resposta HAMA, gera complicações para o paciente devido a formação de complexos imunes que podem se depositar nos vasos sanguíneos, rins e articulações, levando a superprodução de citocinas, inflamação, glomerulonefrite e artrite. Outro efeito deletério dessa resposta é ineficiência do anticorpo administrado, pois este é rapidamente neutralizado por anticorpos de classe IgM e IgG produzidos pelo paciente, devido a grande quantidade de resíduos murinos (BASU et al., 2019; EWERS, 2018; SAEED et al., 2017; BAHARA et al., 2013; HOLLIGER e HUDSON, 2005).

Portanto, para superar essas dificuldades, a tecnologia dos anticorpos recombinante (rAbs) surgiu como o avanço da engenharia genética, tornando possível a síntese de anticorpos por meio de recombinação gênica, permitindo a modificação de características estruturais, funcionais e imunoquímicas dos anticorpos (BASU et al., 2019). Tal manipulação genética, permite manter a especificidade dos mAbs, associado à vantagem de rapidez, baixo custo comparado ao cultivo de hibridomas, produção em larga escala, independência de animais imunizados, bem como controle de seleção de anticorpos, formato, sistema de produção e armazenamento (COSSON; HARTLEY, 2016; BAHARA et al., 2013). Além disso, podem ser projetados para ter uma especificidade única ou múltiplas e em diferentes formatos de acordo com o objetivo proposto (**Figura 4**).

Figura 4 - Representação dos diferentes tipos de fragmentos e derivados de anticorpos recombinantes.



Adaptado de: HENRIQUE *et al.*, 2022.

A sequência genética para obtenção de um fragmento de anticorpo é proveniente de uma molécula de IgG. Essa sequência pode ser obtida de diversas maneiras, como por exemplo de forma totalmente sintética por arranjos artificiais, a partir de hibridomas ou através de bibliotecas sintéticas.

A biblioteca sintética possui características interessantes como a possibilidade de inserção de sequências de arcabouços humanos estáveis, que aumentam a funcionalidade dos anticorpos e diminui o risco de imunogenicidade para propósitos terapêuticos (PERSSON *et al.*, 2013). Além disso, a maioria das bibliotecas sintéticas humanas produzidas se baseiam na randomização das regiões dos CDR3 (mais diversos e responsáveis pelo reconhecimento do antígeno). Também foi demonstrado que, o CDR-L3 desempenha ainda um papel mais importante no reconhecimento do antígeno do que o CDR-H3 (PERSSON *et al.*, 2013).

Assim, a partir de um biblioteca sintética, os fragmentos de anticorpos podem ser obtidos por técnica por *Phage Display* (MCCAFFERTY *et al.*, 1990), uma técnica atualmente muito difundida na pesquisa e desenvolvimento de anticorpos recombinantes, resultando em mais de 80 anticorpos em ensaios clínicos para diferentes doenças (KAPLO; REICHERT, 2019). O seu desenvolvimento foi iniciado em 1985 pelo pesquisador George Smith ao qual descreveu pela primeira vez o uso de *Phage Display* e que mais recentemente, em 2018, levou os pesquisadores George P. Smith e

Sir Gregory P. Winter responsáveis pelos estudos a serem agraciados com o Prêmio Nobel de Química (KAPLON; REICHERT, 2019).

Basicamente, essa técnica possibilita a obtenção de fragmentos de rAbs, com repertórios imunológicos *in vitro*, sem a necessidade de imunização direta de hospedeiros vivos (FRENZEL et al., 2014). Dentre os fagos filamentosos, o bacteriófago M13 é o mais utilizado, formado por uma fita simples de DNA envolta em uma capa proteica constituída de cinco proteínas estruturais (pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX) que utiliza a maquinaria de replicação, transcrição e tradução de bactérias gram-negativas que possuem o pilus F+ para se reproduzir (FRENZEL et al., 2014).

Nesta técnica, o gene de interesse é clonado em um fagemídeo e nele, fusionado a um dos genes codificadores das proteínas estruturais do fago, comumente pIII ou pVIII. Esse fagemídeo é então inserido no fago M13 e quando as partículas do fago são produzidas numa célula de bactéria, a proteína híbrida é incorporada à partícula viral e o DNA do fago contendo o gene fusionado é expresso na superfície viral (FRENZEL et al., 2014), sendo possível gerar rAbs para fins de diagnóstico e terapia.

Dentre os principais fragmentos de anticorpos que podem ser obtidos, destacam-se os de ligação ao antígeno (Fab) e os fragmentos variáveis em cadeia única (scFv). O Fab consiste na porção monomérica inteira de ligação ao antígeno dos anticorpos, ambas domínios leve (V_L) e pesada (V_H) são idênticas, apresentam um domínio constante e são ligadas por pontes dissulfeto (BASU et al., 2019; SAEED et al., 2017; HOLLINGER; HUDSON, 2005). Este fragmento contém três regiões hipervariáveis denominadas regiões de domínio complementar (CDR), responsáveis pela hipervariabilidade e especificidade contra diferentes antígenos (BASU et al., 2019; SAEED et al., 2017). A versatilidade e especificidade dessas moléculas atraem atenção significativa para seu uso como ferramentas terapêuticas.

Já o fragmento de scFv consiste apenas das porções variáveis das cadeias/domínios V_L e V_H dos anticorpos unidos por um ligante polipeptídico sintético, composto por aminoácidos hidrofílicos que conferem flexibilidade a estrutura proteica, como por exemplo, o ligante (GGGS)₃, unindo as extremidades terminais de V_H a V_L , ou vice-versa, dependendo da configuração desejada. Esse ligante polipeptídico pode apresentar tamanho e composição variáveis, prevenindo a dissociação entre os domínios, além de influenciar na estrutura e valência do scFv (BASU et al., 2019; SAEED et al., 2017; HOLLIGER; KENNEDY, 2015; HUDSON, 2005).

Este fragmento de anticorpo também pode ser obtido através de hibridomas. A partir da obtenção do DNA complementar (cDNA) os genes dos domínios variáveis leve e pesado podem ser especificamente amplificados, clonados individualmente, e posteriormente sub-clonados, formando um segmento único de DNA (HORTON et al., 1993). Para formar o segmento único de DNA, unindo os domínios variáveis do scFv, por exemplo, algumas técnicas podem ser utilizadas, incluindo-se a técnica de sobreposição *Splicing by Overlap Extension* – SOE, também chamada de SOEing (HORTON et al., 2013; HORTON et al., 1993).

Este método é baseado na reação por PCR para unir sequências de DNA sem depender de locais de restrição. Para o scFv, partes complementares do ligante polipeptídico são inseridos em cada um dos domínios variáveis e essa sequência complementar, sob condições de PCR, permite que as fitas de dois fragmentos diferentes hibridizem entre si, formando uma sobreposição. A extensão desta sobreposição pela DNA polimerase gera a união desses dois domínios, produzindo uma molécula recombinante (HORTON et al., 2013; HORTON et al., 1993).

Assim, ambos rAbs mencionados, normalmente mantém à especificidade e afinidade de ligação ao antígeno do seu IgG parental, além de demonstrarem melhora na penetração de tumores e tecidos; na farmacocinética; habilidades imunoprotetoras e no reconhecimento epitópico (BASU et al., 2019; SAEED et al., 2017; HOLLIGER; HUDSON, 2005). Para a produção desses fragmentos com alta afinidade, estáveis e com alto rendimento, vários sistemas de expressão, incluindo, leveduras, plantas, células de insetos, mamíferos e principalmente bactérias têm sido utilizados (BASU et al., 2019).

Desta forma, o avanço na engenharia de fragmentos de anticorpos recombinantes pode levar a obtenção de ferramentas mais eficientes para o imunodiagnóstico e terapia diversas doenças, incluindo a ocasionada por ETEC (HOLLIGER e HUDSON, 2005).

1.5. Diagnóstico para ETEC por detecção da toxina LT-I

Ao longo das décadas, diferentes métodos de imunodiagnóstico utilizando mAbs e pAbs foram descritos para a detecção da toxina LT-I, no entanto poucos deles são utilizados em países em desenvolvimento e outros são limitados a pesquisas e estudos epidemiológicos (QADRI et al., 2005). Dentre eles, se destaca o GM1-ELISA, proposto por Svennerholm; Holmgren, (1978) e aprimorado nos estudos de Sack e colaboradores (1980); Ristaino e colaboradores (1983), que demonstrou ótima sensibilidade e especificidade (97% e 100%, respectivamente), sendo o imunoensaio mais difundido e utilizado em estudos epidemiológicos. Um ELISA de captura (cELISA) que utiliza anticorpo pAb e mAb anti-LT (MENEZES et al., 2003; 2006) também foi desenvolvido, proposto como método alternativo ao GM1-ELISA devido ao seu alto custo, demonstrou alta sensibilidade e especificidade (100% e 99%, respectivamente).

Outros métodos também foram desenvolvidos, como o teste Biken (HONDA et al., 1981), ensaio de aglutinação (ITO et al., 1983) e mais recentemente dois testes de fluxo lateral, um preparado manualmente para a detecção da toxina LT de porcos (LTp) (ARIMITSU et al., 2016) e outro no formato captura (composto de um pAb como captura e um mAb anti-LT como detecção) padronizado em larga escala com para detecção de LT-I (HENRIQUE et al., 2018), ao qual demonstrou 99,5% de sensibilidade, 90,7% de especificidade.

De modo geral, todos os principais métodos de imunodiagnóstico desenvolvidos para detecção da toxina LT-I faz o uso de anticorpos, sejam eles mAbs ou pAbs. Com o avanço na tecnologia dos rAbs, se torna possível unir a sensibilidade dos pAbs e a especificidade dos mAbs em uma única molécula recombinante, a fim de gerar anticorpos cada vez mais robustos e aprimorar as técnicas já bem estabelecidas para detecção da toxina LT-I no diagnóstico de ETEC. Além disso, a utilização de anticorpos recombinantes pode trazer vantagens interessantes e importantes tais como a redução de custos e obtenção em larga escala (sem a dependência do cultivo de hibridomas e de animais imunizados (HOLLIGER e HUDSON, 2005), de forma a viabilizar a sua utilização em países em desenvolvimento.

2. JUSTIFICATIVA

O grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan gerou anticorpos recombinantes (OZAKI et al., 2015) a partir dos monoclonais disponíveis (MENEZES et al., 2003, 2006; ROCHA et al., 2013) visando a neutralização da enterotoxina LT-I e o diagnóstico de ETEC (HENRIQUE et al., 2018). No entanto, após estudos realizados, verificou-se que o fragmento de anticorpo scFv-LT gerado tinha sua expressão em corpos de inclusão, sendo necessária realização de etapas de renaturação com altas concentrações de ureia, o que diminuiu o rendimento, assim como a meia-vida e estabilidade das moléculas de anticorpos (OZAKI et al., 2015).

Luz e colaboradores (2015, 2018) geraram scFvs contra as toxinas de Shiga 1 e 2. Nesses trabalhos, os autores constataram que a inversão da orientação do gene para V_L-ligante-V_H, bem como a utilização de um ligante peptídico mais flexível gerou dois anticorpos (scFv-Stx1 e scFv-Stx2) estáveis e funcionais a partir da sequência do IgG produzido parental, obtido pela técnica de hibridoma. O scFv-Stx1 mostrou uma sensibilidade de 88% em reconhecer Stx1 em isolados produtores dessa toxina por aglutinação de látex (LUZ et al., 2018). O scFv-Stx2 apresentou por técnica de ELISA 80% de sensibilidade e 88% de especificidade (LUZ et al., 2015). Esses fragmentos foram validados como promissoras ferramentas para o diagnóstico de STEC por teste rápido de aglutinação em látex, pois esse ensaio mostrou uma correlação direta com o ensaio de citotoxicidade em células Vero, o qual é considerado padrão ouro para a detecção dessas toxinas (SHIGA et al., 2020).

Tais resultados, nos levaram ao uso dessa estratégia para gerar fragmentos de anticorpos scFv contra a toxina LT-I, pois, almeja-se futuramente não mais utilizar os anticorpos policlonais em nossos ensaios imunológicos, bem como utilizá-los futuramente como anticorpos de detecção e captura no teste imunocromatográfico padronizado e avaliado pelo nosso grupo de pesquisa (HENRIQUE et al., 2018). Todavia, este fragmento por ser uma molécula murina, não é a ideal para utilização em terapia. Sendo assim, a geração de um fragmento do tipo Fab humano que tenha a capacidade de neutralizar *in vivo* a toxicidade de LT-I, possibilitará estudos que visem a terapia das intoxicações, dessa forma no futuro poderemos tratar a doença diarreica causada

por ETEC, o que poderá contribuir para a diminuição do impacto socioeconômico gerado por esta patologia.

A partir de uma biblioteca sintética (PERSSON et al., 2013) foram gerados Fabs humanos contra as toxinas Stx1 e Stx2 de STEC por *phage display* que neutralizaram a citotoxicidade dessas potentes citotoxinas *in vitro* e *in vivo* (LUZ et al., 2018; 2021, dados não publicados). Além destes fragmentos, outros dois fragmentos Fab humanos contra a toxina STh de ETEC foram gerados em colaboração com o Dr. Shane Miersch da Universidade de Toronto, que se mostraram específicos no reconhecimento da toxina STh (dados não publicados). Assim, a técnica de seleção de fragmentos Fab humanos por *phage display*, a partir da biblioteca sintética F (PERSSON et al., 2013) bastante utilizada para vários antígenos, mostrou-se efetiva para a seleção de ligantes bacterianos e aumentam as expectativas quanto a seleção de Fab humanos contra a toxina LT-I de ETEC.

Neste cenário, com a obtenção desses fragmentos contra a toxina LT-I se faz necessário uso de modelos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, para a posterior análise do potencial neutralizante dos fragmentos de anticorpos, bem como facilitar estudos com a toxina LT-I. Atualmente as análises *in vitro* para a toxina LT-I são realizadas principalmente em linhagens celulares Y-1, CHO e Caco-2, sendo a Y1 e CHO de origem murina mais comumente utilizadas. No entanto, destas 3 linhagens celulares, a Caco-2 por ser de origem humana e apresentar características morfológicas e funcionais do enterócito maduro, está mais próxima do alvo real da toxina LT-I do que a linhagem adrenal Y1, para análise de ferramentas terapêuticas contra a infecção ocasionada pela toxina LT-I.

Já em relação aos modelos *in vivo*, os modelos murinos são os mais utilizados, ao qual o teste realizado em alça ligada do intestino de coelhos e/ou camundongos recém-nascidos é o mais difundido. No entanto, essa técnica possui limitações importantes e não são viáveis para triagem de biomoléculas e estudos mais sistêmicos com a toxina LT. Assim, nesse cenário de limitação quanto a um modelo *in vivo*, o *zebrafish* aparece como alternativa interessante por ser atualmente muito utilizado em diversos estudos com patógenos bacterianos, bem como utilizado em estudos de neutralização de toxinas por anticorpos específicos.

Dada a relevância da toxina LT-I na infecção, cabe ressaltar que estudos recentes também evidenciam a sua importância para o processo de colonização de ETEC ao epitélio intestinal, observando que embora todos os isolados de ETEC

tenham o potencial de causar diarreia, aqueles que expressam LT podem ter uma vantagem em termos de colonização (ISIDEAN et al., 2011; MUDRAK; KUEHN, 2010; ALLEN; RANDOLPH; FLECKENSTEIN, 2006). Além disso, nos estudos de Isidean e colaboradores (2011) foi revelado que aproximadamente 60% dos isolados de ETEC associados à diarreia humana expressavam LT-I sozinho (27%) ou LT-I com ST (33%); corroborando os estudos realizados anteriormente por Wolf (1997) que também apontou a presença da toxina LT-I em mais da metade de todos os isolados pesquisados de ETEC.

Assim, tais informações evidenciam a importância da toxina LT-I como fator de virulência para ETEC, tanto na sua colonização quanto infecção, causando o quadro de diarreia aquosa. Dessa forma, os estudos de modelo *in vitro* e *in vivo* para LT-I e a geração de rAbs anti-LT possibilitarão solucionar dois importantes aspectos, o diagnóstico precoce e uma terapêutica efetiva para a diarreia causada por cepas de *E. coli* enterotoxigênica, além de colaborar para os estudos sobre mecanismo de ação e patogenicidade dessa tão importante toxina, levando assim aos objetivos do presente trabalho.

3. OBJETIVO

Estabelecer estratégias para geração de dois fragmentos de anticorpos: uma molécula recombinante de cadeia variável única do anticorpo anti-LT (scFv); e um fragmento de ligação ao antígeno (Fab) a partir de uma biblioteca sintética humana, por técnica de *phage display*; bem como avaliar e padronizar as condições necessárias para o uso de células Caco-2 e o *zebrafish* como modelos para estudos da toxina LT-I.

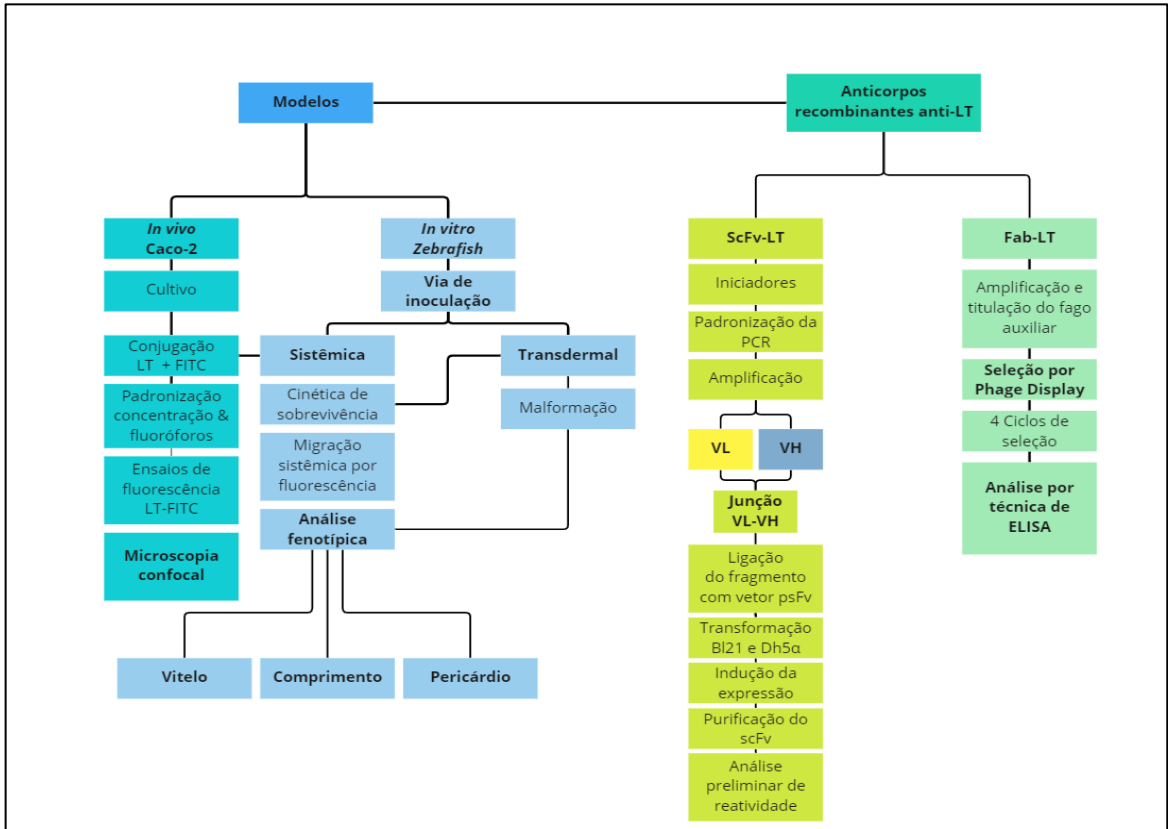
3.1 Delineamento Experimental

Para que os objetivos fossem alcançados definiu-se o seguinte delineamento experimental:

- ✓ Conjugação da toxina LT-I ao fluoróforo;
- ✓ Padronização do uso de células Caco-2 como modelo *in vitro* para estudo da toxina LT-I: definição da densidade celular e concentração da toxina;
- ✓ Análise em *zebrafish* para definição do modelo *in vivo* para estudo da toxina LT-I: analisando os possíveis efeitos citotóxicos e fenotípicos da toxina LT-I neste modelo;
- ✓ Estratégias de clonagem e expressão do anticorpo do tipo scFv-LT: desenho dos iniciadores; liberação do vetor de expressão; padronização das condições de PCR para obtenção dos domínios leve (V_L) e pesado (V_H) do scFv-LT; padronização da PCR para amplificação conjunta dos dois domínios; indução e expressão; purificação e análise da reatividade por técnica de ELISA do scFv-LT gerado.
- ✓ Estabelecimento de uma biblioteca sintética humana para utilização da técnica de *phage display*: amplificação do fago auxiliar; seleção e ciclos de enriquecimento de fago por técnica de ELISA.

As principais etapas do desenvolvimento deste trabalho são resumidas na **Figura 5**.

Figura 5 - Principais etapas de desenvolvimento deste trabalho.



Fonte: HENRIQUE, 2022.

4. MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho, uma das etapas realizadas definiu-se os modelos *in vitro* (Caco-2) e *in vivo* (*zebrafish*). Esses ensaios foram padronizados com o objetivo de utilizá-los em estudos com a toxina LT-I, e em um futuro próximo nos ensaios de neutralização por anticorpos. Dessa forma os resultados obtidos, bem como a descrição dos materiais e métodos foram publicados na revista *Toxins* e são apresentados no ANEXO I.

A seguir, serão apresentados os materiais e métodos relativos à obtenção dos fragmentos de anticorpos recombinantes.

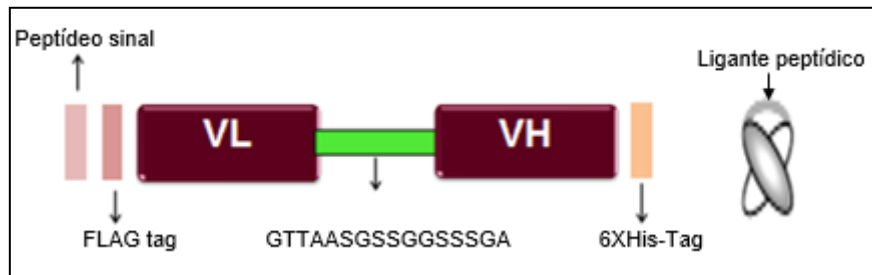
4.1. Toxina LT-I

A toxina LT- I purificada (BOWMAN; CLEMENTS, 2001) foi gentilmente cedida pela Dra. Elizabeth B. Norton do Departamento de Microbiologia e Imunologia, da Universidade de Tulane, New Orleans, Louisiana, Estados Unidos da América.

4.2. Construção do fragmento scFv contra a toxina LT-I (ScFv-LT)

4.2.1. Desenho dos iniciadores

A construção do scFv-LT foi realizada por técnica de PCR e a sequência genética utilizada foi obtida anteriormente por Ozaki e colaboradores (2015). Para realizar a inversão dos domínios do scFv, conforme a **Figura 6**, iniciadores específicos (**Tabela 1**), foram projetados utilizando o alinhamento de múltiplas sequências disponíveis de *eltA* (LT-I) do GenBank (NC_014232, FN649417.1, AP010910, NC_017722) .

Figura 6 - Estrutura idealizada para o fragmento scFv-LT.

Fonte: HENRIQUE, 2022.

Tabela 1 - Desenho dos iniciadores do fragmento scFv-LT.

Nome	Domínio	Sequência	Tm (°C)
scFv LT	V _L fwd	5'CCTATGCATCCGATTAGAAAGATG ACGATGACAAAGCGGTCGATATT GTGCTGACCCA 3'	52,1
	V _L rv	5'CTGCCACCACTACTACCACTAGC GGCAGTAGTAGTACCTTTCAGTTCC AGTTTGGTGC3'	53,6
	V _H fwd	5'GTGGTAGTAGTGGTGGCAGTAGC AGTGGTGCCCGTGAAACTGCAGGA AAG3'	51,4
	V _H v	5'TTGTGGGCCCAGGTAACCGTCG TACCC3'	52

Fonte: HENRIQUE, 2022.

Observação: Em amarelo o sítio para *NsiI* e em vermelho o sítio para *EagI* para clonagem no vetor de expressão pscFv.

Os iniciadores para fragmento scFv-LT foram projetados (LUZ et al., 2015) e sintetizados (Exxtend Biotecnologia Ltda). O programa Geneious (<https://www.geneious.com/>) foi utilizado para determinar a sequência reversa dos domínios V_L e V_H do scFv, ao qual foi adicionado sítio de restrição *NsiI* na extremidade 5' e *EagI* na extremidade 3'. A temperatura de *melting* (T_m) de V_L (Fw e Rv) e V_H (Fw e Rv) foram analisadas pelo *Integrated DNA Technologies* (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

4.2.2. Padronização das condições da PCR: Amplificação dos domínios leve e pesado do scFv-LT por PCR

Para amplificar os domínios leve e pesado do fragmento scFv-LT, padronizou-se as condições da PCR e resolveu-se utilizar os parâmetros iniciais propostos pela fabricante *Platinum® TAQ DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Fisher Scientific). Para cada um dos domínios, utilizou-se 25 ng/mL do gene; 0,5 µM de cada oligonucleotídeos iniciador; tampão da enzima 1 X (Thermo Fisher Scientific); 0,2 mM de

dNTPs (Invitrogen); 1 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen); 2,5 U da enzima polimerase Platinum® TAQ DNA Polymerase High Fidelity e água destilada autoclavada, para um volume final de 25 µL de reação.

As reações de PCR foram realizadas empregando-se um ciclo de desnaturação a 94 °C por 1 min; analisou-se as temperaturas 50, 55 e 60 °C para anelamento dos oligonucleotídeos por 30 s; extensão a 68 °C por 1 min e por fim, 68 °C por 7 min, seguido por 35 ciclos. Posteriormente, analisou-se os amplificadores em gel de agarose 1% corados com GelRed™ (*Uniscience*) 1:50.000. Ao término da corrida, os géis foram fotografados com o auxílio do sistema de imagem *Alphalmager™2200* (*Alpha Innotech*).

4.2.3. Junção dos domínios leve e pesado do scFv-LT por PCR

Para realizar a amplificação conjunta dos dois domínios, leve e pesado, por PCR, as condições padronizadas e os ciclos foram os mesmo do tópico anterior, porém, utilizando-se como molde de DNA da reação de PCR de V_H e da reação de PCR de V_L; 0,5 µM do oligonucleotídeo de V_L (*forward*); 0,5 µM oligonucleotídeo de V_H (*reverse*); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen); tampão da enzima 1 X (Thermo Fisher Scientific); 2,5 U da enzima Q5® *TAQ High-Fidelity DNA Polymerase* (BioLabs) e água destilada estéril por autoclavagem, para um volume final de 25 µL de reação. Após amplificação, as amostras foram analisadas em gel de agarose 1% corados com GelRed™ (*Uniscience*) 1:50.000. Ao término da corrida, os géis foram fotografados com o auxílio do sistema de imagem *Alphalmager™2200* (*Alpha Innotech*).

4.2.4. Ligação do fragmento scFv-LT com o vetor de expressão periplasmático

O vetor de expressão periplasmático foi desenvolvido especialmente para a expressão de fragmentos scFvs, o pscFvHis-MBP (MURASE et al., 2003) cedido pelo Dr. Sachdev Sidhu (Universidade de Toronto). Para sua utilização, o vetor foi transformado (CHUNG, et al., 1989) em cepa *E. coli* K12: DH5α (Stratagene, EUA), onde uma mistura contendo 1 µL de DNA, 2 µL de KCM e 7 µL de água destilada foi incubada no gelo, por 5 min, seguida da adição de 10 µL de células quimiocompetentes. A

amostra foi incubada no gelo por 20 min e em temperatura ambiente por 10 min. Por seguinte, adicionou-se 200 μL de meio LB/Amp¹⁰⁰ (Uniscience) e a amostra foi incubada a 37 °C por 1 h, sob agitação de 200 rpm. Cerca de 10 a 15 μL das bactérias transformantes foram semeadas em placas de LB/Amp¹⁰⁰ e incubadas 37 °C por 18 h.

Para a confirmação da transformação dos vetores nas células competentes, colônias isoladas foram cultivadas e submetidas à extração de DNA plasmidial utilizando o kit “*QIAprep Spin miniprep*” (Qiagen) e sua concentração determinada em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). O vetor foi preparado para a ligação ao fragmento, a partir de reação com enzimas de restrição Nsil (Uniscience, Brasil) e EagI (Uniscience, Brasil) e o inserto foi digerido com as mesmas condições. Para tal, uma mistura contendo 1 μL de cada enzima de restrição, 1 μL de tampão 3.1 NBE, 2 μL de água MilliQ e 5 μL de DNA plasmidial foi incubada por 2 h à temperatura ambiente. Após confirmação da digestão, as bandas correspondentes ao vetor foram cortadas do gel de agarose, eluídas e purificadas pelo kit “*QIAquick Gel Extraction*” (Qiagen). O vetor foi posteriormente quantificado utilizando o aparelho Nanodrop (Thermo Scientific). Tanto o vetor, quanto o inserto precisaram ser digeridos com as mesmas enzimas de restrição (EagI e Nsil) para que as extremidades se tornassem coesivas.

Para a reação de ligação, foi utilizada uma mistura contendo 1 μL da enzima T4 ligase (Invitrogen), 1 μL tampão da enzima (Invitrogen) e a proporção 1:3 (vetor/inserto), a reação foi mantida à temperatura ambiente por 1 h e na sequência a 4 °C por um período de 18 h.

Após esse período, a etapa de transformação (CHUNG et al, 1989) foi realizada em linhagens hospedeiras de *E. coli* por quimiotransformação. Assim, uma mistura contendo 10 μL da reação de ligação e 2 μL de KCM (0,5 M KCl, 0,15 M CaCl₂ e 0,25 M MgCl₂) foi incubada no gelo, por 5 min, seguida da adição de 10 μL de célula de *E. coli* DH5 α (DURFEE et al., 2008) e BL21 (DE3) pLyS (Promega) competentes.

A transformação foi realizada ao mesmo tempo nestas duas linhagens quimio-compentes, para posterior realização de extração de DNA plasmidial e confirmação da clonagem. Em seguida, a incubação em gelo por 20 min e à temperatura ambiente por 10 min foi realizada. Adicionou-se à amostra, 200 μL de meio LB e incubou-se a amostra a 37 °C por 1 h. Por fim, as bactérias transformadas foram semeadas em placas de LB/Amp¹⁰⁰/Km¹⁰ (BL21pLySE) e LB/Amp¹⁰⁰ (DH5 α) incubadas 37 °C por 18 h.

Para a confirmação da transformação dos vetores nas células competentes, foi realizada extração de DNA plasmidial das colônias bacterianas e o DNA foi submetido ao sequenciamento do tipo Sanger, no Laboratório de Bacteriologia e no Centro de Estudos Humano e Células-Tronco da Universidade de São Paulo (USP).

4.2.5. Indução da expressão dos genes dos scFv-LT

Uma colônia bacteriana foi cultivada em 30 mL de meio 2YT/amp¹⁰⁰, a 37 °C por 16-18 h, a 200 rpm. Cerca de 20 mL deste cultivo foram adicionados em 1 L de meio 2YT/amp¹⁰⁰ e incubados a 37 °C, 200 rpm até uma turbidez de 0.6 na absorbância de 600 nm. A cultura foi resfriada a 18 °C por 30 min e o gene foi induzido pela adição de 0,01 M de IPTG (GOLCHIN et al., 2011) seguido de incubação da cultura bacteriana a 18 °C por 18 h, a 200 rpm. A cultura foi centrifugada a 4.000 x g por 20 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento armazenado a -20 °C por 18 h.

4.2.6. Purificação por cromatografia de afinidade do fragmento scFv-LT

O sedimento bacteriano foi ressuspensão em 40 mL de tampão de lise (182 mL de tampão PBS modificado (0,05 M NaH₂PO₄, 0,3 M NaCl pH 8.0; 4% Imidazol 0,04 M); 40 mg lizosima; 1% triton X-100; 1% MgCl₂ 2 M; 1% PIC (PMSF 0,1 M, Benzamida 0,1 M) e 1 µL benzonase) e incubado a 4 °C, por 30 min, sob leve agitação. A amostra foi submetida a lise por ultrassom, no aparelho sonicador (Bandelin Sonopuls, Berlim, Alemanha) com 20% de amplitude, pulsos de 5 s ligado e de 5 s desligado por 2 min e imediatamente resfriadas em gelo. O lisado foi centrifugado a 13.226 x g a 4 °C por 50 min.

Ao sobrenadante foi adicionado 2 mL de micropartículas carregadas com níquel (Ni-NTA 50%) (Qiagen) e incubado a 4 °C, por 1 h, sob leve agitação. A amostra foi centrifugada a 20 xg por 1 min e em seguida, adicionada na coluna, para purificação de forma manual. A coluna foi então lavada 3 vezes com 10 mL de tampão de lavagem (98% PBS modificado e imidazol 0,4 M) e eluída com a adição de 4 mL do tampão de eluição (80% PBS modificado e imidazol 0,25 M). A fração eluída foi quantificada no NanoDrop (Thermo Scientific) e submetida a análise de imunodeteção pela técnica de immunoblotting. As frações coletadas na etapa de purificação também foram

analisadas por immunoblotting, a fim de verificar se haveria anticorpo presente nestas etapas.

4.2.7. Immunoblotting

Um ensaio de imunodeteção (TOWBIN; GORDON, 1979) foi realizado com as frações obtidas nas etapas de purificação (sobrenadante, lavagem e fragmento de anticorpo scFv anti-LT eluido/purificado). Para tal, um gel de poliacrilamida 12% foi realizado com estas frações e a transferência das proteínas realizada para uma membrana de nitrocelulose (GE) utilizando o sistema semi-seco (*Trans-Blot SD semi-dry transfer cell* – BioRad) com tampão de transferência (10% glicina 0,25 M; 10% Tris-Base 2 M; 20% Metanol P.A), a 10 Volts, por 30 min. Em seguida, a membrana foi bloqueada com PBS 0,01 M (NaCl 0,136 M; KCL 0,002 M; Na₂PO₄ 0,008 M; KH₂PO₄ 0,001 M) + albumina de soro bovino (BSA) 1%, lavada três vezes com PBST (PBS 0,01 M + Tween 0,05%), seguido de incubação de 45 min com anticorpo HRP/anti-FLAG (Sigma) conjugado à peroxidase diluído 1:5.000, na mesma solução de bloqueio. Após mais três lavagens da membrana como PBST, a reação de detecção na membrana foi revelada com diaminobenzina (DAB) (Sigma) (15 mL de Tris pH 7,6; 10 mg de DAB e 12 µL de peróxido de hidrogênio). A reação foi interrompida com adição de água destilada.

4.2.8. Imunoensaio enzimático (ELISA) indireto

A reatividade do scFv frente a toxina LT purificada foi analisada por técnica de ELISA indireto (CROWTHER, 2000). Poços da microplaca *MaxisorpTM* (Nunc, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizados com uma concentração de 2µg/mL da toxina LT e com 1% de BSA (controle negativo) em tampão carbonato/bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e mantidos a 37 °C por 2 h. Posteriormente, a microplaca foi lavada por 4 vezes consecutivas com PBST e bloqueadas com 0,5 ou 1% de BSA a 37 °C por 30 min. Em seguida, os poços da microplaca foram lavados e incubados a 37 °C por 60 min com 30 µg/mL do scFv anti-LT. Após nova lavagem com PBST, foi aplicado o anticorpo HRP/anti-FLAG (Sigma) conjugado à peroxidase diluído 1:5.000, na mesma solução de bloqueio e a placa mantida a 37 °C por 45 min. Por fim, a reação foi revelada com

100 µL/poço de TMB (BD) por 15 min, sob agitação, sendo interrompida com 50 µL/poço de H₃PO₄ 1 M. A leitura das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm. A análise de sensibilidade e especificidade foi realizada no programa *GraphPrism* 5.01 empregando-se a curva ROC.

4.2.9. ELISA indireto com cepas bacterianas

Uma análise preliminar foi realizada por técnica de ELISA a fim de analisar a reatividade do scFv frente ao sobrenadante de dez cepas produtoras e cinco não produtoras de toxina LT-I (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Cepas produtoras e não produtoras da toxina LT-I pertencentes a coleção bacteriana do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (IBu), utilizadas no ensaio de ELISA indireto com o scFv-LT.

Cepa	Estirpe	Sorotipo	Toxina expressa	Origem
ETEC	H10407	O78:H11	(LT+ ST+)	Humana
ETEC	36	-	(LT+)	Humana
ETEC	37	O15:H40	(LT+)	Humana
ETEC	39	OR:H-	(LT+)	Humana
ETEC	40	O166:H15	(LT+)	Humana
ETEC	41	OR:H21	(LT+)	Humana
ETEC	44	OR:H19	(LT+)	Humana
ETEC	45	OR:H21	(LT+)	Humana
ETEC	46	ONT:H32	(LT+)	Humana
ETEC	47	OR:H51	(LT+)	Humana
STEC	EPM 27	O111:NM	Stx1	Humana
STEC	EPM 82	O12:H21	Stx2	Animal
aEPEC	86	O76:H19	-	Humana
Salmonella sp	-	-	-	Humana
<i>E. coli</i> não DEC	09	-	-	Humana

Fonte: HENRIQUE, 2022.

O cultivo e o tratamento bacteriano para liberação da toxina LT-I, foram realizados de acordo com Rocha (2012) e Rocha et al. (2013). As cepas foram cultivadas em 3 mL de caldo LB a 37 °C por 16-18 h. Posteriormente, uma diluição de 1:100 dos cultivos bacterianos foi adicionada ao caldo *E. coli* contendo 5 ng/mL de ciprofoxacina e 0,1 mg/mL de lincomicina, e os cultivos foram incubados a 37 °C, 250 rpm, por 6 h. Posteriormente, para a liberação da toxina, o cultivo bacteriano (não centrifugado) foi

submetido ao tratamento com 0,2 mg/mL de polimixina B (*Gilbco by life technologies*). Após incubação a 37 °C por 1 h em agitação, 200 rpm, cada material foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes armazenados a -20 °C até o uso.

Por seguinte, poços da microplaca *Polisorp™* (*Nunc, Rochester, NY, EUA*) foram sensibilizados com o sobrenadante das cepas de ETEC produtoras e não produtoras da toxina LT-I e as etapas seguintes foram realizadas conforme o item 3.2.8.

4.3. Seleção por *phage display* do fragmento Fab anti-LT-I (Fab-LT)

4.3.1. Amplificação do fago auxiliar (M13KO7) para *Phage Display*

4.3.1.1. Expansão e precipitação do fago auxiliar

A linhagem celular de *E. coli* OmniMAX™ 2 T1^R quimiocompetente (com marca de resistência a tetraciclina (tet⁵) por ser resistente a fagos T1 (Invitrogen) foi utilizada nesses experimentos (TONIKIAN et al., 2007). Estas células foram cultivadas em 2 mL meio 2YT contendo 5 µg/mL tet⁵) e incubadas sob agitação a 200 rpm a 37 °C por 6–8 h, até uma densidade ótica de fase logarítmica (600 nm) entre 0,6-1,0. Em seguida, as células foram infectadas com 1:10 de fagos auxiliares M13KO7 (resistente a canamicina (Km)) (Invitrogen) incubado por 30 min a 37 °C. Após o período de infecção, a cultura foi transferida para 500 mL de meio 2YT km⁵⁰ e incubadas a 37 °C por 18 h.

No dia seguinte, o cultivo foi centrifugado a 4.000 x g por 10 min e o sobrenadante para a precipitação dos fagos foi incubado com 125 mL de PEG/NaCl por 20 min em gelo. Em seguida, foram centrifugados a 2.000 x g por 1 min. O sobrenadante foi retirado e os fagos sedimentados foram ressuspensos em 2 mL de PBS gelado e estéril em uma concentração final de 1 x 10¹³ fagos/mL.

4.3.1.2. Titulação do fago auxiliar

Para certificar que, os fagos expandidos estavam na concentração de 1×10^{13} fagos/mL foi realizada a sua titulação para verificar a quantidade de fagos viáveis a serem utilizados na seleção por *phage display*.

Para isso, 1 colônia de OmniMAX™ 2 T1^R foi cultivada em 2 mL meio 2YT/tet5 e incubada sob agitação a 200 rpm a 37 °C por 6–8 h, até uma densidade ótica de fase logarítmica ($D.O_{600nm} < 1.0$). Em seguida, como controle da célula OMNIMAX (que é resistente ao antibiótico tet), um inóculo de 1/100 das células bacterianas foi realizado em três tubos diferentes contendo o meio 2YT e os antibióticos tet⁵, Km⁵⁰ e ampicilina (amp¹⁰⁰) incubadas a 37 °C por 18 h.

Doze diluições seriadas (\log^{10}) do fago auxiliar foram realizadas, este foi diluído em PBS estéril e 10 μ L de cada diluição foi adicionado a 100 μ L da célula OmniMAX™ 2 T1^R, mantidos posteriormente sob agitação por 30 min a 37 °C. Em seguida, foram semeados 5 μ L de cada diluição em três placas de LB ágar, cada uma contendo um dos seguintes antibióticos: tet⁵, Km⁵⁰ e amp¹⁰⁰. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 18 h. Posteriormente, para estimar quantas unidades de colônias foram formadas (UFC) foi realizado o seguinte cálculo: $UFC \times FD$ (fator de diluição) \div Volume aplicado. Para armazenamento de longo prazo, foi adicionado glicerol estéril a uma concentração final de 10% e armazenado a -80 °C. Para uso imediato, uma alíquota foi mantida a 4 °C.

4.3.2. Seleção de fagos contra antígeno imobilizado

Uma placa de 96 poços (Maxisorp) foi sensibilizada com 100 μ L/poço de 5 μ g/mL de toxina LT-I diluída em PBS e incubada a 4 °C, por 18 h. A pré-adsorção de todos os ciclos de enriquecimento da seleção foi realizada com a toxina Stx2, que também apresenta uma estrutura do tipo AB₅, a fim de evitar reatividade cruzada, aumentando a especificidade do Fab selecionado contra a toxina LT-I. Assim, uma outra placa de 96 poços (Maxisorp) foi sensibilizada com 100 μ L/poço de 5 μ g/mL de toxina Stx2 diluída em PBS e incubada a 4 °C, por 18 h.

Um dia antes de todos os ciclos de seleções, as células bacterianas OmniMAX™ 2 T1^R foram cultivadas em 3 mL de LB contendo os antibióticos: tet⁵, Km⁵⁰ e amp¹⁰⁰ a 37 °C a 200 rpm, a fim de realizar o controle das mesmas durante todos os

ciclos de seleção. Além disso, para a etapa de infecção, uma colônia de OmniMAX™ 2 T1^R foi cultivada em 10 mL meio 2YT/tet⁵ e incubada sob agitação a 200 rpm a 37 °C por 6–8 h, até uma densidade ótica de fase logarítmica (D.O._{600nm}) entre 0,6-1,0.

As placas após sensibilização foram bloqueadas com 200 µL/poço de tampão PBS 0,2% (PBS 0,01 M com 0,2% BSA) em temperatura ambiente, por 1 h, sob leve agitação. Durante o bloqueio a biblioteca foi preparada; para isso, 1 mL da biblioteca sintética F (concentração 10¹²) foi adicionada à 9 mL de PBS 0,01 M, seguida da adição de 2,5 mL PEG/NaCl e incubado no gelo, por 20 min. A biblioteca F foi centrifugada a 4 °C, 20 xg por 20 min, e o sobrenadante descartado e por fim, ressuspenso em PBT (PBS 0,01 M com 0,2% BSA e 0,05% Tween 80) (*input*).

Após 1 h em tampão de bloqueio, a placa de pré-adsorção (Stx2) foi lavada 8 vezes com tampão PBT e 100 µL da biblioteca F foi adicionada, incubada 1 h sob agitação. Em seguida, a placa de 96 poços contendo a toxina LT-i foi lavada 4 vezes com PBT e a biblioteca F adsorvida na placa com Stx2 foi transferida para os poços contendo LT-I.

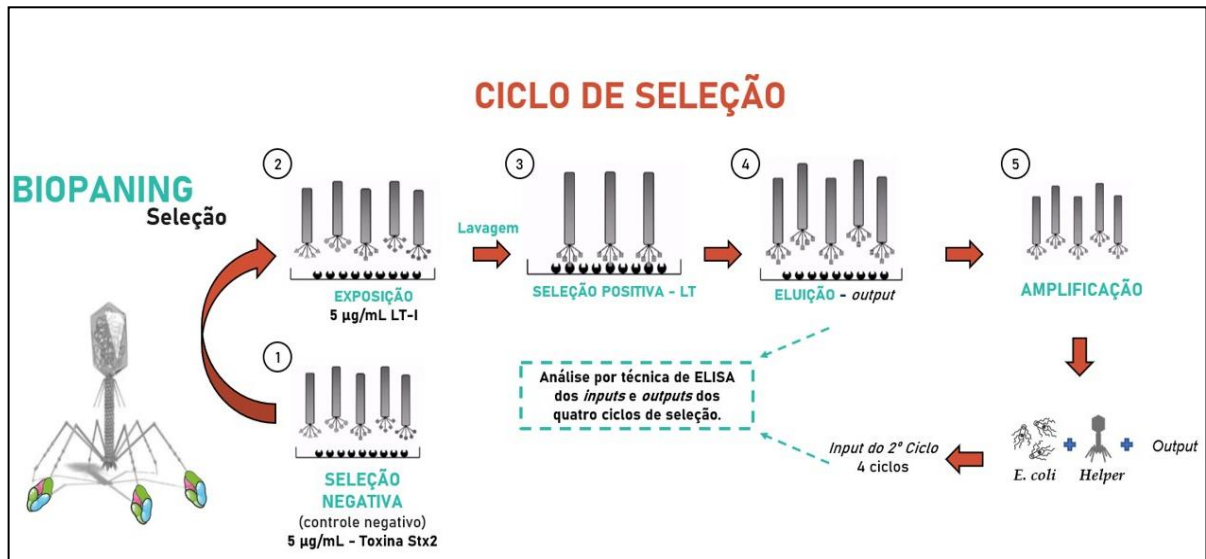
A placa foi mantida por 1 h sob agitação e em seguida, os poços foram lavados 8 vezes com PBT. Os fagos foram eluídos (*output*) com 100 µL de 0,1 M HCL por poço, incubados por 10 min em agitação, seguida da neutralização com 80 µL de Tris 1M pH 11 por poço.

Para determinar o número de fagos eluídos foi realizada uma diluição seriada em log¹⁰ do *output* em meio de cultura 2YT. Em uma nova placa de 96 poços, 90 µL de *E. coli* OmniMAX™ 2 T1^R em fase estacionária (D.O._{600nm} < 1.0) foram adicionados (cultivadas previamente em meio 2YT/tet⁵), juntamente com 10 µL das diluições seriadas do *output*. A placa com a bactéria infectada foi incubada a 37 °C, por 30 min, sob leve agitação. O volume de 5 µL das infecções foram semeados em placas de LB/Km⁵⁰ e LB/amp¹⁰⁰. Concomitantemente, 5 mL da cultura bacteriana foram infectadas com 500 µL do *output* e incubados a 37 °C por 30 min, o fago auxiliar M13K07 (GE) foi adicionado numa proporção 1:1.000, seguido de incubação a 37 °C, por 1 h. Cabe ressaltar que o fago auxiliar é utilizado nesta etapa para fornecer os genes de replicação, montagem do capsídeo e liberação para os fagos que foram selecionados, que possuem o fragmento scFv de interesse, para que haja então, a sua expressão fusionados a proteína pIII.

A cultura foi transferida pra 30 mL de meio fresco 2YT/amp¹⁰⁰/Km⁵⁰, próximo ciclo de seleção. Os ciclos de seleção para enriquecimento foram realizados quatro

vezes. A **Figura 7** exemplifica os passos realizados na seleção do fragmento Fab-LT por técnica de *phage display*.

Figura 7 - Ciclo de seleção do fragmento de anticorpo Fab contra a toxina LT-I, por técnica de *phage display*.



Fonte: HENRIQUE, 2022.

Num processo denominado *Biopanning*, 4 ciclos de enriquecimento foram realizados, seguindo-se as etapas de: **1.** Seleção negativa contra outra toxina de estrutura AB₅ (Stx2), ao qual a biblioteca sintética humana de fagos foi previamente exposta a este antígeno; **2.** Exposição da biblioteca (pré incubada na seleção negativa) a toxina LT-I purificada; **3.** Seleção dos fagos positivos apenas para a toxina LT-I; **4.** Eluição dos fagos selecionados; **5.** Amplificação dos fagos selecionados em células competentes de *E. coli* OmniMAX™ (resistentes ao fago T1) e adição do fago *helper*, para fornecer os genes de replicação, montagem do capsídeo e liberação dos fagos que possuem o fragmento de interesse, para que ocorra a expressão do fragmento contra a toxina LT-I na superfície da proteína estrutura pIII do fago. Quatro ciclos para enriquecimento foram realizados, iniciando-se cada ciclo a partir do *input* do ciclo anterior.

4.3.2.1 Ensaio de ELISA para fagos

Os *inputs* e *outputs* dos ciclos de enriquecimento da seleção foram analisados por técnica de ELISA. Poços da microplaca *Maxisorp*™ (*Nunc, Rochester, NY, EUA*) foram sensibilizados com 2,5 µg/mL das toxinas LT-I ou Stx2, bem como poços sensibilizados apenas com PBS 0,2% (PBS 0,01 M com 0,2% BSA) e mantidos a 37 °C por 2 h. Posteriormente, a microplaca foi lavada por 4 vezes consecutivas com PBST e bloqueadas com PBS 0,2% por 30 min. Em seguida, os poços da microplaca foram lavados e adicionada a diluição de 1:100 dos *inputs* e *outputs* de cada ciclo de enriquecimento da seleção dos fagos, incubados a temperatura ambiente por 1 h.

Após lavagem com PBT, o HRP-anti-M13 conjugado à peroxidase (Sigma) na proporção 1:5.000 em tampão PBS 0,2% foram adicionados e incubados em

temperatura ambiente, por 30 min, sob leve agitação. Por fim, a reação foi revelada com 100 µL/poço de tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma) por 15 min, sob agitação, sendo interrompida com 50 µL/poço de H₃PO₄ 1 M. A leitura das absorvâncias foi realizada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 450 nm.

5. RESULTADOS

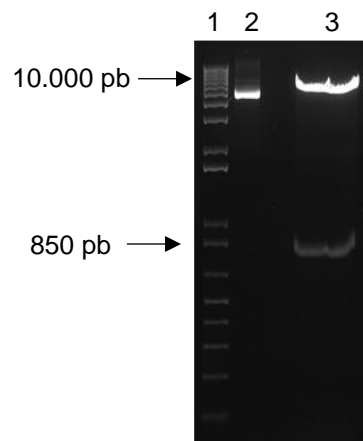
No que concerne a definição dos modelos *in vitro* (Caco-2) e *in vivo* (zebrafish), esses resultados foram analisados e apresentados no manuscrito “Heat-Labile Toxin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causes Systemic Impairment in Zebrafish Model” publicado na revista *Toxins* e estão contidos no ANEXO I. Assim, seguem os resultados referentes a obtenção dos fragmentos de anticorpos recombinantes.

5.1. Fragmento scFv-LT

5.1.1. Vetor de expressão pscFv

O vetor de expressão foi preparado com as enzimas de restrição *NSI* e *EagI*. A clivagem com as enzimas pode ser observado pela amplificação do produto da reação de PCR de 10.000 pb referente ao vetor de expressão pscFvHis-MBP (**Figura 8**). Esse produto foi posteriormente purificado (**Figura 9**), apresentando uma concentração de 150 ng/mL.

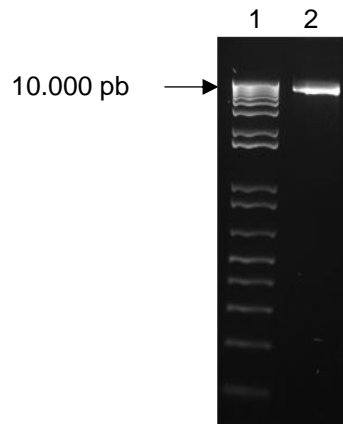
Figura 8 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50.000) da extração DNA plasmidial e reação de restrição para liberação do vetor pscFvHis-MBP.



Fonte: HENRIQUE, 2022.

1. Marcador de peso molecular 1kb Plus. **2.** DNA plasmidial extraído **3.** Vetor *pscFv* com 10,000 pb e o inserto *Stx2* com 850 pb.

Figura 9 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50.000) da extração de DNA plasmidial e purificação do vetor pScFvHis-MBP.



Fonte: HENRIQUE, 2022.

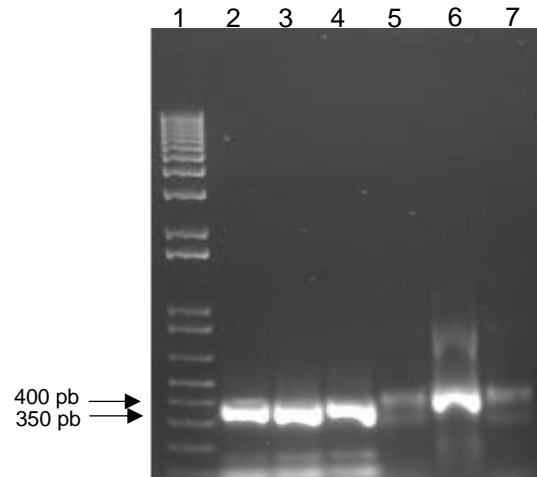
1. Marcador de peso molecular 1kb Plus; 2. Vetor de expressão digerido e purificado.

5.1.2. Junção dos domínios variáveis do scFv-LT

Para padronizar as condições da PCR para amplificação dos domínios V_L e V_H , avaliou-se as temperaturas de anelamento de 50, 55 e 60 °C para ambos os domínios. Das temperaturas avaliadas, as amplificações foram observadas em todas as temperaturas testadas para o domínio V_H (400 pb), mas, para o domínio V_L (350 pb) a melhor temperatura em que ocorreu anelamento foi de 55 °C (**Figura 10**). Dessa forma, essa temperatura foi utilizada em todos os ensaios subsequentes.

Após obtenção dos produtos amplificados referentes aos domínios V_H e V_L , realizou-se a purificação dos mesmos (**Figura 11**).

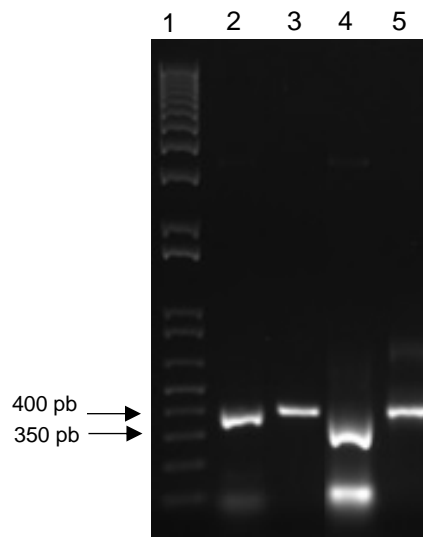
Figura 10 - Perfil eletroforético das amplificações dos domínios VL e VH submetidos a diferentes temperaturas de anelamento, visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed® (1:50000) padronização de VH e VL.



Fonte: HENRIQUE, 2022.

1. Marcador de peso molecular 1kb Plus; **2.** Amplificação por PCR de VH, submetido a temperatura de anelamento de 50°C; **3.** Amplificação por PCR de VH, submetido a temperatura de anelamento de 55°C; **4.** Amplificação por PCR de VH, submetido a temperatura de anelamento de 60°C; **5.** Amplificação por PCR de VL, submetido a temperatura de anelamento de 50°C; **6.** Amplificação por PCR de VL, submetido a temperatura de anelamento de 55°C; **7)** Amplificação por PCR de VL, submetido a temperatura de anelamento de 60°C.

Figura 11 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50000) da purificação dos domínios VH e VL do scFv-LT.



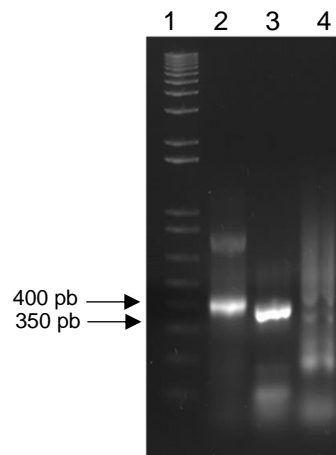
Fonte: HENRIQUE, 2022.

1. Marcador de peso molecular 1kb Plus; **2.** PCR domínio VH **3.** Purificação domínio VH **4.** PCR domínio VL **5.** Purificação domínio VL.

Por seguinte, o sequenciamento do tipo Sanger foi realizado para ambas as ampliações em aproximadamente 400 pb para o domínio V_H e 350 pb para o domínio V_L . Essa análise nos permitiu aferir que, para o domínio V_L *forward* houve uma cobertura de 91% e identidade de 90.4% e para o domínio V_L *reverse*, uma cobertura de 84% e identidade de 99.3%. Para o domínio V_H *forward* a cobertura foi de 95% e identidade de 100%; e para o domínio V_H *reverse* a cobertura foi de 88% e identidade de 99.3%. Desta forma, conclui-se que as ampliações correspondem aos domínios V_L e V_H do scFv-LT.

Para amplificação conjunta dos dois domínios, utilizou-se o iniciador oligonucleotídeo de V_L (*forward*) e oligonucleotídeo de V_H (*reverse*). Ao analisar-se o perfil eletroforético com o do produto de amplificação para a junção dos domínios, esperava-se amplificação entre 600 e 750 pb, no entanto, observou-se um tamanho muito abaixo com o de fragmento amplificado, bem como ampliações inespecíficas (**Figura 12**).

Figura 12 - Perfil eletroforético em agarose 1% corado com GelRed® (1:50000) para a padronização da junção dos domínios V_H e V_L .



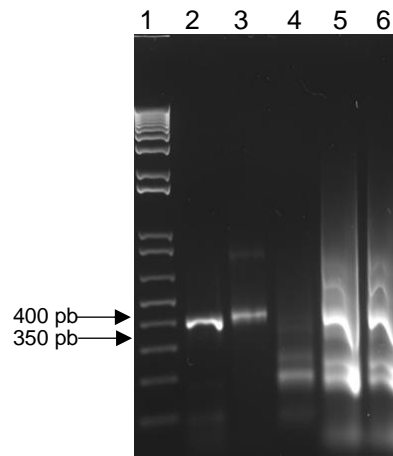
Fonte: HENRIQUE, 2022.

1. Marcador de peso molecular 1kb Plus; **2.** produto de PCR do domínio V_H submetido a uma temperatura de anelamento de 55 °C; **3.** Produto de PCR do domínio V_L , submetido a uma temperatura de anelamento de 55 °C; **4.** Produto de PCR da junção do domínio V_H e V_L , submetido a uma temperatura de anelamento de 55 °C.

A fim de minimizar a formação de estruturas secundárias, avaliou-se a utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 0,75 e 1,5% nas reações de

PCR, no entanto, os resultados se mantiveram (**Figura 13**).

Figura 13 - Perfil eletroforético da amplificação dos domínios V_H , V_L , junção dos domínios sem e com adição de 0,75 e 1,5% de DMSO, visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed® (1:50000).

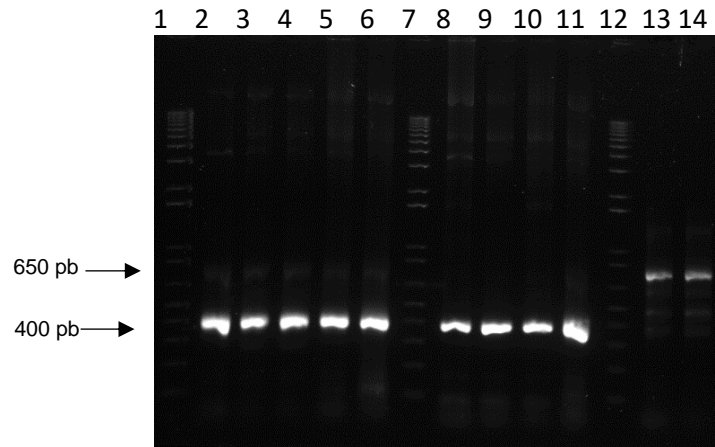


Fonte: HENRIQUE, 2022.

1. Marcador de peso molecular 1kb Plus; **2.** Amplificação por PCR de V_H ; **3.** Amplificação por PCR de V_L ; **4.** Amplificação por PCR da junção dos domínios V_L e V_H ; **5.** Amplificação por PCR da junção de V_L e V_H com adição de 0,75% DMSO; **6.** Amplificação por PCR da junção de V_L e V_H com adição de 1,5% DMSO.

Visando diminuir as inespecificidades, trocou-se a enzima polimerase, dessa forma, utilizou-se a *Q5® TAQ High-Fidelity DNA Polymerase (BioLabs)* tanto na reação de PCR individual dos domínios quanto na junção dos mesmos, utilizando-se as condições padronizadas anteriormente. Os resultados obtidos demonstram amplificações entre 350 e 400 pb dos domínios separados, assim como amplificações de 650 pb, o que sugere a junção dos domínios V_L e V_H (**Figura 14**).

Figura 14 - Perfil eletroforético da amplificação dos domínios VH e VL, bem como a junção dos domínios utilizando a Q5® TAQ *High-Fidelity DNA Polymerase* (BioLabs), visualizados em gel de agarose 1% corado com GelRed® (1:50000).

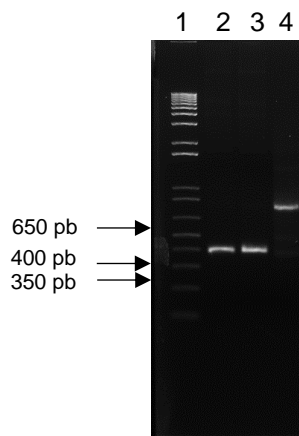


Fonte: HENRIQUE, 2022.

1. Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 2, 3, 4, 5 e 6. Amplificação por PCR do domínio V_H ; 7. Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 8, 9, 10, 11. Amplificação por PCR do domínio V_L ; 12. Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen); 13 e 14. Amplificação por PCR da junção de V_L e V_H .

A amplificação de 650 pb foi purificada (**Figura 15**) e submetida ao sequenciamento do tipo Sanger, as sequências analisadas e as sequências de aminoácidos dos fragmentos foram comparados com as sequências nucleotídicas idealizadas para o scFv-LT.

Figura 15 - Perfil eletroforético da amplificação dos domínios V_H e V_L , bem como a junção dos domínios utilizando a Q5® TAQ *High-Fidelity DNA Polymerase*, submetidos a purificação. Visualização em gel de agarose 1% corado com GelRed® (1:50000).



Fonte: HENRIQUE, 2022.

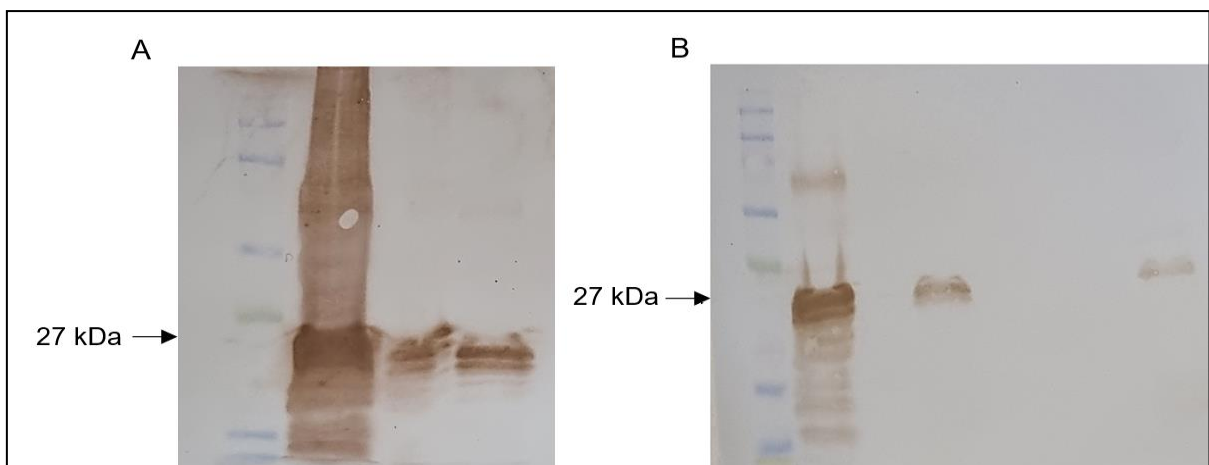
1. Marcador de peso molecular 1kb Plus; 2. Amplificação por PCR do domínio V_H , após purificação; 3. Amplificação por PCR do domínio V_L , após purificação; 4. Amplificação por PCR da junção dos domínios em scFv, após purificação.

Essa análise nos permitiu aferir que, para o domínio V_L *forward* houve 91% de cobertura e 90.4% de identidade e, 84 % de cobertura e 99.3 % de identidade para o domínio V_L *reverse*. Para o domínio V_H *forward* a cobertura foi de 95% e 100% de identidade; e para o domínio V_H *reverse* a cobertura foi de 88% e a identidade de 99.3%. Tais resultados confirmam que os amplificadores correspondem a formação do scFv-LT.

5.1.3 Clonagem, indução e purificação do scFv-LT

O fragmento da junção dos domínios foram inseridos cepas competentes de *E. coli* BL21plyS e DH5 α , e das seis colônias obtidas, somente uma (C4) foi confirmada parcialmente por sequenciamento Sanger. Os genes dessa colônia positiva foram expressos pela indução de 0,01 M de IPTG seguido de purificação de afinidade ao níquel, ao qual a purificação do scFv anti-LT de tamanho de 27 kDa foi confirmada por imunodeteccção (**Figura 16**).

Figura 16 - Frações proteicas da purificação do fragmento scFv-LT. **A)** Imunodeteccção utilizando anticorpo HRP/anti-FLAG. Membrana de nitrocelulose contendo as frações proteicas da purificação do fragmento scFv-LT em coluna de afinidade ao níquel e incubadas com o anticorpo HRP/anti-FLAG conjugado à peroxidase (1:5000).



Fonte: HENRIQUE, 2022.

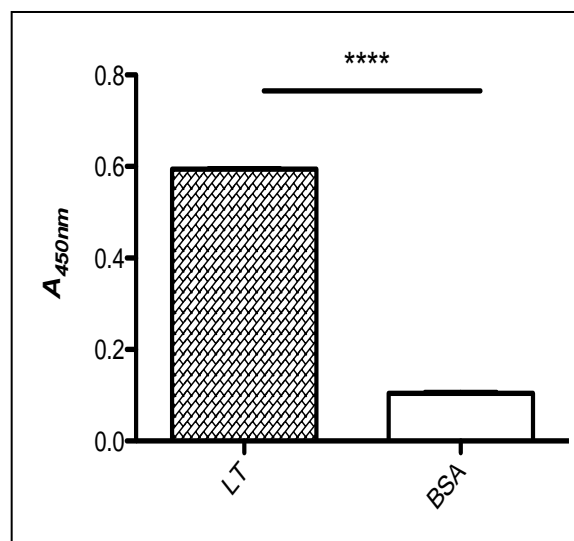
Amostras: **1.** Marcador de peso molecular Kaleidoscope™; **2.** Fração da amostra que não ligou na coluna (volume morto/flow); **3.** Fração coletada após lavagem da coluna do scFv-LT; **4.** scFv-LT purificado; **B)** Nova purificação destas frações. **1.** Marcador de peso molecular Kaleidoscope™; **2.** Fração da amostra que não ligou na coluna (volume morto/flow); **3.** Fração coletada após lavagem da coluna do scFv-LT; **4.** scFv-LT purificado.

Componentes de mobilidade eletroforética relativa de 27 kDa foram observados no volume morto (*flow*), o que nos levou a uma nova purificação desta fração (**Figura 15 B**), dessa forma ao final das duas eluições 2 mg/L de proteína foram obtidas.

5.1.4 Reatividade do scFv-LT

O fragmento de anticorpo scFv-LT purificado reconheceu por técnica de ELISA indireto seu antígeno alvo, a toxina LT e uma baixíssima reatividade foi observada com o controle negativo (**Figura 17**). O resultado das densidades óticas (D.O.) da reatividade com a toxina foram significativamente diferentes da D.O. do controle utilizado ($p < 0.0001$) pelo teste *t* de Student.

Figura 17 - Ensaio de ELISA indireto da reatividade do scFv-LT frente a toxina LT-I purificada (2 µg/mL) e BSA (controle negativo).



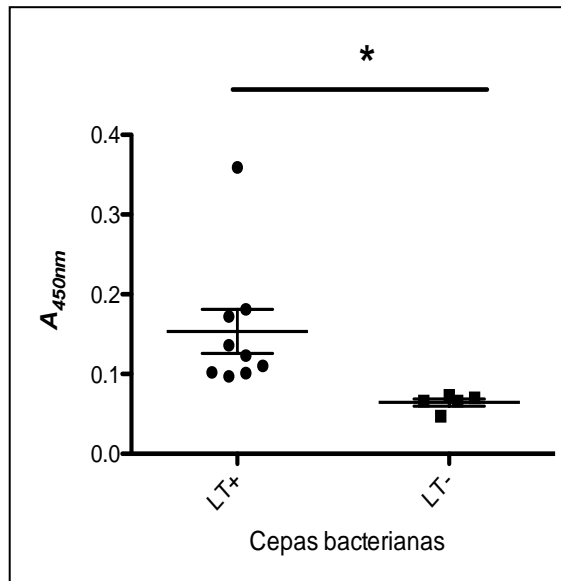
Fonte: HENRIQUE, 2022.

O tampão PBS com 0,5% de BSA foi utilizado como solução de bloqueio e o anticorpo HRP/anti-FLAG conjugado à peroxidase (diluído 1:5.000) utilizado como anticorpo secundário. Como solução reveladora foi utilizado TMB e a leitura foi realizada a 450 nm em leitor de ELISA.

Este fragmento foi testado também por técnica de ELISA indireto frente a cepas bacterianas produtoras e não produtoras da toxina LT-I. Embora um pequeno número de cepas tenham sido testadas, os resultados são consistentes e observa-se uma diferença estatisticamente significativa entre as densidades óticas dos diferentes grupos analisados ($p = 0.0368$). Além disso, as variâncias entre os dois grupos também são significativamente diferentes ($p = 0.0011$) (**Figura 18**). Convém salientar que, quando esses dados foram submetidos a análise de sensibilidade e especificidade

utilizando-se a curva ROC com a D.O. de corte de 0.085 temos uma sensibilidade de 100% (variação de 66,37 a 100%) e uma especificidade também de 100% (variação de 47,82 a 100%).

Figura 18 - Ensaio pela técnica de ELISA indireto da análise preliminar da reatividade do scFv-LT frente ao sobrenadante de cepas produtoras e não produtoras de toxina LT-I.



Fonte: HENRIQUE, 2022.

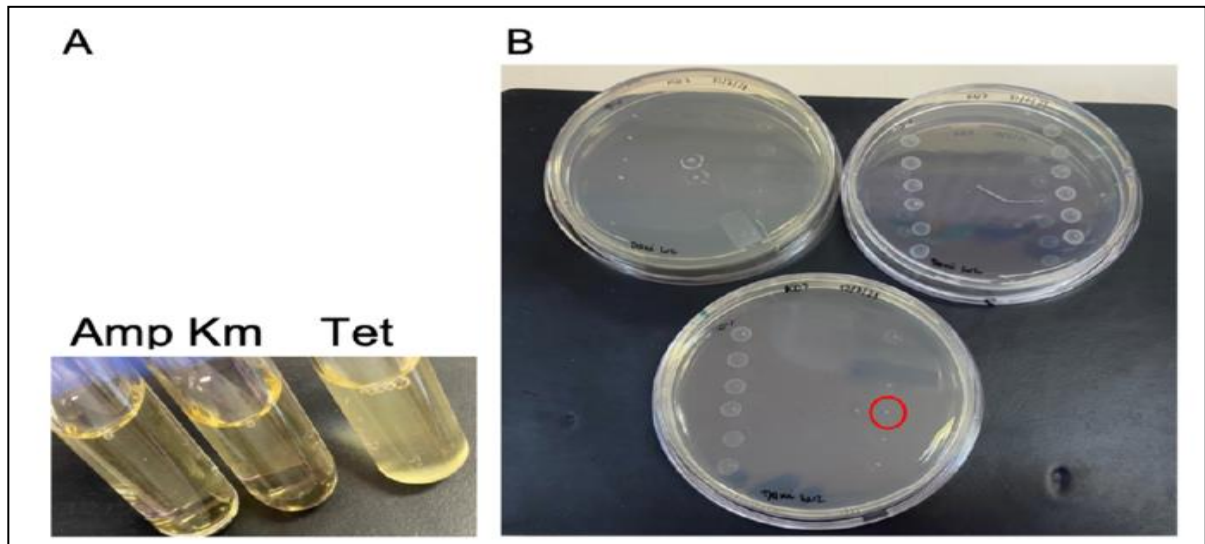
O tampão PBS com 1% de BSA foi utilizado como solução de bloqueio; 30 $\mu\text{g/mL}$ do scFv-LT foi utilizado seguido do anticorpo HRP/anti-FLAG conjugado à peroxidase (diluído 1:5.000). Como solução reveladora foi utilizado TMB e a leitura foi realizada a 450 nm em leitor de ELISA.

5.2 Seleção do fragmento Fab-LT

5.2.1 Fago auxiliar (M13KO7)

As células *E. coli* OmniMAX™ 2 T1^R foram cultivadas, infectadas por 12 diluições do fago auxiliar e plaqueadas ágar semi-sólido. Como mostrado na **Figura 19**, o controle da OmniMAX™ 2 T1^R estava dentro do esperado, apenas com crescimento no antibiótico tetraciclina. Por outro lado, a titulação dos fagos não foi conforme o esperado (1×10^{10} fagos/mL), houve apenas uma colônia na diluição de 10^{-10} , o que resultou numa concentração de 2×10^{12} fagos/mL, menor do o esperado (1×10^{13} fagos/mL). No entanto, essa concentração foi suficiente para utilizar na etapa de seleção.

Figura 19 - Titulação do fago auxiliar. (A) Controle da OMNIMAX nos antibióticos amp¹⁰⁰, Km⁵⁰ e tet⁵. (B) Titulação do fago auxiliar amplificado.



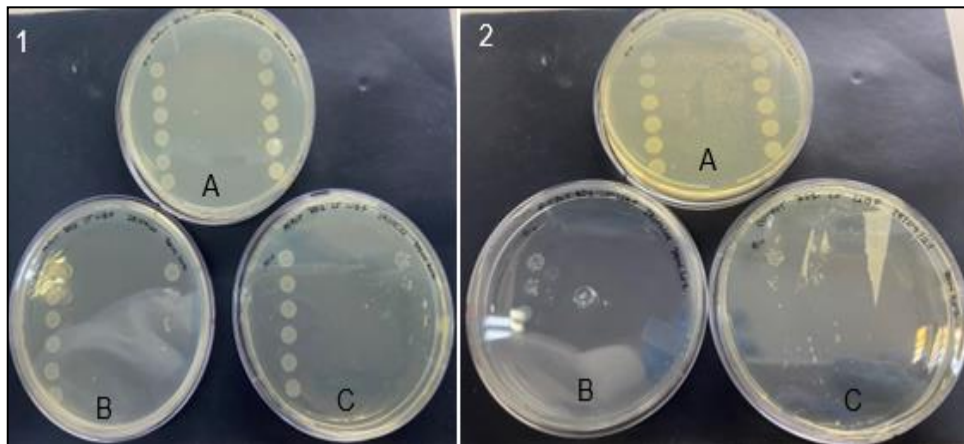
Fonte: HENRIQUE, 2022.

A esquerda, placa de amp¹⁰⁰ mostrando ausência de crescimento (como esperado); Placa a direita, tet⁵ mostrando crescimento em todas as diluições (como esperado); abaixo, a placa de km⁵⁰; o círculo em vermelho aponta a última concentração que foi observada colônia.

5.2.2 Seleção e ciclos de enriquecimento

A seleção do fago contra o antígeno imobilizado utilizando a biblioteca sintética F foi realizada através de ciclos por técnica de ELISA. Uma diluição seriada em log¹⁰ dos *inputs* e *outputs* de cada um dos quatro ciclos de seleção foram cultivados em placas de LB ágar contendo os antibióticos tet⁵, Km⁵⁰ e amp¹⁰⁰, conforme a **Figura 20**, para controle, bem como observar o possível enriquecimento de cada ciclo de seleção.

Figura 20 - Figura representativa da diluição seriada do *input* (1) e *output* (2) do primeiro ciclo de seleção, plaqueados em LBágar com os antibióticos (A) tet⁵; (B) amp¹⁰⁰ e (C) km⁵⁰.

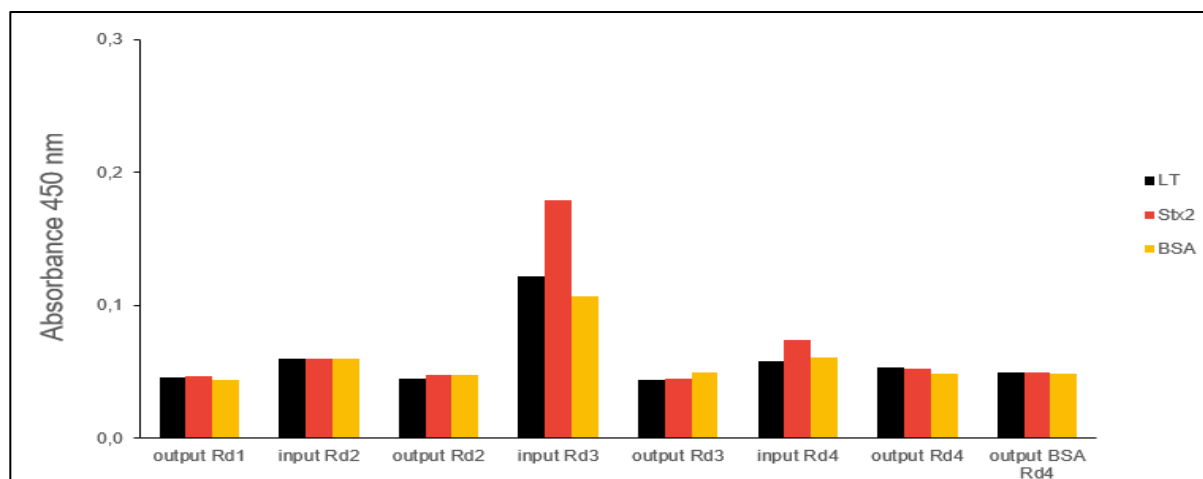


Fonte: HENRIQUE, 2022.

Esta etapa foi realizada nos quatro ciclos, para controle e análise de enriquecimento das seleções. **Fonte:** HENRIQUE, 2022.

Durante as análises dos *inputs* e *outputs* por técnica de ELISA, foi observado que a partir do segundo ciclo de seleção não havia mais enriquecimento (**Figura 21**), bem como não se observou crescimento de colônias na placa de Km⁵⁰.

Figura 21 - Ensaio pela técnica de ELISA para avaliar o enriquecimento dos quatro ciclos de seleção realizados, analisando-se os *inputs* e *outputs* de cada *round* (Rd)/ciclo de seleção.



Fonte: HENRIQUE, 2022.

As placas foram sensibilizadas com 2,5 µg/mL de cada antígeno (LT e/ Stx2); uma diluição de 1:100 dos *inputs* e *outputs* de cada round foi utilizado; e o anticorpo anti-M13 HRP conjugado à peroxidase (diluído 1:5000) foi utilizado como anticorpo secundário. Como solução cromógena foi utilizado TMB (BD) e a leitura foi realizada a 450 nm em leitor de ELISA.

Diante de tais resultados, a técnica de ELISA foi realizada a fim de avaliar a funcionalidade das alíquotas da biblioteca utilizadas para seleção, bem como verificar a presença de partículas virais e fragmentos Fab na seleção contra a toxina LT-I. Para tal, os conjugados a peroxidase anticorpo anti-M13 HRP (detecção da partícula viral) e anticorpo HRP/anti-FLAG (detecção do fragmento Fab) foram utilizados. Nestas análises, os ciclos de seleção apresentaram reatividade apenas com o conjugado M13, o que demonstra a presença de partícula viral, principalmente nos *inputs* dos ciclos de seleção contra LT-I, porém, não apresentaram expressão de Fab na superfície (não reativos ao anticorpo HRP/anti-FLAG) (dados não mostrados); e a biblioteca F amplificada no Brasil não apresentou reatividade nesta técnica de ELISA (dados não mostrados).

6. DISCUSSÃO

Dentre os patótipos de DEC, a ETEC é um dos principais agentes etiológicos bacterianos causadores de diarreia, acometendo principalmente crianças menores de cinco anos de idade e viajantes (FLECKENSTEIN; KUHLMANN, 2020; DUAN et al., 2019). Os aspectos que merecem atenção com relação a esta doença, são o diagnóstico precoce, para o correto tratamento do paciente e controle do surto; e a abordagem terapêutica para a neutralização da toxicidade dos fatores de virulência produzidos por este patógeno. Neste sentido, há a necessidade da geração de anticorpos cada vez mais específicos e de alta afinidade para aplicações, tanto no diagnóstico quanto na terapia de diversas patologias, incluindo-se de ETEC (GENST et al., 2014; SIDHU; FELLOUSE, 2012; HOLLINGER; HUDSON, 2005).

Um exemplo que evidencia a importância dos anticorpos, é a atual corrida mundial por ferramentas terapêuticas e profiláticas contra o vírus SARS-CoV-2, o qual diversos tipos de anticorpos monoclonais, policlonais e recombinantes foram e estão em desenvolvimento pelas indústrias farmacêuticas e centros de pesquisas (CASE et al., 2020; PINTO et al., 2020; ROGERS et al., 2020; SHI et al., 2020; TIAN, et al., 2020; WANG et al., 2020; WU, et al., 2020.)

Deste modo, é notória a importância de gerar-se anticorpos cada vez mais específicos e de alta afinidade para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas e diagnósticas de patologias de grande impacto na saúde mundial, como é o caso do patótipo ETEC.

Neste contexto, e inserido na expertise e resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa frente a obtenção de anticorpos recombinantes (MENEZES et al., 2011; LUZ et al., 2018, 2015; OZAKI et al., 2015) foi planejado um fragmento de anticorpo scFv contra toxina LT-I de ETEC para futura utilização em imunodiagnóstico. Esse tipo de fragmento possui vantagens interessantes para a sua utilização na detecção de antígenos alvo, principalmente por terem a possibilidade de serem expressos em sistemas bacterianos, diminuindo o custo final do produto (AHMAD et al., 2012). Neste âmbito, a sequência genética utilizada para a construção deste scFv-LT foi obtida em trabalhos anteriores (OZAKI et al., 2015), a partir anticorpos monoclonais (MENEZES et al., 2006, 2003) caracterizados por Rocha et al. (2013).

A orientação idealizada para o gene foi V_L-ligante peptídico-V_H, utilizando iniciadores específicos, essa estratégia foi utilizada nos estudos de Luz et al. (2015; 2018) pois essa modificação possibilita que o CDR3 do domínio pesado fique livre para a ligação ao antígeno, já que este CDR parece ser a região mais importante para o reconhecimento do antígeno (ALMAGRO, 2004). Um ligante peptídico flexível (GTTAASGSSGGSSSGA) foi inserido para conectar os domínios V_L e V_H, permitindo a distância correta entre os domínios C-terminal e N-terminal, preservando a flexibilidade da molécula para uma melhor ligação ao antígeno e evitando sua dissociação (OZAKI et al., 2015; KIM et al., 2007). Os ligantes ricos em glicina e serina são mais flexíveis e usualmente mais utilizados para o desenho de scFv por possibilitar giros a ligação ao antígeno (KIM et al., 2007).

O inserto foi clonado em um vetor de expressão específico para a obtenção de fragmentos do tipo scFv, denominado *pScFvHIS-MBP* (MURASE et al., 2003), que foi cedido pelos nossos colaboradores da Universidade de Toronto que o utilizam na obtenção de anticorpos recombinantes. Este vetor possui uma cauda de histidina (6XHis), para a purificação por cromatografia de afinidade ao níquel e uma pequena cauda FLAG® (Sigma), composta por 8 aminoácidos hidrofílicos, que não interfere com a conformação e atividade da proteína fusionada; e propicia de 20 a 200 vezes mais sensibilidade à molécula para ensaios de diagnóstico (MURASE et al., 2003).

A junção dos domínios V_H e V_L foi inserida neste vetor após inúmeras tentativas, onde foram obtidas seis colônias e somente uma (C4) foi confirmada parcialmente por sequenciamento Sanger, resultado da baixa qualidade do sequenciamento (dados não mostrados). Mesmo assim, decidiu-se induzir a expressão num volume de 1 L, pois a expressão do scFv poderia ser confirmado posteriormente por ensaios de imunodeteção, conforme foi evidenciado posteriormente. A linhagem de *E. coli* BL21 foi utilizada como hospedeira, por suas características extremamente bem conhecidas e por ser mais comumente utilizada na produção de proteínas heterólogas pela indústria farmacêutica (PETSCH; ANPACH, 2000).

Assim, o scFv-LT obtido foi expresso e purificado apresentando um rendimento de 2 mg/L de proteína. Em uma primeira análise o scFv-LT mostrou-se reativo ao antígeno alvo. O scFv-LT reconheceu a toxina purificada, e o sobrenadante de cepas bacterianas produtoras da toxina LT-I. Além disso, não demonstrou reatividade cruzada frente ao sobrenadante de duas cepas produtoras de Stx1 e Stx2 (utilizadas como controle negativo), toxinas que também possuem uma estrutura do tipo AB₅.

Cabe aqui ressaltar que as condições da técnica de ELISA deverão ser aprimoradas, com a avaliação de outras concentrações e/ou outros tipos de bloqueio, a fim de melhor padronizar o ensaio. Além disso, este fragmento deverá ser caracterizado futuramente, a fim de possibilitar a sua utilização em testes rápidos, como por exemplo de aglutinação em látex e teste imunocromatográfico/*lateral flow* para o diagnóstico de ETEC, pois buscamos futuramente eliminar a utilização de pAbs em nossos ensaios imunológicos. Embora os pAbs confirmem grande sensibilidade a testes diagnósticos, por exemplo, sua produção é limitada, dependente da utilização de animais imunizados.

Além do fragmento scFv, também foi iniciada a seleção do fragmento Fab de anticorpos humanos contra a toxina LT-I por técnica de *phage display* a partir de uma biblioteca de Fab humana sintética. Atualmente, diversos anticorpos já foram gerados contra diferentes patógenos bacterianos utilizando a tecnologia de *phage display*, como por exemplo para *Streptococcus pneumoniae* (KIM et al., 2018); *Streptococcus mutans* e *sobrinus* (ALAM et al., 2018); *Leptospira* (MOHD ALI et al., 2021); *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (LUZ et al., 2015); *Mycobacterium tuberculosis* (YAN et al., 2020; KAWASAKI et al., 2019; HAMIDON et al., 2018) dentre outros.

Para a obtenção deles via seleção *phage display*, se faz necessária a utilização de bibliotecas de anticorpos. Deste modo, a biblioteca sintética estabelecida nesse trabalho, denominada de F foi construída utilizando como molde um Fab anti-MBP (do inglês "*maltose-binding-proteins*"), com a sequência de um arcabouço humano otimizado e diversificando os três CDR-H e o CDR-L3; e contém 3×10^{10} clones únicos de fagos (PERSSON et al., 2013). Esta biblioteca foi cedida por meio de um acordo de transferência de material (MTA) entre o Instituto Butantan e o Laboratório do Dr. Sachdev Sidhu da Universidade de Toronto (Canadá). Ela chegou ao Brasil via importação em gelo seco e no segundo semestre de 2021, foram iniciados os processos para a sua implementação pela primeira vez no Laboratório de Bacteriologia pela Dra. Daniela Luz.

Como primeira etapa para seleção foi realizada a titulação do fago auxiliar (M13KO7). Este fago possui o restante do genoma viral responsável pela montagem das partículas virais pós replicação do material genético intracelularmente (ROTH et al., 2021; FRENZEL et al., 2014). Ele possibilita a propagação da biblioteca F, visto que ela foi gerada em fagemídeos (vetores que possuem a proteína pIII do fago M13 logo após o sítio múltiplo de clonagem), o que possibilita a execução da expressão de

anticorpos fusionadas a proteína pIII (ROTH et al., 2021; FRENZEL et al., 2014 AHMAD et al, 2012; KNAPPIK et al., 2000).

Os fagos M13 foram obtidos numa concentração menor do que a necessária para cobrir todos os clones da biblioteca; por isso foi necessário amplificar e gerar fagos auxiliares em maior número. Embora a concentração obtida foi menor do que o esperado (1×10^{12} fagos/mL) foi possível seguir com as etapas da seleção. Cabe ressaltar que além do fago auxiliar, outra etapa importante é a utilização de uma linhagem celular bacteriana resistente a fago T1, como a *E. coli* OMNIMAX quimiocompetentes, utilizadas durante todo o processo de seleção, que carregam o genótipo *tonA*, que confere resistência à infecção por fagos T1 e T5 (TONIKIAN et al., 2007).

A seleção contra a toxina LT-I foi realizada com quatro ciclos para enriquecimento, no entanto, por técnica de ELISA não foi observado esse enriquecimento. Frente a tais resultados questionamos se nos ciclos haveria a presença de partículas virais e fragmentos Fab e os resultados observados pela técnica ELISA mostraram que os ciclos de seleção apresentaram reatividade apenas com o conjugado M13, o que demonstra a presença de partícula viral principalmente nos *inputs* dos ciclos de seleção contra LT-I, porém, não evidenciando a expressão de Fab na superfície (dados não mostrados). A ausência de clones na seleção contra LT-I também levantou um questionamento sobre a viabilidade da biblioteca F amplificada. Sua funcionalidade foi analisada por técnica de ELISA a fim de detectar a presença de partícula viral (utilizando-se o conjugado anti-M13 HRP) bem como saber se estavam realizando o *display* correto do anticorpo (com a utilização do anti-FLAG HRP); como controle positivo, foram utilizadas as alíquotas das bibliotecas vindas do Canadá.

Os resultados nos mostraram que a biblioteca F amplificada continha partículas virais, no entanto, não evidenciou a presença de Fab funcional na superfície, diferentemente do observado com as alíquotas vindas do Canadá, utilizadas como o controles positivos, que demonstram-se reativas para os dois conjugados (dados não mostrados).

Tais resultados justifica o não enriquecimento observado na seleção contra LT-I, evidenciando que a biblioteca sintética amplificada no Brasil utilizada não estava funcional, impossibilitando a obtenção de clones. De toda forma, mesmo com o tempo exíguo conseguimos estabelecer o funcionamento da biblioteca F no laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

Além da geração de anticorpos, nosso trabalho teve também como objetivo validar a via LT-I em células Caco-2 e analisar a viabilidade do uso do modelo *zebrafish* para estudos com a toxina LT-I, avaliando-se inicialmente sua sensibilidade frente a toxina LT-I por via transdérmica e, posteriormente a migração sistêmica. Para que futuramente conseguíssemos utilizar tais modelos em nossos estudos com a toxina LT-I, principalmente analisar o potencial neutralizante dos anticorpos anti-LT gerados no presente trabalho.

As células Caco-2 são uma linhagem celular bem estabelecida e utilizada em diversos estudos, incluindo-se com a toxina LT-I. Isto porque essas células expressam a maioria dos transportadores, enzimas metabolizadoras de drogas e receptores epiteliais normais, incluindo o gangliosídeo GM₁ (LEA, 2015; JAHN; BIAZIK, BRAET, 2011), principal receptor da toxina LT-I. Os estudos realizados por Jahn e colaboradores (2011) evidenciaram que a maior expressão desses receptores em células Caco-2 é dependente do aumento do número de passagens de cultura celular.

Assim, no presente trabalho visualizou-se a internalização da toxina LT-FITC por microscopia confocal na 62^a passagem das células. As análises referentes a estes ensaios são descritas no ANEXO I. Em suma, a análise ortogonal corroborou a presença da toxina LT-FITC associada à membrana e núcleo celular. Portanto, fica claro a partir desses estudos que a translocação da toxina da superfície apical para a basolateral da célula epitelial requer endocitose e processamento em um ou mais compartimentos intracelulares, como já descrito em outros trabalhos (GUIDRY et al., 1997; CIEPLAK et al. 1995; LENCER et al., 1995). Nossos resultados corroboraram a viabilidade no uso das células Caco-2 para estudos posteriores, como por exemplo, na análise de neutralização da toxina LT-I por anticorpos.

Ressalta-se que um outro estudo recente, de Hoffmannid e colaboradores (2021) reafirma a viabilidade na utilização de células Caco-2 para estudos com a LT. O estudo propôs um modelo de co-cultura entre as células Caco-2 e células HT29-MTX do tipo caliciforme como modelo funcional do epitélio intestinal humano para estudar os mecanismos da doença induzida pelas toxinas CT e LT, no entanto LT mostrou apenas um aumento na corrente de curto-circuito nas células Caco-2, indicando um aumento da secreção apical de cloreto.

Com relação aos modelos animais, conforme já mencionado, diferentes modelos foram usados para examinar a colonização e patogênese (EVANS et al., 1975; DEAN et al., 1972; DE; BHATTACHARYA; SARKAR, 1956) da doença ou

imunogenicidade e eficácia de vacinas candidatas ETEC (BOLICK et al., 2018; LUIZ et al., 2015; ALLEN et al., 2006; BYRD, CASSELS, 2003; BYRD, MOG, CASSELS, 2003). No entanto, esses modelos não mimetizam adequadamente todo o espectro da doença observada na infecção humana por ETEC e são ainda mais limitados, pois são difíceis de reproduzir ou requerem cirurgia como desfecho.

Para contornar esse viés, apresentamos o modelo *zebrafish* que, possui inúmeras características vantajosas e que pode ser uma importante ferramenta de triagem para biomoléculas terapêuticas, medicamentos, candidatos a vacinas, entre outros. Com isso, aliado aos vários estudos de patologias em larvas e peixes adultos (NAG et al., 2018; RUNFT et al., 2013; VARAS et al., 2017; DEBNATH et al., 2013; SZABADY et al., 2009), bem como estudos específico de fatores de virulência produzidos por bactérias diarreiogênicas, tendo como exemplo os estudos realizados por Saslowsky e colaboradores (2010) com toxina colérica (CT) produzida por *Vibrio cholera*, que ocorria a intoxicação de embriões de *zebrafish* por absorção transdérmica de CT via teste de toxicidade aguda de embrião de peixe (FET), dessa forma no presente trabalho utilizou-se modelo *zebrafish*.

De forma geral, os resultados e análises descritos no ANEXO I, mostram que, os embriões de *zebrafish* apresentaram sensibilidade a diferentes concentrações da toxina LT-I, quando submetidos à absorção transdérmica e, embora a letalidade tenha sido baixa foi observado fenótipos evidentes, principalmente edema na cavidade cardíaca, vítelo, bem como curvatura da espinha e caudal, além de perda na pigmentação das larvas na maior concentração. Dada essa sensibilidade, antes de iniciarmos análises mais precisas com a toxina aplicada diretamente no intestino dos animais, para análises imuno-histoquímicas, decidimos analisar como seria a migração sistêmica da toxina LT-I/FITC. Visto que, LT-I também é descrita como potente adjuvante de mucosa e sistêmico (HU et al., 2014; ALI et al., 2011; CONNELL, 2007; HAJISHENGALLIS et al., 2005).

Em nossos estudos em *zebrafish* foi observada a presença expressiva da toxina LT-I na cavidade cardíaca, vítelo e intestino, visualizada por microscopia de fluorescência. Esses resultados nos levam a sugerir que a toxina LT-I pode ter ação sobre o pericárdio dos animais, causando edema e disfunção cardíaca, e posteriormente com seu deslocamento, poderia atuar sobre os receptores no intestino dos animais, desencadeando distensão da região do vitelo, aumentando-a de volume e comprimindo a região intestinal. A presença de LT-I nestas regiões corrobora os fenótipos

observados devido à sua ação tóxica (tanto no FET quanto no teste de microinjeção) de edema cardíaco, vítelo e região intestinal. Ressalta-se que a absorção transdérmica de LT-I pelo teste FET e a inoculação pela via sistêmica apresentaram fenótipos semelhantes durante o desenvolvimento dos embriões e larvas do *zebrafish*, sugerindo o mesmo tráfego da toxina, independente da sua via de inoculação.

Os efeitos cardiotônicos observados em *zebrafish* trazem novos questionamentos em relação a interação de LT-I com as células que integram o tecido muscular cardíaco, como as células do miocárdio, o que seria de extrema importância avaliar, principalmente em relação a segurança de novas formulações de LT como adjuvante, a fim de investigar se estas poderiam sofrer tropismo para a região cardíaca e gerar possíveis riscos cardiovasculares. Cabe salientar que no modelo *zebrafish*, exceto pela cardiotoxicidade após inoculação sistêmica do LT-I, os demais efeitos descritos em roedores foram observados em nossos estudos, apesar das vias empregadas, a toxicidade da LT-I é semelhante.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho, propôs estabelecer estratégias para geração de dois diferentes de anticorpos recombinantes, um fragmentos scFv e um Fab humano contra a LT-I de ETEC, por duas diferentes metodologias, o primeiro por técnica de PCR a partir da sequência genética de hibridomas previamente obtidos, e o segundo por seleção por *Phage Display*. Assim, foi obtido um promissor fragmento monovalente do tipo scFv-LT, produzido em bactérias, capaz de reconhecer tanto a toxina purificada quanto o sobrenadante de cepas bacterianas produtoras de LT-I. Bem como foi observada a viabilidade para futura seleção de fragmentos de anticorpos do tipo Fab humanos contra LT-I, a partir de uma biblioteca sintética por *Phage Display* implementada no Brasil. Assim, o scFv-LT obtido demonstra ser uma ferramenta promissora para utilização no diagnóstico de surtos causados por cepas de ETEC, assim como um futuro Fab-LT humano selecionado por *phage display*, poderá auxiliar no tratamento da intoxicação causada pela toxina LT-I.

Além destes, podemos afirmar que, os modelos alternativos avaliados no presente trabalho, *in vitro* em células Caco-2 e *in vivo* em *Zebrafish* permitiram-nos validar e corroborar a viabilidade no uso das células Caco-2 para estudos posteriores com a LT-I; e demonstrar características até então não conhecidas da LT-I na sua relação com o hospedeiro em modelo *Zebrafish*. Deste modo, ambos podem servir como modelos alternativos para futuros estudos com a LT-I de ETEC.

REFERÊNCIAS¹

- AHMAD, Z. A. et al. scFv antibody: principles and clinical application. **Clin. and Dev. Immun.**, v. 2012, p.1-15, 2012.
- ALAM, M. K. Synthetic Antigen-Binding Fragments (Fabs) Against *S. Mutans* and *S. Sobrinus* Inhibit Caries Formation. **Sci. Rep.** v.8, n. 1, p. 1-9, 2018.
- ALI, S. et al. Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. **Birt. Defec. Res. Part. Embr.Today. Rev.**, v. 93, p. 115-133, 2011.
- ALLEN, K.P. Importance of heat-labile enterotoxin in colonization of the adult mouse small intestine by human enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Infect. Immun.** v.74, p. 869 - 875, 2006.
- ALMAGRO, J. C. Identification of differences in the specificity-determining residues of antibodies that recognize antigens of different size: implications for the rational design of antibody repertoires. **J. Mol. Rec.** v. 17, n. 2, p. 132-143, 2004.
- ARAMITSU, H; SASAKI, K. TSUJI, T. Development of a Simple and Rapid Diagnosis Method for Edema Disease to Specifically Detect Stx2e Protein by Immunochromatographic Test. **Microbiol. Immun.** v. 60, n. 5, p. 334-342, 2016.
- BAHARA K. G. B. et al. A fold-back single-chain diabody format enhances the bioactivity of an anti-monkey CD3 recombinant diphtheria toxin-based immunotoxin. **Prot. Eng., Des. & Selec.**, v.20, n.9, p. 425-432, 2007.
- BAHARA, N. et al. Phage display antibodies for diagnostic applications. **Biologic.**, v. 41, n. 4, p. 209-216, 2013.
- BAILONE, R. L. et al. Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. **Lab. Anim. Res.**, v. 36, p. 1-10, 2020.
- BAMBINO, K.; CHU, J. Zebrafish in Toxicology and Environmental Health. **Curr. Top. Dev. Biol.** v.124, p. 331-367, 2017.
- BAUCHE, J. C.; DUPONT, H. L. New Developments in Traveler's Diarrhea. **Gast. Hepatol.** v. 7, n. 2, p. 88-95, 2011.
- BASU, K. et al. Why recombinant antibodies benefits and applications. **Curr. Op. Biotech.** v. 60, p. 153-158, 2019.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

- BASU, S.; SACHIDANANDAN, C. Zebrafish: A Multifaceted Tool for Chemical Biologists. **Chem. Rev.**, v. 113, p. 7952-7980, 2013.
- BERENSON, C. S. et al. D. Ganglioside-binding specificities of *E.coli* enterotoxin LT-IIc: Importance of long-chain fatty acyl ceramide. **Glycobiol.**, v. 23, n. 1, p. 23-31, 2013.
- BOLICK, D. T. et al. The critical role of zinc in a new murine model of Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) diarrhea. **Infect. Immun.** v.86, p.183-18, 2018.
- BOWMAN, C. C.; CLEMENTS, J. D. Differential Biological and Adjuvant Activities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Hybrids. **Infect. Immun.** v. 69, p. 1528–1535, 2001.
- BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Osw. C.**, v. 102, p. 839-844, 2007.
- BYRD, W.; CASSELS, F. J. Mucosal immunization of BALB/c mice using enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors CFA/I and CS6 administered with and without a mutant heat-labile enterotoxin. **Vacc.** v.21, p. 1884–1893, 2003.
- BYRD, W. et al. Pathogenicity and immune response measured in mice following intranasal challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli* strains H10407 and B7A. **Infect. Immun.** v.71, p. 13–21, 2003.
- CASE, J. B. et al. Neutralizing antibody and soluble ACE2 inhibition of a replication-competent VSV SARS-CoV-2 and a clinical isolate of SARS-CoV-2. **BioRxiv**, v. 1, 1-34, 2020.
- CIEPLAK, W. et al. Role of a potential endoplasmic reticulum retention sequence (RDEL) and the Golgi complex in the cytotoxic activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Mol. Microbiol.** v. 16, p. 789 - 800, 1995.
- CONNELL, T. D. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by Type I and Type II heat-labile enterotoxins. **Expert. Rev. Vacc.**, v. 6, p. 821–834, 2007.
- COSSON, P.; HARTLEY, O. Recombinant Antibodies for Academia: A Practical Approach. **Chim. (Aarau)**, v. 70, n. 12, p. 893-7, 2016.
- CHUNG, C. T. et al. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 86, p. 2172-2175, 1989.
- CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Ver.** v.26, n.4, p. 822–880, 2013.
- CROWTHER, J. R. The ELISA guidebook. **Meth. Mol. Biol.**, v. 149, p. 1–415, 2000.

- DAHM, R.; GEISLER, R. Learning from Small Fry: The *Zebrafish* as a Genetic Model Organism for Aquaculture Fish Species. **Mar. Biotechnol.**, v. 8, p. 329–345, 2006.
- DE, S.N. et al. A study of the pathogenicity of strains of bacterium coli from acute and chronic enteritis. **The J. Pat. and Bact.** v.71, n.1, p. 201–209, 1956.
- DEAN, A. G. et al. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.** v. 125: 407-411, 1972.
- DEBNATH, I. et al. The Cpx Stress Response System Potentiates the Fitness and Virulence of *Uropathogenic Escherichia coli*. **Infect. and Immun.**, v. 81, n. 5, p. 1450–1459, 2013.
- DONTA, S. T. et al. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. **Sci.**, v. 183, p. 334-336, 1974.
- DUAN, Q. et al. Review of Newly Identified Functions Associated With the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Front. in Cel. and Infec. Microbiol.** v. 9, n. 292, p. 1-11, 2019.
- DUBREUIL, J. D. Antibacterial and Antidiarrheal Activities of Plant Products against Enterotoxinogenic *Escherichia coli*. **Tox.** v. 11, n. 5, p. 2009-2041, 2013.
- DUBREUIL, J. D. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. **Curr. Issues Mol. Biol.** v. 14, p. 71-82, 2012.
- DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.7, p.2597-2606, 2008.
- EVANS, D. G. et al. Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v.7, n.9, p. 873-880, 1973.
- EVANS, D.G. et al. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* Enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.**, v.12, p. 656-667, 1975.
- EWERS. H. Open-source recombinant monoclonal secondary nanobodies. **J. Cell. Biol.**, v. 217, n. 3, p. 809–811, 2018.
- FAN, E. et al. Structural biology and structure-based inhibitor design of cholera toxin and heat-labile enterotoxin. **J. Med. Microbiol.** v. 294, n. 4, p. 217-223, 2004.
- FEDOR, A.; BOJANOWSKI, I.; KORZENIEWSKI, K. Gastrointestinal infections in returned travelers. **Int. Marit. Health.** v.70, n. 4, p. 244-251, 2019.
- FERNANDES, B. H. V. et al. Toxicity of spike fragments SARS-CoV-2 S protein for zebrafish: A tool to study its hazardous for human health? **Sci. Tot. Environ.** v. 813, p. 1 - 12, 2021.

- FONTANA, B. D. et al. The developing utility of zebrafish models of neurological And neuropsychiatric disorders: A critical review. **Exp. Neurol.** v.299, p. 157-171, 2018.
- FUKUTA, S. et al. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-1, LT-IIa, and LT-IIb. **Infect. Immun.**, v. 56, n. 7, p. 1748-1753, 1988.
- FLECKENSTEIN, J. M.; KUHLMANN, M. *Enterotoxigenic Escherichia coli* Infections. **Curr. Infect. Dis. Rep.** v. 21, n. 3, p. 1-16, 2020.
- FLECKENSTEIN, J. M. et al. Identification of a two-partner secretion locus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** v. 74, n. 4, p. 1-11, 2006.
- FRENZEL, A. et al. Construction of Human Antibody Gene Libraries and Selection of Antibodies by Phage Display. **Hum. Mono. Anti. Met. in Mol. Biol.**, v.2014, n.1060, p.215-243, 2014.
- GENST, D. E. et al. Antibodies and protein misfolding: From structural research tools to therapeutic strategies. **Bioch. et Biophys. Acta**, v.1844, n.11, p.1907–1919, 2014.
- GILL, D. M. et al. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 677-682, 1981.
- GOLCHIN, M. et al. Latex Agglutination Test Based on Single-Chain Fv Recombinant Antibody Fragment. **Bas. Immun.**, v. 75, p. 38 - 45, 2011.
- GHANY, M. A. E. et al. Functional analysis of colonization factor antigen I positive enterotoxigenic *Escherichia coli* identifies genes implicated in water and host colonization survival. **Microbiol. Genom.** v.7, n.6, p.1–13, 2021.
- GREEN, B. A. et al. Evidence that a new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eukaryotic target cells is not plasmid mediated. **Infect. Immun.**, v. 41, n. 1, p. 383-390, 1983.
- GUIDRY, J. J. et al. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 4943 – 4950, 1997.
- GUERRANT, R. L. et al. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 10, p. 320-327, 1974.
- HAMIDON, N. H. et al. Immune TB Antibody Phage Display Library as a Tool To Study B Cell Immunity in TB Infections. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v.184, p. 852 - 868, 2018.
- HARRIS, J. A. et al. Directed evaluation of enterotoxigenic *Escherichia coli* auto-transporter proteins as putative vaccine candidates. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** v. 5, n. 12, p. 1-11, 2011.

HENRIQUE, C. et al. Large-scale evaluation of a rapid diagnostic test for diarrhea caused by *enterotoxigenic Escherichia coli* targeting the heat-labile toxin. **J. Microbiol. Meth.** v. 144, p. 125-127, 2018.

HENRIQUE, I. M. et al. Therapeutic antibodies against Shiga toxins: trends and perspectives. **Front. Cell. And Infec. Microbiol.** p. 1-33, 2022.

HOFFMANN, P. et al. Caco-2/HT29-MTX co-cultured cells as a model for studying physiological properties and toxin-induced effects on intestinal cells. **PLoS One.** v. 16, n. 10, p. 1 – 19, 2021.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat. Biotech.**, v.23, n.9, p.1126-1136, 2005.

HONDA, T.; TAGA, S.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 13, p. 1-5, 1981.

HORTON, R. M. et al. Gene Splicing by Overlap Extension: Tailor-Made Genes Using the Polymerase Chain Reaction. **Bio. Techn.** v.23, n.9, p.129 -132, 2013.

HORSTMAN, A. L.; KUEHN, M. J. Bacterial surface association of heat-labile enterotoxin through lipopolysaccharide after secretion via the general secretory pathway. **J. Biol. Chem.** v. 277, n. 33, p. 2 - 20, 2002.

HORSTMAN, A. L.; KUEHN, M. J. *Enterotoxigenic Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. **J. Biol. Chem.** v. 275, n. 17, p.1 - 24, 2000.

HORTON, R. M. et al. Gene Splicing by Overlap Extension. **Meth. Enz.** v. 217, n. 270, p. 363 - 372, 1993.

HU, J. C. et al. Intradermal Administration of the Type II Heat-Labile Enterotoxins LT-IIb and LT-IIc of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Enhances Humoral and CD8⁺ T Cell Immunity to a Co-Administered Antigen. **PLoS One.** v. 9, n. 12, p. 1 - 18, 2014.

ITO, T.; KUWAHARA, S.; YOKOTA, T. Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 7-12, 1983.

ISIDEAN, S.D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vac.** v. 29, p. 6167– 6178, 2011.

JAHN, K. A.; BIAZIK, J. M.; BRAET, F. GM1 Expression in Caco-2 Cells: Characterisation of a Fundamental Passage-dependent Transformation of a Cell Line. **J. Pharm. Sci.** v.100, p. 3751–3762, 2011.

JESSER, K. J.; LEVY, K. Updates on defining and detecting diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Curr. Opin. Infect. Dis.** v. 33, n. 5, p. 372-380, 2020.

JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. Etiology of travellers' diarrhea. **J. Travel Med.** v.1, n. 24, p. 1- 4, 2017.

KANSAL, R. et al. Transcriptional modulation of enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence genes in response to epithelial cell interactions. **Infect. Immun.** v.81, n. 1, p. 259 - 270, 2013.

KAPLON, H.; REICHERT, J. M. Antibodies to watch in 2019. **MAbs.**, v. 11, n. 2, p. 219-38, 2019.

KAVALIAUSKIS, A. et al. Protective effect of a recombinant VHSV-G vaccine using poly(I:C) loaded nanoparticles as an adjuvant in zebrafish (*Danio rerio*) infection model. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 61, p. 248 - 257, 2016.

KAWASAKI, M. et al. Lipoarabinomannan in Sputum to Detect Bacterial Load and Treatment Response in Patients With Pulmonary Tuberculosis: Analytic Validation and Evaluation in Two Cohorts. **PLoS Med.** v.16, n. 4, p. 1 - 20, 2019.

KNAPPIK, A., et al. Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks and CDRs Randomized With Trinucleotides. **J. Mol. Biol.** v. 296, p. 57–86, 2000.

KIM, D. et al. (2018). Molecular Characterization of Single-Chain Antibody Variable Fragments (scFv) Specific to Pep27 From *Streptococcus Pneumoniae*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 501, p. 718–723, 2018.

KIMMEL, C.B. et al. Stages of embryonic development of the *zebrafish*. **Dev. Dyn.**, v. 203, p. 253 - 310, 1995.

KOTLOFF, K.L. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, p 1-14, 2013.

KUMAR, P. et al. EatA, an Immunogenic Protective Antigen of *Enterotoxigenic Escherichia coli*, Degrades Intestinal Mucin. **Infect. Immun.** v. 82, n. 2, p. 500-508, 2014.

KLIPSTEIN, F. A. Protection in rats immunized with *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. **Infect. Immun.** 34, p. 637–639, 1981.

LÄÄVERI, T. et al. A. Prospective study of pathogens in asymptomatic travellers and those with diarrhoea: a etiological agents revisited. **Clin. Microbiol.Infec.** v. 22, n. 6, p. 535-541, 2016.

LANGHEINRICH, U. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. **BioE.** v. 25, p. 904 - 912, 2003.

LASARO, M. A. et al. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Immun. Med. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 123-31, 2006.

LEA, T. Caco-2 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vivo and Ex Vivo Models*, 1st ed.; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; **Springer Open**: New York, NY, USA, p. 103–111, 2015.

LENCER, W.I. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, p. 10094 - 10098, 1995.

LIU, X. et al. Efficacy of chitosan oligosaccharide as aquatic adjuvant administered with a formalin-inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine. **Fish. Shell. Immunol.**, v. 47, p. 855–860, 2015.

LIMA, A. A. M. Etiology and severity of diarrheal diseases in infants at the semiarid region of Brazil: A case control study. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** v. 13, n. 2, p. 1-14, 2019.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nat. Rev. Genet.**, v. 8, p. 353–367, 2007.

LOPES, L. M. et al. Inhibition of T-cell Response by *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin-Treated Epithelial. **Cells. Infect. Immun.** v. 68, p. 6891–6895, 2000.

LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **Infect. Dis.**, v. 8, n. 13, p. 2-6, 2013.

LUIZ, W. B. et al. Maternal Vaccination with a Fimbrial Tip Adhesin and Passive Protection of Neonatal Mice against Lethal Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Challenge. **Infect. Immun.** v. 83, p. 4555 - 4564, 2015.

LUZ, D. H. C. et al. Development and characterization of recombinant antibody fragments that recognize and neutralize *in vitro* Stx2 toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **PLoS ONE.** v. 10, n. 3, p. 1-15, 2015.

LUZ, D. H. C. et al. Structural Changes in Stx1 Engineering Monoclonal Antibody Improves Its Functionality as Diagnostic Tool for a Rapid Latex Agglutination Test. **Anti. (Basel).**, v.7, n.9, p 1-9, 2018.

MARTINEZ, M. B. ; TRABULSI, L.R. Enterobacteriaceae. In :TRABULSI, L.R. ; AL-TERTHUM, F. **Microbiol.** São Paulo: Atheneu, 2008. p. 271-279.

MEIJER, A. H. et al. Transcriptome profiling of adult zebrafish at the late stage of chronic tuberculosis due to *Mycobacterium marinum* infection. **Molecular Immunology.** v. 42, p. 1185-1203, 2005.

MELO, B. D. S. et al. Zebrafish embryo sensitivity test as in vivo platform to antiShiga toxin compound screening. **Braz. J. Microbiol.** v. 51, p. 1021–1027, 2020.

MENEZES, C. A. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz. J. Micro.**, v. 34, p. 11-13, 2003.

- MENEZES, C. A. et al. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 101, n. 875-880, 2006.
- MIRHOSEINI, A.; AMANI, J.; NAZARIAN, S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. **Microb. Pathog.** v.117, p.162-169, 2018.
- MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.
- MOHD ALI, M. R. Development of Monoclonal Antibodies Against Recombinant LipL21 Protein of Pathogenic *Leptospira* Through Phage Display Technology. **Int. J. Biol. Macromol.** v.168, p. 289 - 300, 2021.
- MUDRAK, B.; KUEHN, M. J. Heat-Labile Enterotoxin: Beyond G M1 Binding. **Tox.**, v.2, n.6, p.1445–1470, 2010.
- MURASE, K. et al. **Chem. & Biol.**, v.10, n.2, p.161-168, 2.
- MUSON, G.P. Virulence regulons of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Immun. Res.**, v. 57, p. 229-236, 2013.
- MUPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MCCAFFERTY, J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nat.**, v.348, n.6301, p.552-554, 1990.
- NAG, D. et al. Glucose metabolism by *Escherichia coli* inhibits *Vibrio cholerae* intestinal colonization of zebrafish. **Infect. Immun.** v. 86, n.12, p. 486-18. 2018.
- NAG, D. et al. Quantifying *Vibrio cholerae* Colonization and Diarrhea in the Adult Zebrafish Model. **J. of Vis. Exp.**, v. 137, p. 1-7, 2018.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n.1, p. 142-201, 1998.
- NAWAR, H. F. et al. LT-IIc, a new member of the Type II heat-Labile enterotoxin Family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian Host. **Infec. Immun.**, v. 78, n. 11, p. 4705-4713, 2010.
- NEELY, M.N.; PFEIFER, J. D.; CAPARON, M. Streptococcus-Zebrafish Model of Bacterial Pathogenesis. **Infec. Immun.** v.70, n. 7, p. 3904-3914, 2002.
- NUNES, M. R. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil: distribution of enterotoxin and colonization factor genes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 111, n. 1, p. 224-232, 2011.

- OCHI, S. et al. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. **DNA. Res.**, v. 16, n. 5, p. 299-309, 2009.
- ODUMOSU, O. et al. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. **Tox.**, v. 2, n. 7, p. 1612-1645, 2010.
- ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.
- OZAKI, C.Y, et al. Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* Against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic *E. coli*. **PLoS One**, v.10, n. 7, p. 1-15, 2015.
- PERSSON, H. et al. CDR-H3 diversity is not required for antigen recognition by synthetic antibodies. **J. of Mol Biol.**, v.425, n.4, p. 803-811, 2013.
- PICKETT, C. L. et al. Genetics of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: operon fusions, nucleotide sequence, and hybridization studies. **J. Bac.**, v. 169, n.11, p. 5180-5187, 1987.
- PINTO, D. et al. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV Antibody. **Nat.** v.18, n. 4, p. 1-22, 2020.
- RASKO, D. A. et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. **J. Bacteriol.** v.190, p.6881–6893, 2008.
- RISTAINO, P.A.; LEVINE, M. M.; YOUNG, C. R. Improved GM1-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.** v.18, n. 4, p. 808-815, 1983.
- QADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.
- ROCHA, L. B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).** 2012. 180 f. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ROGERS, T. F. et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing Antibodies and protection from disease in a small animal model. **Sci.** v.10, n. 1126, p. 1-13, 2020.
- ROTH, K. D. R. et al. Developing Recombinant Antibodies by Phage Display Against Infectious Diseases and Toxins for Diagnostics and Therapy. **Front Cell. Infect. Microbiol.** v.11, p. 1-38, 2021.
- ROY K. et al. Adhesin Degradation Accelerates Delivery of Heat-labile Toxin by *Enterotoxigenic Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** v.286, n. 34, p. 29771- 29779, 2011.

RUNFT, D. L. et al.; Zebrafish as a Natural Host Model for *Vibrio cholerae* Col. and Trans. **Appl. and Env. Microbiol.**, v.80, n. 5, p.1710–1717, 2014.

SACK, D. A.; HUDA, S.; NEOGI, P. K.; DANIEL, R. R.; SPIRA, W. M. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxins. **J. Clin. Microbiol.**, v. 11, p. 35-40, 1980.

SAEED, A. F. U. H. et al. Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. **Front. in Microbiol.** v. 8, n. 495, p. 01–28, 2017.

SANDERS, D. G.E.; BATTS, N. W. WINTON, J. R. Susceptibility of Zebrafish (*Danio rerio*) to a Model Pathogen, Spring Viremia of Carp Virus. **Comp. Med.** v. 53, n. 5, p. 514- 521, 2003

SANTOS, C. M. **Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória.** 2014. 24 f. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SASLOWSKY, D. E. et al. Intoxication of zebrafish and mammalian cells by cholera toxin depends on the flotillin/reggie proteins but not Derlin-1 or -2. **J. Clin Invest.** v.120, n. 12, p. 4399-4409, 2010.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): Current insights and future challenges. **Clin. Microbiol. Rev.** v.27, n.4, p. 823–869, 2014.

SIDHU, S. S; FELLOUSE, F. A. Synthetic therapeutic antibodies. **Nat. Chem. Biol.**, v. 2, n. 12, p. 682-688, 2012.

SCHUETZ, A. N. Emerging agents of gastroenteritis: *Aeromonas*, *Plesiomonas*, and the diarrheagenic pathotypes of *Escherichia coli*. **Semin. Diagn. Pathol.** v.36, n.3, p. 187-192, 2019.

SHEIKH, A. et al. Contribution of the highly conserved EaeH surface protein to enterotoxigenic *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect. Immun.** v. 82, n. 9, p. 3657–66, 2014.

SHEIKH, A. et al. Highly conserved type 1 pili promote enterotoxigenic *E. coli* pathogen-host interactions. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** v. 11, n. 5, p. 1–23, 2017.

SHI, R. et al. A human neutralizing antibody targets the receptor binding site of SARS-CoV-2. **Nat**, v. 1, p. 1-7, 2020.

SHIGA, E. A. et al. Comparative analysis of rapid agglutination latex test using single-chain antibody fragments (scFv) versus the gold standard Vero cell assay for Shiga toxin (Stx) detection. **J Microbiol. Met.** v. 175, p. 1 - 6, 2020.

SMITH, H; HALL, W.S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. **J. Path. Bact.**, v.93, n.2, p. 449-529, 1963.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.

STREISINGER, G. et al. Production of clones of homozygous diploid zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Nat.** V. 291, p. 293 - 295, 1981..

SVENNERHOLM, A. M.; HOLMGREEN, J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA). **Current. Microbiol.**, v. 1, p. 19-23, 1978.

SVENNERHOLM, A. M.; LUNDGREN, A. Recent progress toward an enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine. **Expert. Rev. Vacc.** v. 11, n. 4, p. 495–507, 2012.

SZABADY, R. L. Modulation of Neutrophil Function by a Secreted Mucinase of *Escherichia coli* O157:H7. **PLoS. Pathog.** v. 5, n. 2, p. 1 -13, 2009.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and Function of Immunoglobulins. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 125, n. 202, p. 1–24, 2013.

TERRAMOTO, K. K. **Isolamento e caracterização de cianopeptídeos produzidos por *Microcystis aeruginosa* e avaliação da toxicidade em embriões de zebrafish.** 2020. 189 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências e Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

TIAN, X. et al. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus specific human monoclonal antibody. **Em. Microbiol. & Infect.** v. 9, p. 382-385, 2020.

TOOLE MENEZES, C. A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz. J. Microbiol.** v. 34, p. 11-13, 2003.

TONIKIAN, R. et al. Identifying specificity profiles for peptide recognition modules from phage-displayed peptide libraries. **Nat. Prot.** v.2, n. 6, p. 1368 -1386, 2007.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and Dot Immunobinding -- Current Status and Outlook. **J Immu. Method.** v. 72, p. 313-340, 1984.

VAN DEN AKKER, F. et al. Crystal structure of a new heat-labile enterotoxin, LT-IIb. **Structure.** v. 4, p. 665-678, 1996.

VAN DER SAR, A. M. et al. Zebrafish embryos as a model host for the real time analysis of *Salmonella typhimurium* infections. **Cel. Microbiology.** v. 5, n. 9, p. 601-611, 2003.

VARAS, M. et al. Salmonella Typhimurium induces cloacitis-like symptoms in zebrafish larvae. **Microb. Pathog.** v.107, p. 317–320, 2017.

VILLAMIL, J.S.; NAVARRO-GARCIA, F. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. **Fut. Microbiol.** v. 10, n. 6, p.1009-1033, 2015.

WANG, C. et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. **Nat. Commun.**, v. 2251, p. 1-6, 2020.

WU, Y. et al. Identification of Human Single-Domain Antibodies against SARS-CoV-2. **Cel. H. & Microb.** v. 27, p. 891-898, 2020.

WOLF, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of *enterotoxigenic Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 569 – 584, 1997.

YANG, S. C. et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Arch. Microbiol.** v. 199, p. 811–825, 2017.

YAN, Z.-H., et al. Generation of Mycobacterial Lipoarabinomannan-Specific Monoclonal Antibodies and Their Ability to Identify Mycobacterium Isolates. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 54, n. 3, p. 437-446, 2021.

ZHAO, X.; PACK, M.T. Modeling intestinal disorders using zebrafish In: **The Zebrafish Disease Models and Chemical Screens**. 2017. Detrich et al., 4th ed v. 148. Elsevier, p. 241-270, 2017.

ZHENG, Y. et al. SARS-CoV-2 spike protein causes blood coagulation and thrombosis By competitive binding to heparan sulfate. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 193, p.1124-1129, 2021.

APÊNDICE A - Manuscrito publicado



Article

Heat-Labile Toxin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causes Systemic Impairment in Zebrafish Model

Camila Henrique ¹, Maria Alice Pimentel Falcão ² , Luciana De Araújo Pimenta ³, Adolfo Luís Almeida Maleski ² , Carla Lima ² , Thais Mitsunari ¹, Sandra Coccuzzo Sampaio ³, Mônica Lopes-Ferreira ^{2,*} and Roxane Maria Fontes Piazza ^{1,*}

- ¹ Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, SP, Brazil; camila.henrique@butantan.gov.br (C.H.); thais.mitsunari@butantan.gov.br (T.M.)
² Laboratório de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, SP, Brazil; maria.falcao@butantan.gov.br (M.A.P.F.); adolfo.maleski@butantan.gov.br (A.L.A.M.); carla.lima@butantan.gov.br (C.L.)
³ Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, SP, Brazil; luciana.pimenta@butantan.gov.br (L.D.A.P.); sandra.coccuzzo@butantan.gov.br (S.C.S.)
 * Correspondence: monica.lopesferreira@butantan.gov.br (M.L.-F.); roxane@butantan.gov.br (R.M.F.P.)

Abstract: Heat-labile toxin I (LT-I), produced by strains of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC), causes profuse watery diarrhea in humans. Different in vitro and in vivo models have already elucidated the mechanism of action of this toxin; however, their use does not always allow for more specific studies on how the LT-I toxin acts in systemic tracts and intestinal cell lines. In the present work, zebrafish (*Danio rerio*) and human intestinal cells (Caco-2) were used as models to study the toxin LT-I. Caco-2 cells were used, in the 62nd passage, at different cell concentrations. LT-I was conjugated to FITC to visualize its transport in cells, as well as microinjected into the caudal vein of zebrafish larvae, in order to investigate its effects on survival, systemic traffic, and morphological formation. The internalization of LT-I was visualized in 3×10^4 Caco-2 cells, being associated with the cell membrane and nucleus. The systemic traffic of LT-I in zebrafish larvae showed its presence in the cardiac cavity, yolk, and regions of the intestine, as demonstrated by cardiac edema (100%), the absence of a swimming bladder (100%), and yolk edema (80%), in addition to growth limitation in the larvae, compared to the control group. There was a reduction in heart rate during the assessment of larval survival kinetics, demonstrating the cardiotoxic effect of LT-I. Thus, in this study, we provide essential new depictions of the features of LT-I.

Keywords: heat-labile toxin; Caco-2 cells; zebrafish; systemic effects; cardiotoxic effect

Key Contribution: Two experimental models were evaluated for the first time; using fluorophore-conjugated LT-I. Zebrafish is transparent, allowing for the systemic traffic observation of LT-I, as well as enabling its use as an experimental model for adjuvant studies. The use of intestinal cells permitted the validation of the LT-I pathway, as has already been observed in adrenal cells.



Citation: Henrique, C.; Falcão, M.A.P.; De Araújo Pimenta, L.; Maleski, A.L.A.; Lima, C.; Mitsunari, T.; Sampaio, S.C.; Lopes-Ferreira, M.; Piazza, R.M.F. Heat-Labile Toxin from Enterotoxigenic *Escherichia coli* Causes Systemic Impairment in Zebrafish Model. *Toxins* **2021**, *13*, 419. <https://doi.org/10.3390/toxins13060419>

Received: 19 March 2021

Accepted: 10 May 2021

Published: 12 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Bacterial toxins have been increasingly recognized as important virulence factors in a variety of pathogenic bacteria, being responsible for the symptoms associated with several important diseases such as diarrhea [1,2].

Heat-labile toxin I (LT-I) is one of the two toxins produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains, a pathotype responsible for approximately 10 million cases of diarrhea per year worldwide, mainly affecting children under five years old in low-income areas of developing countries [3,4]. It is also considered the main pathotype that causes “traveler’s diarrhea,” which is associated with visitors in transit through some settings in

developing countries—mainly Latin America, the Caribbean (i.e., Haiti and the Dominican Republic), South Asia, the Middle-East, and Africa [3–5].

LT-I is an oligomeric bacterial enterotoxin with an AB₅-type structure, composed of an A sub-unit formed of two domains (A₁ and A₂) connected by a disulfide bridge: A₁ is the enzymatically active portion and A₂ serves as a support, which is non-covalently linked to the pentameric B sub-unit [6–8]. Its internalization occurs mainly through the binding of the B sub-unit to the GM₁ ganglioside receptor present in the intestinal epithelium, which is responsible for enabling the internalization of the enzymatically active A sub-unit of the toxin [6–8].

The active A sub-unit is allosterically activated by ADP ribosylation factors (ARFs) [9,10]. The active A₁ portion of the LT catalyzes the ADP ribosylation of the heterotrimeric GTPase Gsα, consequently activating adenylate cyclase [11]. This results in an increase in cAMP, leading to the activation of cAMP-dependent protein kinase A (PKA) which, in turn, phosphorylates multiple serine residues within the R-domain of CFTR [12], allowing for ATP hydrolysis and gating of the chloride channel [13].

In addition to their performance in the intestinal lumen, LT-I and its sub-families (LT-IIa, LT-IIb, and LT-IIc) have also been described as potent mucosal and systemic adjuvants [14,15]. Although the cellular and molecular events which promote such immunomodulatory properties have not yet been fully elucidated and described, it has been suggested that the physical interactions generated by the binding of the B pentameric sub-unit with ganglioside receptors located on the surface triggers one or more types of immunocompetent cells [15–17].

To observe the action and effects of the LT-I toxin as an adjuvant, different models have been (and/or are) used. The most widespread methodology for observing the effect of the LT-I toxin *in vivo* is carried out using a loop attached to the intestines of adult rabbits, where a bacterial culture of ETEC or the toxin itself is inoculated into the animals through surgical techniques, generating fluid accumulation in the intestine [18]. Newborn mice have also been used, with the percutaneous injection or oral administration of the bacterial culture supernatant, followed by the removal of the intestine for analysis [19–21]. In studies carried out with LT-I and LT-II sub-families as adjuvants, the murine model is the most widespread, in which both enteral and parenteral routes have been employed [14,15,22]. These methodologies are extremely laborious and, at present, are often incompatible with the rules of the committees that regulate ethics in the use of animals.

In this context, the zebrafish (*Danio rerio*) is a vertebrate species with several advantageous characteristics filling the gap between cell cultures and rodents, allowing for early *in vivo* validation, as well as several human pathogen studies [23–29], in addition to studies evaluating the neutralization of toxins by antibodies [30], efficiency of molecules as vaccine adjuvants [31–33], and vaccine efficacy and safety tests [34]. Zebrafish genes show 70% similarity to those of humans [35], as well as other advantageous characteristics, when compared to models already established in rodents, such as the optical clarity of embryos and larvae, ease of creation and manipulation, high reproductive rate, and rapid development, among others [26,28]. Additionally, zebrafish have a fully functional digestive system that is visible for five days after fertilization, as well as high homology with superior vertebrate organisms, in terms of cell composition [36,37]. Furthermore, the presence of GM₁ ganglioside receptors has been observed [38]. Considering these advantageous characteristics, combined with the limitations of current animal models used for LT-I toxin studies, the zebrafish presents itself as an interesting model for potential use in studies concerned with LT-I produced by ETEC.

Concerning studies of LT-I *in vitro* models, adrenal cell lines Y-1 and CHO epithelial cells (Chinese Hamster Ovary) are usually used, enabling several studies, such as those aimed at their detection [39,40], neutralization by antibodies [41], or elucidation with respect to the type II secretion system (T2 S5) [42], among others. In adjuvant studies assessing the mode of action and effect on the immune system by the LT-I toxin, the human cell line derived from colorectal adenocarcinoma (Caco-2) has been widely used [43,44].

This line presents several advantageous characteristics, such as spontaneous differentiation into enterocytes (under normal culture conditions), maintaining the morphological and functional characteristics of the mature cement, and the expression of GM₁ ganglioside receptors [45,46]. Thus, as a human cell line, Caco-2 cells have characteristics closer to the real target of the toxin LT-I than adrenal and epithelial cells of murine origin do, for use as an *in vitro* model for the detection and neutralization of the LT-I toxin. Herein, we assessed the analysis of the LT-I toxin pathway employing zebrafish as a substitute for mammal models, as well as human intestinal Caco-2 cells, for validating the *in vitro* fate of LT-I.

2. Results

2.1. Toxin and Caco-2 Cell Interaction

Different concentrations of Caco-2 cells were evaluated, and 3×10^4 cells per well was determined as a suitable concentration for all experiments, as higher cell numbers impaired the assay (data not shown).

Rhodamine phalloidin and DAPI fluorophores at 1:200 dilutions allowed for microscopic visualization (Figure 1), where the efficiency of labeling the toxin LT-I with FITC (LT-I/FITC) was confirmed by a fluorescence assay of the interaction of the toxin and Caco-2 cells (Figure 2), and visualizing its internalization in both the cell membrane and the nucleus, thus showing its retrograde transport (Figure 2f).

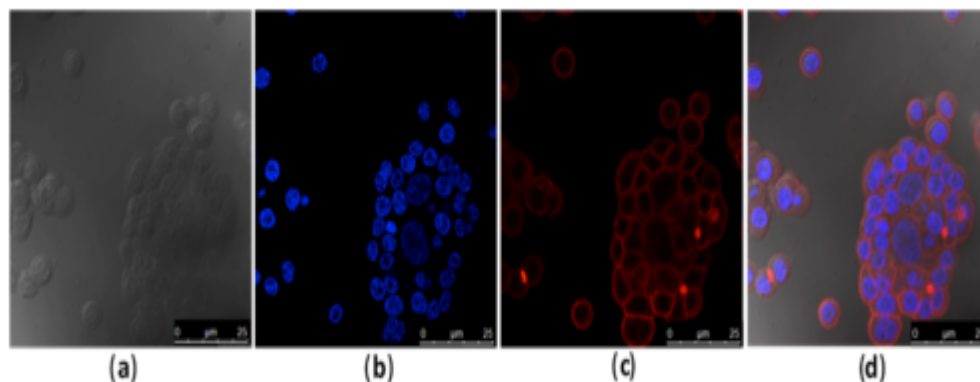


Figure 1. Fluorescence microscopy at the concentration of 3×10^4 Caco-2 cells per well: (a) Caco-2 cells, phase contrast; (b) Cell nucleus stained with DAPI, in blue; (c) Actin of the cell wall stained with rhodamine-phalloidin, in red; (d) Overlay of all fluorescence images.

2.2. Systemic Distribution of LT-I Toxin in Zebrafish

The systemic traffic of the LT-I/FITC toxin was monitored in 24 hpf zebrafish larvae for up to 96 hpi. Through fluorescence analysis, internalization of the toxin and its evident presence in the cardiac, yolk, and intestine regions were observed (Figure 3e–h). In contrast to that observed in the larvae, the results obtained with the fluorophore FITC (negative controls, Figure 3a–d) suggest the traffic of LT-I through the intestinal tract and its subsequent elimination.

The traffic of LT-I across the intestinal tract was well-defined in zebrafish intestine (Figure 4), as, at 24 hpi, the toxin was located in the intestinal bulb; at 48 and 72 hpi, the toxin was present in the mid intestine; and, at 96 hpi, LT-I was encountered in the posterior intestine, which was completely different from the FITC control, in which it was located in the intestinal bulb throughout the analyses.

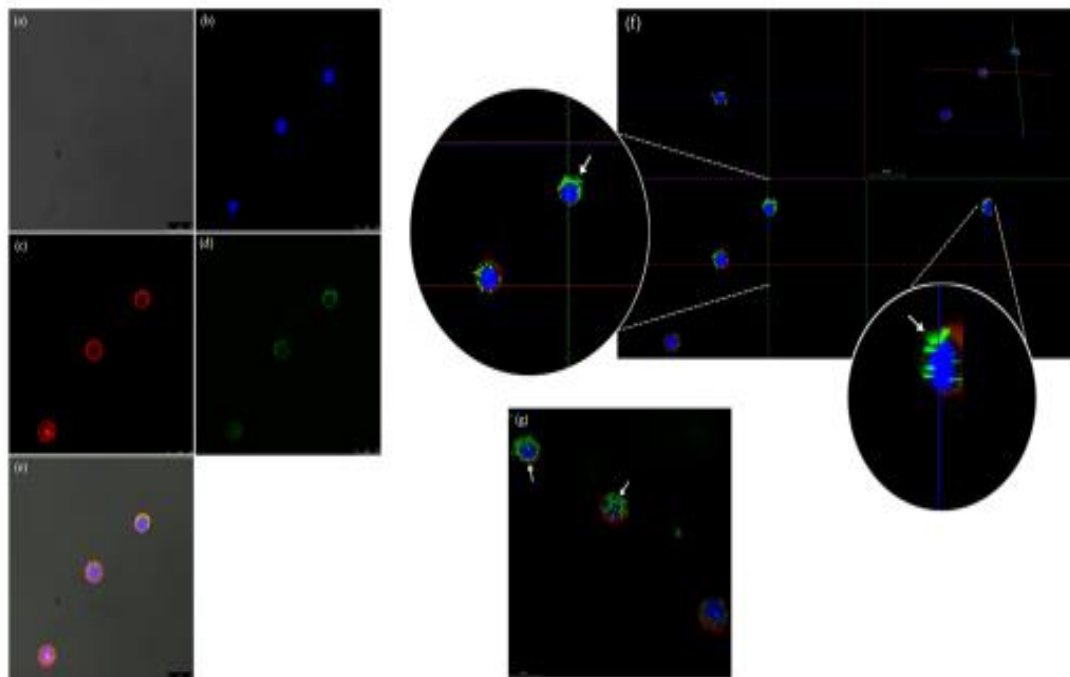


Figure 2. Fluorescence microscopy of LT-I/FITC interaction with Caco-2 cells for 7 h, visualized with magnification of 63×: (a) Caco-2 cells, phase contrast; (b) Cell nucleus stained with DAPI, in blue; (c) Actin of the cell wall stained with rhodamine phalloidin, in red; (d) LT-I/FITC toxin; (e) Overlay of all fluorescence images; (f) Orthogonal analysis of LT-I/FITC toxin in Caco-2 cells, visualizing the toxin marked with FITC (→) associated with both the cell membrane and the nucleus; (g) 3D analysis of LT-I/FITC toxin in Caco-2 cells, evidencing the presence of toxin marked with FITC (→) in the cell membrane and nucleus.

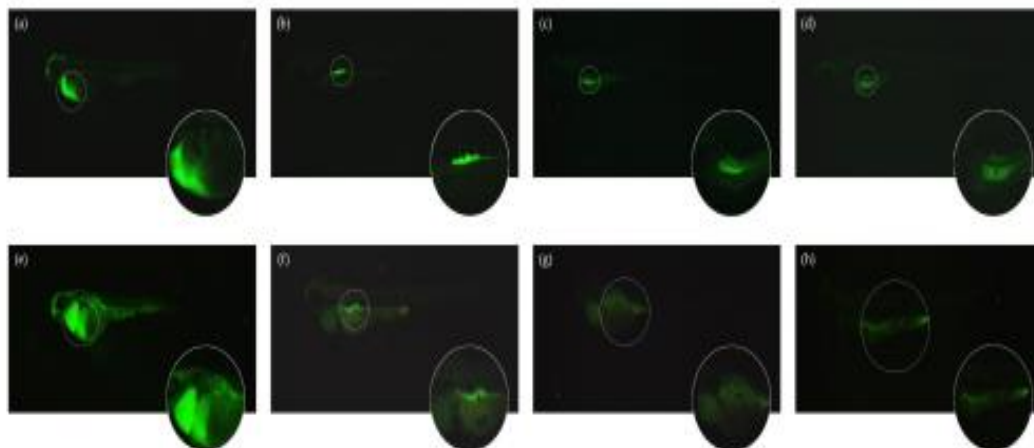


Figure 3. Fluorescence microscopy of systemic traffic of LT-I toxin in zebrafish larvae up to 96 hpi, visualized at 40× magnification: (a–d) FITC (control) by fluorescence microscopy—(a) 24 hpi; (b) 48 hpi; (c) 72 hpi; (d) 96 hpi; (e–h) LT-I/FITC by fluorescence microscopy—(e) 24 hpi; (f) 48 hpi; (g) 72 hpi; and (h) 96 hpi. Visualized using a Lumar V12 stereomicroscope with Axiocam MRC REV 3. Fluorescence deconvolved using the AxioVision® software (Carl Zeiss, Germany), using the following calibration parameters: 0.8× lenses, 52× magnification, −0.10 brightness, 5.78 contrast, and gamma 2.20.

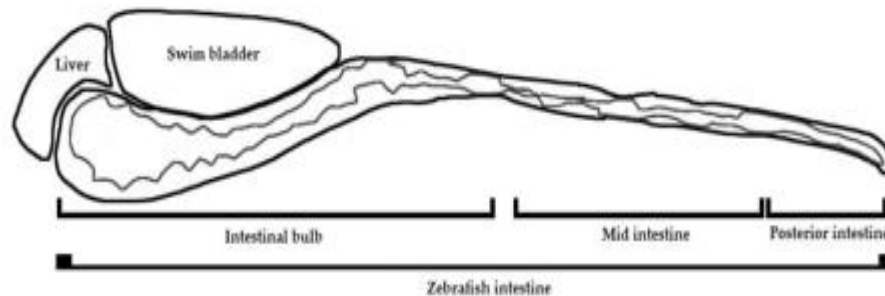


Figure 4. Diagram of zebrafish intestine, showing intestinal bulb, mid intestine, and posterior intestine.

2.3. Phenotypic Assessment in Zebrafish Larvae Exposed to LT-I Toxin

Compared to the control (FITC), 64% of the larvae exposed to LT-I/FITC survived in the 96 hpi (Figure 5a); however, they presented malformation events after 24 hpi (Figure 6; cardiac edema). At 96 hpi, 100% of the larvae showed no swimming bladder, while pericardial and yolk edema also occurred in 100% and 80% of the larvae, respectively, when compared to the control group (Figure 5b). The deaths observed in the control group (20%) within the first 24 h were within the normal range, according to the literature, as were the malformations observed in the spine and tail (which were within the limit of 30%) [47].

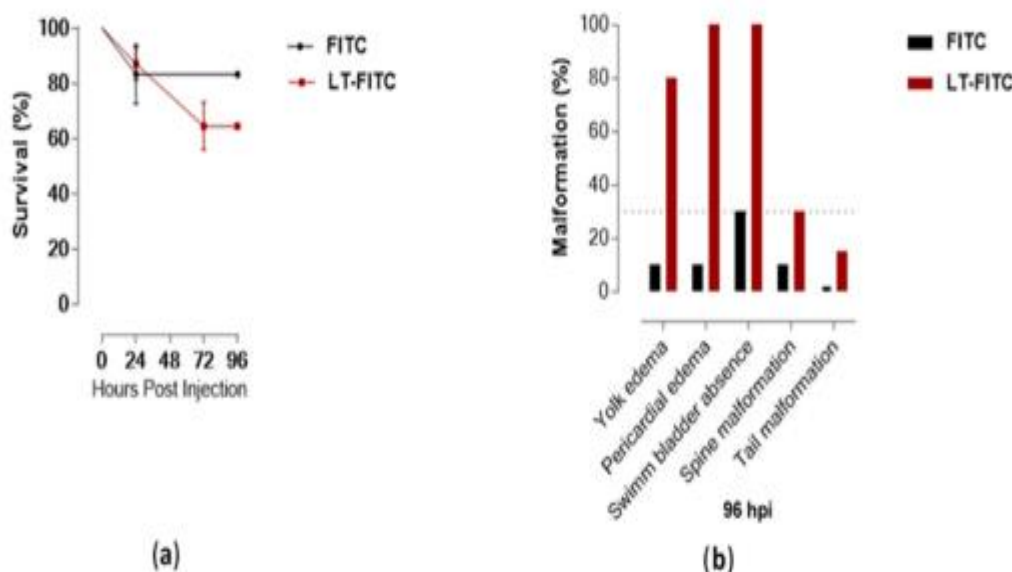


Figure 5. Survival kinetics and malformation events of zebrafish larvae microinjected with the toxin LT-I ($n = 31$) and FITC ($n = 12$) (control): (a) Larvae survival kinetics; and (b) Malformation events observed at 96 hpi in zebrafish larvae with LT-I toxin.

The macroscopic morphology visualized under a magnifying lens showed that the LT-I toxin induced significant pericardial and yolk edema in the larvae, compared to the control group. Qualitative measurement of these malformations showed that the LT-I toxin caused yolk edema in the larvae, thus showing significance at 96 hpi, compared to the control group larvae (Figure 7a). Furthermore, it also influenced larval growth, showing a significant decrease, in relation to control larvae, at all analyzed times (Figure 7b).

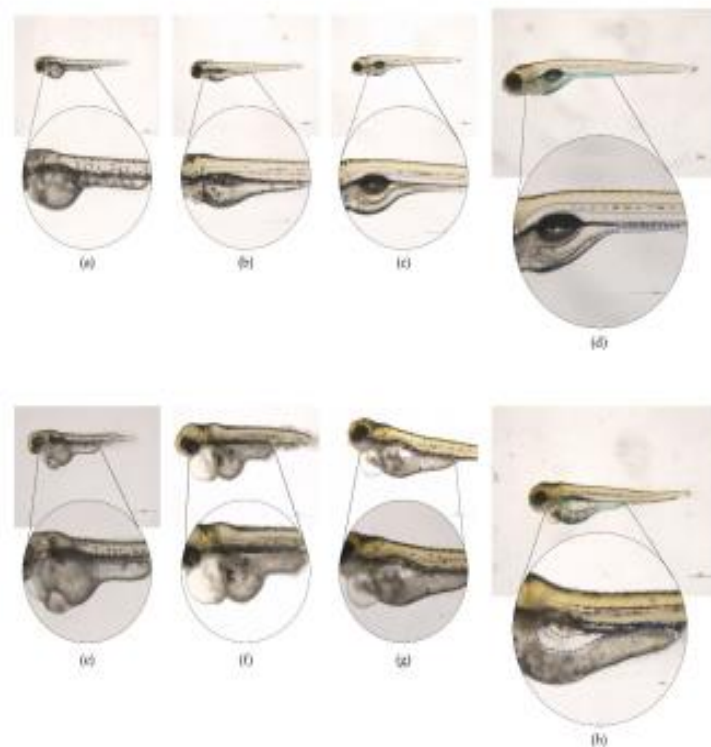


Figure 6. Malformation events observed in larvae injected with the LT-I/FITC toxin and FITC (as control) at different times. Visualized using a Leica M205C LASV 4.11 with software magnification of 28 \times and 80 \times : (a–d) Larvae microinjected with FITC at (a) 24 hpi; (b) 48 hpi; (c) 72 hpi; and (d) 96 hpi; and (e–h) larvae microinjected with LT-I/FITC at (e) 24 hpi; (f) 48 hpi; (g) 72 hpi; and (h) 96 hpi. Yellow dotted: heart; light blue dotted: yolk; purple dotted: larva length; and dark blue dotted: intestine.

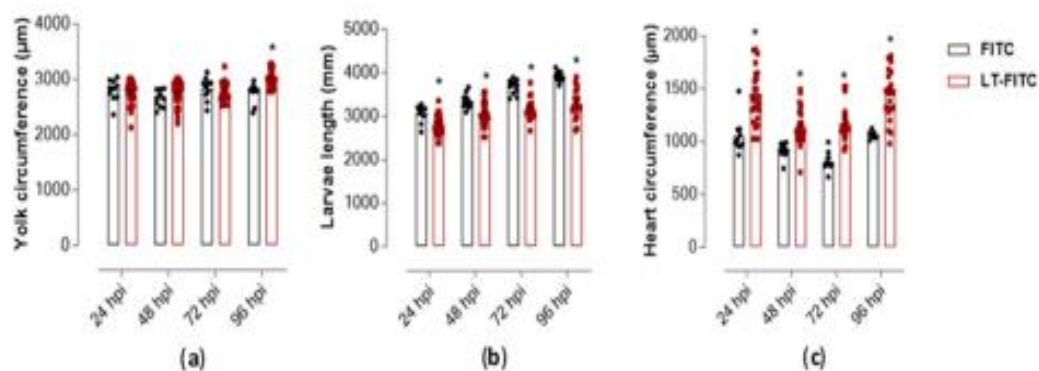


Figure 7. Measurement of heart circumference, yolk, and length of zebrafish larvae injected with toxin LT-I ($n = 31$) and FITC ($n = 12$) (control) at different times of analysis: (a) yolk circumference, (b) larval length, and (c) heart circumference. All values express the mean \pm SEM. The differences were considered statistically significant when * $p < 0.01$, as determined using the GraphPad Prism software (GraphPad Software, v6.02, 2013, La Jolla, CA, USA).

The cardiac region of all larvae treated with the toxin showed an expressive increase and a statistically significant difference during all periods, compared to the larvae treated only with the FITC control (Figure 7c). The edema in the pericardial area of all larvae

treated with the toxin was reflected by cardiac dysfunction, as evidenced by the reduction in heart rate over the analyzed periods, mainly at 96 hpi (Figure 8).

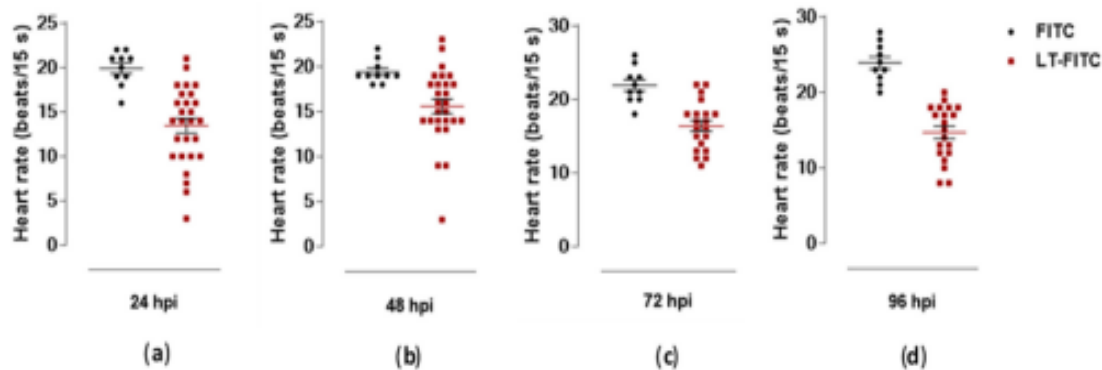


Figure 8. Heart rate at different times of microinjection of zebrafish larvae with toxin LT-I/FITC ($n = 31$) and FITC (control- $n = 12$). (a) 24 hpi; (b) 48 hpi; (c) 72 hpi; (d) 96 hpi. All values express the mean \pm SEM. The differences were considered statistically significant when $p < 0.01$ as calculated using the GraphPad Prism (Graph Pad Software, v6.02, 2013, La Jolla, CA, USA).

3. Discussion

The purpose of the current study was to analyze the LT-I pathway in Caco-2 cells and the feasibility of the use of a zebrafish model in determining the transdermal and systemic fate of this toxin. Significant advances in elucidating the pathway and mechanism of LT in vitro cell lines were employed [40–42], with Caco-2 cells having been employed among them. These cells express most transporters, drug-metabolizing enzymes, and normal epithelial receptors, including the ganglioside GM₁ [45,46]. Its expression in Caco-2 cells is dependent on an increase in the number of cell culture passages [46]. Thus, in this study, we were able to visualize the internalization of the LT-FITC using the same concentration previously employed [41,42]. The analysis was performed by confocal microscopy in the 62nd passage of cells, with a concentration of 3×10^4 cells/well. Orthogonal analysis corroborated the presence of the LT-FITC toxin to be associated with the cell membrane and nucleus. Hence, from these studies, it is clear that toxin translocation from the apical to the basolateral surface of the epithelial cell requires endocytosis and processing in one or more intracellular compartments, as has already been described elsewhere [22,48–50].

Animal models have been used to examine the colonization and pathogenesis [18,19,21,51] of disease or immunogenicity and efficacy of ETEC vaccine candidates, including intranasal and orogastric adult mouse models [52–55], an infant mouse challenge model [56], a rat model [57], a rabbit ileal loop (RIL) model [21], and a reversible intestinal tie adult rabbit diarrhea (RITARD) model [58]. These models do not adequately mimic the full spectrum of the disease observed with human ETEC infection and are further limited, as they are difficult to reproduce, or require surgery and/or death as an endpoint. An ideal model requires the absence of antibiotics or surgical intervention, incorporates an orogastric challenge of bacteria, and demonstrates intestinal colonization, diarrheal disease, and the development of protective immunity.

The zebrafish model emerged to overcome such biases, as it has a fully functional digestive system, which is visible five days after fertilization, as well as high homology with superior vertebrate organisms, in terms of cell composition [36,37]. This has allowed for several studies of gastrointestinal pathologies in larvae and adult fish, such as that observed in studies carried out with *Vibrio cholera* [59–61], evidencing the potential of this animal model for intestinal colonization analysis using this type of bacteria. This model, in addition to intestinal colonization, also allows for the specific study of virulence factors produced by diarrheagenic bacteria, having, as an example, the cholera toxin (CT)

produced by *Vibrio cholera*—a toxin with which LT-I shares structural elements, affinity for the GM₁ receptor in eukaryotic cells, and enzyme activity [3,6,7,62]. In a recent study, intoxication of zebrafish embryos by transdermal CT absorption—using the Fish Embryo Acute Toxicity test (FET) [63]—made it possible to assess the role of two proteins in CT retro-translocation, after internalization in the intestinal epithelium [38].

Thus, these and other studies using the zebrafish model were successful, due to their several advantages, in relation to other mammals; mainly consisting of their small size, high fertility, rapid development, and transparency, thus allowing for the capture of images in real-time [26,28]. Although zebrafish can connect the gap between assays based on cell cultures and biological validation in higher vertebrate animals, they provide a far more distant model from humans than other animals, such as rodents; for example, its physiology is not identical to that of humans and several human disorders are difficult to reproduce in this model. In addition, some genes appear as two copies; therefore, it is more difficult to determine functional roles in this species [47,64–68]. As such, the zebrafish model does not replace the use of rodent animals—as these provide data that are more easily extrapolated to humans—but it may serve as an important screening tool for therapeutic biomolecules, drugs, and vaccine candidates, among others, in order to complement tests based on rodents or cells, helping to predict the safety of such biopharmaceuticals and, consequently, reducing the overall costs of biological validation [26–28,47,64,67].

In this context, in a trial employing a FET test [63] 24 h after fertilization in zebrafish embryos submitted to transdermal absorption of different concentrations of the LT-I toxin [38], the sensitivity of the embryos was dependent on the increase in concentration of the LT-I toxin. Although the lethality of embryos during survival kinetics analysis was low, evident phenotypes of edema were observed in the cardiac cavity and in the yolk, curvature of the spine, and caudal vein, and loss of pigmentation in the larvae were demonstrated at the highest concentration (see Supplementary Figure S1).

Given this sensitivity, combined with the transparency advantage of zebrafish larvae, the systemic traffic of the LT-I/FITC toxin was analyzed by microinjection into the caudal vein of zebrafish larvae (see Supplementary Video S1). An expressive presence of the LT-I toxin in the cardiac cavity, yolk, and intestine was observed through use of fluorescence microscopy. These results lead us to suggest that the toxin LT-I may have an action on the pericardium of the animals, causing edema and cardiac dysfunction; meanwhile, with its later displacement, it acts on the GM₁ receptors in the intestine, triggering distension of the yolk region, thus increasing it in volume and compressing the intestinal region. Its presence in these regions corroborates the phenotypes observed due to its toxic action (both in the preliminary FET test and in the microinjection test) of cardiac edema, yolk, and intestinal region. It is noteworthy that the transdermal absorption of LT-I by FET test and the systemic inoculation (through the caudal vein) showed similar phenotypes during the development of the zebrafish embryos and larvae, suggesting the same traffic of the toxin, regardless of its inoculation route.

Moreover, in terms of enterotoxicity, LT-I and CT (commonly known as HTL) have been shown to be involved in the strengthening of immune responses to co-administered antigens, as extensively reviewed by [15,16,69]. While it is evident that HTL are potent adjuvants, their inherent toxicities have precluded their use as adjuvants in human vaccines [16]. This omission is particularly relevant for mucosal vaccines. Mouse models have demonstrated that HTL, when administered by the intranasal route, efficiently binds to the nasal neuroepithelium and is subsequently trafficked, by retrograde transport, along the underlying olfactory nerves to the olfactory bulbs in the brain [70,71]. Such retrograde transport might exert an inflammatory effect on brain tissues. Furthermore, they are highly inflammatory when injected into mice dermis or in subcutaneous tissues. Upon injection, they elicit self-limited local erythema and swelling at the site of injection, which may persist for weeks and eventually resolve without sequelae [72].

In an attempt to produce an HLT in which the potentially serious toxicities were abrogated, recombinant engineering has been employed to produce non-toxic forms of

HTL. For this purpose, mutant holotoxins were engineered, which targeted single-point amino acid substitutions at amino acids in the A polypeptides considered to be critical for ribosylation activity [15]. Furthermore, the use of LT-IIb and LT-IIc as adjuvants induced less edema, cellular infiltrates, and general inflammation at the site of intradermal injection [14].

Except from cardiotoxicity after the systemic inoculation of LT-I in zebrafish (see Supplementary Videos S2 and S3), the other effects described in rodents, in spite of the employed routes, the toxicity of LT-I were similar, as established for the first time herein in a zebrafish model. Mortality and clinical signs are usually analyzed, in order to evaluate the innate (non-specific) or adaptive (specific) immune system response. Zebrafish also have a well-maintained adaptive immune system, composed of T- and B-lymphocytes that develop from the thymus and kidneys, respectively [43]. Hence, in the present work, besides serving as a prototype for enterotoxicity, we present *Danio rerio* as an excellent experimental model for studies on the safety of new formulations of HTL as adjuvants, highlighting improvements in both time and cost reduction in research and analyses, as well as the use of Caco-2 cell lines as tools for future efficient analyses concerning the LT-I toxin.

4. Materials and Methods

4.1. LT Toxin

The LT toxin type I (LTh Lot # 14004) used in this study was obtained from a hybrid toxin, which was purified and lyophilized [43]. It was provided to us by Dr. Elizabeth B. Norton and Dr. John D Clements of the Department of Microbiology and Immunology, Tulane University, New Orleans, Louisiana, United States of America. For the conjugation of the toxin with fluorescein isothiocyanate (FITC; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), a concentration of 0.001 g/mL was used; for in vitro and in vivo tests, concentrations of 2.5 and 1.5 µg/mL were used, respectively [38,41].

4.2. Caco-2 Cell

Caco-2 cells at the 62nd passage were thawed and cultured in 75 mm² culture flasks (Techno Plastic Products, Switzerland, CH) in DMEM containing 4.5 g/mL glucose (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA), at 37 °C and with 5% CO₂, until reaching 70% confluence. To prepare the plates, the cells were removed from the bottle with the addition of 2 mL of trypsin and neutralized with 2 mL of DMEM containing 10% FBS after the observation of cell detachment. The cells were transferred to a 50 mL polypropylene tube for centrifugation at 259 × g for 5 min at 4 °C. Then, the supernatant was discarded and the precipitate was resuspended in 5 mL of DMEM containing 10% FBS medium. Cell concentrations were adjusted after counting in a Neubauer chamber.

4.3. Conjugation of LT with FITC Fluorophore

Conjugation was performed, as previously described [73], using a standardized volume of 0.05 mL of the LT-I toxin at a concentration of 0.001 g/mL, incubated with 0.25 mL of FITC (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) and 0.30 mL of HEPES buffer (N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at pH 5.5 for 3 h at a temperature between 2 and −2 °C. The solution was homogenized every 30 min, and 0.60 mL of ammonium chloride solution was added after 3 h. The contents were transferred to a Vivaspin 2 10,000 MWCO column (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), and 0.5 mL of HEPES pH 8.3 buffer was added as washing buffer. Then, they were centrifuged at 5.975 × g for 5 min at 19 °C and five washes were performed with 1 mL of HEPES pH 5.5 buffer, followed by centrifugation at 5.975 × g for 5 min at 19 °C. The excess of free FITC was removed from the column and stored at −20 °C.

4.4. Fluorescence

Caco-2 cells were cultured, detached from the bottle with trypsin, and distributed on 13 mm-diameter sterile glass coverslips contained in 24-well cell culture plates. In order to standardize the cell concentration for better visualization, the concentrations of 1×10^3 , 3×10^3 , 1×10^4 , 3×10^4 , and 2×10^5 cells/well were analyzed. For fixation, paraformaldehyde solution (PFA) with Triton X-100 (4% PFA, 5% sucrose diluted in PHEM buffer) was added for 5 min at room temperature. Washing was carried out with pH 6.9 PHEM buffer (2 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM $MgCl_2$, and 60 mM PIPES) plus glycine (100 mM) for 5 min. Then, PFA solution was added for 15 min, followed by another cycle of washing with PHEM–glycine buffer for 10 min. For the visualization of actin filaments and the nucleus, cells were incubated for 30 min with rhodamine phalloidin (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Carlsbad, CA, USA) and DAPI (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) in dilutions of 1:200 and 1:500, respectively, diluted in PHEM–glycine buffer. The coverslips were coupled to slides added with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), dried, and subsequently stored at $-20^\circ C$. After standardization of cell concentration, the tests were carried out with the addition of LT-I/FITC. For this, the steps mentioned above were performed and, after 18 h of incubation, a volume of 1 mL/well-containing $2.5 \mu g/mL$ of the LT-I toxin in DMEM (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) containing 2% FBS was added to the cells and incubated at $37^\circ C$, with 5% CO_2 for 7 h. The fixation and staining steps for the actin filaments and the nucleus, with rhodamine phalloidin and DAPI, respectively, were conducted using the standardized dilution. The coverslips were coupled to the slides added with Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), dried, and subsequently stored at $-20^\circ C$. Visualization of the assay was performed using a Confocal Laser Scanning Microscope (Confocal TCS, SP8, Leica, Germany). All experiments were executed independently three times.

4.5. Zebrafish Husbandry

The experiments were carried out on the Zebrafish Platform of the Butantan Institute (CeTICs/FAPESP), with adult zebrafish (<18 months of age) of the AB strain (International Zebrafish Resource Center, Eugene, OR) under the following conditions: Room temperature, $28^\circ C$; dark cycle, 14/10 h; and groups separated by sex and raised in individual aquariums present in a specific rack (ALESCO, Monte Mor, SP, Brazil), in order to maintain water throughout the system ($60 \mu g mL^{-1}$ instantaneous sea salts from the ocean).

4.6. Zebrafish Embryo Toxicity Assay (Fet Test OECD 236)

Zebrafish embryo toxicity assays were realized according to the OECD guideline No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Assays were conducted in 24-well plates (Costar® 24-Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated, NY, USA) with five embryos (4- to 32-cell stage) per treatment/concentration at $28^\circ C$. Embryos were exposed to different concentrations of LT-I toxin diluted in E2 medium, and the experiment was performed in quadruplicate. After treatment, embryos and larvae were monitored with a Leica M205C fluorescence stereomicroscope and/or collected at several time points (24, 48, 72, and 96 hpi), where each individual embryo was scored for mortality (embryo coagulation) and morphological malformations.

4.7. Microinjection into Zebrafish Larvae

Zebrafish embryos were collected in spawning traps, and larvae, 24 h post-fertilization (hpf) (final $n = 43$), were transferred to a petri dish (100×25 mm) with 5 mL of E2 $0.5 \times$ medium (7.5 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM Na_2HPO_4 , 15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 + 7 H_2O$, 1 mM $CaCl_2 + 2 H_2O$, and 0.7 mM $NaHCO_3$) and 0.4% tricaine (ethyl-3-aminobenzoate, #M5-222, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). Under anesthesia, the larvae were placed in another Petri dish with E2 medium and Pronase enzyme (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) at a concentration of 0.02 mg/mL, until the chorions were removed, and observed using a Leica M205 C stereomicroscope (Leica Microsystems,

Newmarket Rd, Cambridge, UK). After decorionization, the embryos were washed and kept in E2 medium until the beginning of the experiment.

Larvae with 24 hpf ($n = 43$) were individually injected into the tail vein with 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LT-I/FITC ($n = 31$) or 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($n = 12$) of FITC (as a control) using microcapillaries (# 5242952008 femtotips 930,000,043 with 0.5–0.7 μm , Eppendorf, Hamburg-Nord, Germany) coupled to an Injectman[®] 4 pneumatic microinjector (Eppendorf, Hamburg-Nord, Germany) pressurized to 2–3 nL (Video S2). The embryos were kept in an oven at 28 °C and analyzed for survival kinetics and malformations after 24 (larvae with 48 hpf), 48 (larvae with 72 hpf), 72 (larvae with 96 hpf), and 96 h (larvae with 120 hpf). The microinjection was performed under a Leica M205 C stereomicroscope and images of each larva ($n = 43$), at each time, were obtained under anesthesia using a Lumar V12 stereomicroscope with Axi-ocam MRC REV 3. Fluorescence was observed using the Axio software Vision[®] (Carl Zeiss, One North Broadway, NY, USA).

4.8. Phenotypic Analysis

During the survival kinetics analysis, 96 hpi larva malformation phenotypes, such as larval growth, malformation of the spine and tail, yolk, and pericardial edema, and the absence of a natural bladder, were observed using a Leica M205 C stereomicroscope.

The analysis of the larval length, circumference of the cardiac region, and yolk, was performed at 24, 48, 72, and 96 hpi in the LT-I/FITC toxin group and the control group (FITC). With the larvae on a glass plate in the lateral position, with the aid of a Leica M205 C stereomicroscope and the Leica Application Suite software (LAS v4.11, Leica Application Suite software, EUA), measurements were performed, emphasizing that the total body length was measured from the head to the tip of the tail. To assess the possible cardiotoxicity of the LT-I toxin, the heartbeats of both groups were recorded at 24, 48, 72, and 96 hpi, under 12.5 \times magnifications, for 15 s using the ImageJ software (v.1.8.0_172, Leica Application Suite software, EUA).

4.9. Zebrafish Euthanasia

The euthanasia of zebrafish larvae was carried out at the end of the experiments, with their immersion in a 4% tricaine solution diluted in 0.5 \times E2 medium. Then, the absence of a heartbeat was confirmed using a Leica stereomicroscope (M205 C), after which a 10% bleach solution was added.

4.10. Statistical Analysis

All values are expressed as the mean \pm SEM. The data were obtained using the analysis of variance (ANOVA) and multiple comparison tests. Differences were considered statistically significant when $p < 0.01$, as determined using the GraphPad Prism software (Graph Pad Software, v6.02, La Jolla, CA, USA, 2013).

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/toxins13060419/s1>, Figure S1: Malformations observed in zebrafish embryos in the Fish Embryo Toxicity (FET) test performed with the toxin LT, Video S1: Microinjection technique through the caudal vein of zebrafish, Video S2: Heartbeat of zebrafish larvae microinjected with FITC (control group), Video S3: Heartbeat of zebrafish larvae microinjected with LT-I/FITC.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, software, validation, original draft preparation, investigation, formal analysis, data curation, project administration, C.H.; methodology, software, formal analysis, investigation, writing—review and editing, M.A.P.F.; methodology, investigation, writing—review and editing, L.D.A.P.; methodology, writing—review and editing, A.L.A.M., C.L. and T.M.; methodology, resources, writing—review and editing, S.C.S.; methodology, resources, visualization, supervision, writing—review and editing, M.L.-F.; conceptualization, methodology, validation, investigation, resources, visualization, supervision, project administration, funding acquisition, writing—review and editing, R.M.F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP–2017/17213-8 to R.M.F.P and Cetics/FAPESP 2013/07467-1). C.H. was a recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and currently she is recipient of a fellowship from FAPESP (2017/17213-8).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the laws of the National Council for Animal Experiment Control (CONCEA) and approved by the Butantan Institute’s Animal Use Ethics Commission (CEUAIB 8592060918). Approval date is 4 October 2019.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors. The data are not publicly available due to raw data are not available in the repository of the Butantan Institute (<https://repositorio.butantan.gov.br/> (accessed on 14 May 2021)).

Acknowledgments: To Elizabeth B. Norton and John D Clements, Department of Microbiology and Immunology, Tulane University, New Orleans, Louisiana, United States of America for kindly providing purified LT-I toxin. To Alexander Seixas de Souza, confocal microscopy technician at the Cell Biology Laboratory of the Butantan Institute, for the analysis of confocal microscopy of fluorescence. To Aline Ingrid Andrade de Barros and Wilton Queiroz de Souza from the Applied Toxinology Laboratory (LETA) responsible for the Zebrafish Platform for mating and making embryos available for experimentation. To Luis Felipe Loureiro with the organization of the figures.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Schaechter, M.; Medoff, G.; Eisenstein, B.I. *Mechanisms of Microbial Disease*, 2nd ed.; Williams and Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1993; pp. 162–175.
- Schmitt, C.K.; Meysick, K.C.; O’Brien, A.D. Bacterial toxins: Friends or foes. *Emerg. Infect. Dis.* **1999**, *5*, 224–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Spangler, B.D. Structure and Function of Cholera Toxin and the Related *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin. *Microbiol. Rev.* **1992**, *56*, 622–647. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fleckenstein, J.M.; Kuhlmann, M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Infections. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **2019**, *21*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mirhoseini, A.; Amani, J.; Nazarianb, S. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microb. Pathog.* **2018**, *117*, 162–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Duan, Q.; Xia, P.; Nandre, R.; Zhang, W.; Zhu, G. Review of Newly Identified Functions Associated with the Heat-Labile Toxin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 292. [[CrossRef](#)]
- Villamil, J.S.; Navarro-Garcia, F. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 1009–1033. [[CrossRef](#)]
- Lanata, C.F.; Fischer-Walker, C.L.; Olascoaga, A.C.; Torres, C.X.; Aryee, M.J.; Black, R.E. Global Causes of Diarrheal Disease Mortality in Children, 5 Years of Age: A Systematic Review. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72788. [[CrossRef](#)]
- Horstman, A.L.; Kuehn, M.J. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Secretes Active Heat-labile Enterotoxin via Outer Membrane Vesicles. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 12489–12496. [[CrossRef](#)]
- Horstman, A.L.; Kuehn, M.J. Bacterial Surface Association of Heat-labile Enterotoxin through Lipopolysaccharide after Secretion via the General Secretory Pathway. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32538–32545. [[CrossRef](#)]
- Moss, J.; Richardson, S.H. Activation of adenylate cyclase by heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity similar to that of cholera toxin. *J. Clin. Invest.* **1978**, *62*, 281–285. [[CrossRef](#)]
- Cheng, S.H.; Rich, D.P.; Marshall, J.; Gregory, R.J.; Welsh, M.J.; Smith, A.E. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* **1991**, *66*, 1027–1036. [[CrossRef](#)]
- Sheppard, D.N.; Welsh, M.J. Structure and Function of the CFTR Chloride Channel. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, S23–S45. [[CrossRef](#)]
- Hu, J.C.; Mathias-Santos, C.; Greene, C.J.; King-Lyons, N.D.; Rodrigues, J.F.; Hajishengallis, G.; Ferreira, L.C.S.; Connell, T.D. Intradermal Administration of the Type II Heat-Labile Enterotoxins LT-IIb and LT-IIc of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Enhances Humoral and CD8⁺ T Cell Immunity to a Co-Administered Antigen. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e113978. [[CrossRef](#)]
- Connell, T.D. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: The critical role of ganglioside binding in immunomodulation by Type I and Type II heat-labile enterotoxins. *Expert Rev. Vaccines* **2007**, *6*, 821–834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hajishengallis, G.; Arce, S.; Gockel, C.; Connell, T.; Russell, M. Immunomodulation with Enterotoxins for the Generation of Secretory Immunity or Tolerance: Applications for Oral Infections. *J. Dent. Res.* **2005**, *84*, 1104–1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Arce, S.; Nawar, H.F.; Muehlinghaus, G.; Russell, M.W.; Connell, T.D. In Vitro Induction of Immunoglobulin A (IgA)- and IgM-Secreting Plasma Blasts by Cholera Toxin Depends on T-Cell Help and Is Mediated by CD154 Up-Regulation and Inhibition of Gamma Interferon Synthesis. *Infect. Immun.* **2007**, *75*, 1413–1423. [[CrossRef](#)]
- Evans, D.G.; Silver, R.P.; Chase, D.G.; Gorbach, S.L. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* **1975**, *12*, 656–667. [[CrossRef](#)]

19. Dean, A.G.; Ching, Y.-C.; Williams, R.G.; Harden, L.B. Test for *Escherichia coli* Enterotoxin Using Infant Mice: Application in a Study of Diarrhea in Children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* **1972**, *125*, 407–411. [\[CrossRef\]](#)
20. Smith, H.; Hall, W.S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. *J. Pathol. Bacteriol.* **1963**, *93*, 449–529. [\[CrossRef\]](#)
21. De, S.N.; Bhattacharya, K.; Sarkar, J.K. A study of the pathogenicity of strains of bacterium coli from acute and chronic enteritis. *J. Pathol. Bacteriol.* **1956**, *71*, 201–209. [\[CrossRef\]](#)
22. Guidry, J.J.; Cárdenas, L.; Cheng, E.; Clements, J.D. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.* **1997**, *65*, 4943–4950. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Varas, M.; Ortiz-Severin, J.; Marcoleta, A.E.; Díaz-Pascual, F.; Allende, M.L.; Santiviago, C.A.; Chávez, F.P. Salmonella Typhimurium induces cloacitis-like symptoms in zebrafish larvae. *Microb. Pathog.* **2017**, *107*, 317–320. [\[CrossRef\]](#)
24. Jim, K.K.; Engelen-Lee, J.; van der Sar, A.M.; Bitter, W.; Brouwer, M.C.; van der Ende, A.; Veening, J.-W.; van de Beek, D.; Vandembroucke-Grauls, C.M.J.E. Infection of zebrafish embryos with live fluorescent *Streptococcus pneumoniae* as a real-time pneumococcal meningitis model. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 1–13. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Saralahti, A.; Rämetsä, M. Zebrafish and Streptococcal Infections. *Scand. J. Immunol.* **2015**, *82*, 174–183. [\[CrossRef\]](#)
26. Basu, S.; Sachidanandan, C. Zebrafish: A Multifaceted Tool for Chemical Biologists. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 7952–7980. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Lieschke, G.J.; Currie, P.D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* **2007**, *8*, 353–367. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Kari, G.; Rodeck, U.; Dicker, A.P. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2007**, *82*, 70–80. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Langheinrich, U. Zebrafish: A new model on the pharmaceutical catwalk. *BioEssays* **2003**, *25*, 904–912. [\[CrossRef\]](#)
30. Melo, B.D.S.; Fernandes, B.H.V.; Lopes-Ferreira, M.V.A.; Henrique, C.; Piazza, R.M.F.; Luz, D. Zebrafish embryo sensitivity test as in vivo platform to anti-Shiga toxin compound screening. *Braz. J. Microbiol.* **2020**, *51*, 1021–1027. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Kavaliauskis, A.; Arnemo, M.; Speth, M.; Lagos, L.; Rishovd, A.-L.; Estepa, A.; Griffiths, G.; Gjoen, T. Protective effect of a recombinant VHSV-G vaccine using poly(I:C) loaded nanoparticles as an adjuvant in zebrafish (*Danio rerio*) infection model. *Dev. Comp. Immunol.* **2016**, *61*, 248–257. [\[CrossRef\]](#)
32. Kavaliauskis, A.; Arnemo, M.; Kim, S.-H.; Ulanova, L.; Speth, M.; Novoa, B.; Dios, S.; Evensen, Ø.; Griffiths, G.W.; Gjoen, T. Use of Poly(I:C) Stabilized with Chitosan As a Vaccine-Adjuvant Against Viral Hemorrhagic Septicemia Virus Infection in Zebrafish. *Zebrafish* **2015**, *12*, 421–431. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Liu, X.; Zhang, H.; Gao, Y.; Zhang, Y.; Wu, H.; Zhang, Y. Efficacy of chitosan oligosaccharide as aquatic adjuvant administered with a formalin-inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine. *Fish Shellfish Immunol.* **2015**, *47*, 855–860. [\[CrossRef\]](#)
34. Bailone, R.L.; Fukushima, H.C.S.; Fernandes, B.H.V.; De Aguiar, L.K.; Corrêa, T.; Janke, H.; Setti, P.G.; Roça, R.D.O.; Borra, R.C. Zebrafish as an alternative animal model in human and animal vaccination research. *Lab. Anim. Res.* **2020**, *36*, 1–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Howe, K.; Clark, M.D.; Torroja, C.F.; Torrance, J.; Berthelot, C.; Muffato, M.; Collins, J.E.; Humphray, S.; McLaren, K.; Matthews, L.; et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature* **2013**, *496*, 498–503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Zhao, X.; Pack, M.T. Modeling intestinal disorders using zebrafish. In *The Zebrafish Disease Models and Chemical Screens*, 4th ed.; Zon, L.I., Westerfield, H.M., Detrich, W., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 148, pp. 241–270. [\[CrossRef\]](#)
37. Flores, E.M.; Nguyen, A.T.; Odem, M.A.; Eisenhoffer, G.T.; Krachler, A.M. The zebrafish as a model for gastrointestinal tract-microbe interactions. *Cell. Microbiol.* **2020**, *22*, e13152. [\[CrossRef\]](#)
38. Saslowsky, D.E.; Cho, J.A.; Chinnapen, H.; Massol, R.H.; Chinnapen, D.J.-F.; Wagner, J.S.; De Luca, H.E.; Kam, W.; Paw, B.H.; Lencer, W.I. Intoxication of zebrafish and mammalian cells by cholera toxin depends on the flotillin/reggie proteins but not Derlin-1 or -2. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 4399–4409. [\[CrossRef\]](#)
39. Donta, S.T.; Moon, H.W.; Whipp, S.C. Detection of Heat-Labile *Escherichia coli* Enterotoxin with the Use of Adrenal Cells in Tissue Culture. *Science* **1974**, *183*, 334–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Guerrant, R.L.; Brunton, L.L.; Schnaitman, T.C.; Rebhun, L.I.; Gilman, A.G. Cyclic Adenosine Monophosphate and Alteration of Chinese Hamster Ovary Cell Morphology: A Rapid, Sensitive In Vitro Assay for the Enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1974**, *10*, 320–327. [\[CrossRef\]](#)
41. Ozaki, C.Y.; Silveira, C.R.F.; Andrade, F.B.; Nepomuceno, R.; Silva, A.; Munhoz, D.D.; Yamamoto, B.B.; Luz, D.; Abreu, P.A.E.; Horton, D.S.P.Q.; et al. Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic *E. coli*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0131484. [\[CrossRef\]](#)
42. Dorsey, F.C.; Fischer, J.F.; Fleckenstein, J.M. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **2006**, *8*, 1516–1527. [\[CrossRef\]](#)
43. Bowman, C.C.; Clements, J.D. Differential Biological and Adjuvant Activities of Cholera Toxin and *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin Hybrids. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 1528–1535. [\[CrossRef\]](#)
44. Lopes, L.M.; Maroof, A.; Dougan, G.; Chain, B.M. Inhibition of T-cell Response by *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin-Treated Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 6891–6895. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

45. Lea, T. Caco-2 Cell Line. In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vivo and Ex Vivo Models*, 1st ed.; Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Exposito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., Requena, T., Swiatecka, D., Wichers, H., Eds.; Springer Open: New York, NY, USA, 2015; pp. 103–111. [\[CrossRef\]](#)
46. Jahn, K.A.; Biazik, J.M.; Braet, F. GM1 Expression in Caco-2 Cells: Characterisation of a Fundamental Passage-dependent Transformation of a Cell Line. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 3751–3762. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Kimmel, C.B.; Ballard, W.W.; Kimmel, S.R.; Ullmann, B.; Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **1995**, *203*, 253–310. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Cieplak, W.; Messer, R.J.; Konkel, M.E.; Grant, C.C.R. Role of a potential endoplasmic reticulum retention sequence (REDEL) and the Golgi complex in the cytotonic activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Mol. Microbiol.* **1995**, *16*, 789–800. [\[CrossRef\]](#)
49. Lencer, W.I.; Constable, C.; Moe, S.; Jobling, M.G.; Webb, H.M.; Ruston, S.; Madara, J.L.; Hirst, T.R.; Holmes, R.K. Targeting of cholera toxin and *Escherichia coli* heat labile toxin in polarized epithelia: Role of COOH-terminal KDEL. *J. Cell Biol.* **1995**, *131*, 951–962. [\[CrossRef\]](#)
50. Lencer, W.I.; Moe, S.; Rufo, P.A.; Madara, J.L. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10094–10098. [\[CrossRef\]](#)
51. Evans, D.G.; Evans, D.J.; Pierce, N.F. Differences in the Response of Rabbit Small Intestine to Heat-Labile and Heat-Stable Enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1973**, *7*, 873–880. [\[CrossRef\]](#)
52. Allen, K.P.; Randolph, M.M.; Fleckenstein, J.M. Importance of Heat-Labile Enterotoxin in Colonization of the Adult Mouse Small Intestine by Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 869–875. [\[CrossRef\]](#)
53. Byrd, W.; Cassels, F.J. Mucosal immunization of BALB/c mice using enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors CFA/1 and CS6 administered with and without a mutant heat-labile enterotoxin. *Vaccine* **2003**, *21*, 1884–1893. [\[CrossRef\]](#)
54. Byrd, W.; Mog, S.R.; Cassels, F.J. Pathogenicity and Immune Response Measured in Mice following Intranasal Challenge with Enterotoxigenic *Escherichia coli* Strains H10407 and B7A. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 13–21. [\[CrossRef\]](#)
55. Bolick, D.T.; Medeiros, P.H.Q.S.; Ledwaba, S.E.; Lima, A.A.M.; Nataro, J.P.; Barry, E.M.; Guerrant, R.L. Critical Role of Zinc in a New Murine Model of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea. *Infect. Immun.* **2018**, *86*. [\[CrossRef\]](#)
56. Luiz, W.B.; Rodrigues, J.F.; Crabb, J.H.; Savarino, S.J.; Ferreira, L.C.S. Maternal Vaccination with a Fimbrial Tip Adhesin and Passive Protection of Neonatal Mice against Lethal Human Enterotoxigenic *Escherichia coli* Challenge. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 4555–4564. [\[CrossRef\]](#)
57. Klipstein, F.A.; Engert, R.F.; Clements, J.D. Protection in rats immunized with *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* **1981**, *34*, 637–639. [\[CrossRef\]](#)
58. Spira, W.M.; Sack, R.B.; Froehlich, J.L. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Infect. Immun.* **1981**, *32*, 739–747. [\[CrossRef\]](#)
59. Nag, D.; Mitchell, K.; Breen, P.; Withey, J.H. Quantifying *Vibrio cholerae* Colonization and Diarrhea in the Adult Zebrafish Model. *J. Vis. Exp.* **2018**, *137*, e57767. [\[CrossRef\]](#)
60. Manneh-Roussel, J.; Haycocks, J.R.J.; Magán, A.; Perez-Soto, N.; Voelz, K.; Camilli, A.; Krachler, A.-M.; Grainger, D.C. cAMP Receptor Protein Controls *Vibrio cholerae* Gene Expression in Response to Host Colonization. *mBio* **2018**, *9*. [\[CrossRef\]](#)
61. Runft, D.L.; Mitchell, K.C.; Abuaita, B.H.; Allen, J.P.; Bajaj, S.; Ginsburg, K.; Neely, M.N.; Withey, J.H. Zebrafish as a Natural Host Model for *Vibrio cholerae* Colonization and Transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *80*, 1710–1717. [\[CrossRef\]](#)
62. Dubreuil, J.D. Antibacterial and Antidiarrheal Activities of Plant Products against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Toxins* **2013**, *5*, 2009–2041. [\[CrossRef\]](#)
63. OECD. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2 Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test*; OECD Publishing: Paris, France, 2013. [\[CrossRef\]](#)
64. Ali, S.; Champagne, D.L.; Spaink, H.P.; Richardson, M.K. Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* **2011**, *93*, 115–133. [\[CrossRef\]](#)
65. Grunwald, D.J.; Eisen, J.S. Headwaters of the zebrafish—Emergence of a new model vertebrate. *Nat. Rev. Genet.* **2002**, *3*, 717–724. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Gerlai, R.; Lahav, M.; Guo, S.; Rosenthal, A. Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2000**, *67*, 773–782. [\[CrossRef\]](#)
67. Tanguay, R.L.; Reimers, M.J. Analysis of Ethanol Developmental Toxicity in Zebrafish. *Adv. Struct. Saf. Stud.* **2008**, *447*, 63–74. [\[CrossRef\]](#)
68. Dahm, R.; Geisler, R. Learning from Small Fry: The Zebrafish as a Genetic Model Organism for Aquaculture Fish Species. *Mar. Biotechnol.* **2006**, *8*, 329–345. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Liang, S.; Hajishengallis, G. Heat-Labile Enterotoxins as Adjuvants or Anti-Inflammatory Agents. *Immunol. Investig.* **2010**, *39*, 449–467. [\[CrossRef\]](#)
70. Van Ginkel, F.W.; Jackson, R.J.; Yoshino, N.; Hagiwara, Y.; Metzger, D.J.; Connell, T.D.; Vu, H.L.; Martin, M.; Fujihashi, K.; McGhee, J.R. Enterotoxin-Based Mucosal Adjuvants Alter Antigen Trafficking and Induce Inflammatory Responses in the Nasal Tract. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 6892–6902. [\[CrossRef\]](#)
71. Van Ginkel, F.W.; Jackson, R.J.; Yuki, Y.; McGhee, J.R. Cutting Edge: The Mucosal Adjuvant Cholera Toxin Redirects Vaccine Proteins into Olfactory Tissues. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 4778–4782. [\[CrossRef\]](#)

-
72. Zoetewij, J.P.; Epperson, D.E.; Porter, J.D.; Zhang, C.X.; Frolova, O.Y.; Constantinides, A.P.; Fuhrmann, S.R.; El-Amine, M.; Tian, J.-H.; Ellingsworth, L.R.; et al. GM1 Binding-Deficient Exotoxin Is a Potent Noninflammatory Broad Spectrum Intradermal Immunoadjuvant. *J. Immunol.* **2006**, *177*, 1197–1207. [[CrossRef](#)]
 73. Rigoni, M.; Paoli, M.; Milanesi, E.; Caccin, P.; Rasola, A.; Bernardi, P.; Montecucco, C. Snake Phospholipase A2 Neurotoxins Enter Neurons, Bind Specifically to Mitochondria, and Open Their Transition Pores. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 34013–34020. [[CrossRef](#)]

Supplementary Materials: Heat-Labile Toxin from Enterotoxigenic *Escherichia Coli* Causes Systemic Impairment in Zebrafish Model

Camila Henrique, Maria Alice Pimentel Falcão, Luciana De Araújo Pimenta, Adolfo Luís Almeida Maleski, Carla Lima, Thais Mitsunari, Sandra Coccuzzo Sampaio, Mônica Lopes-Ferreira and Roxane Maria Fontes Piazza

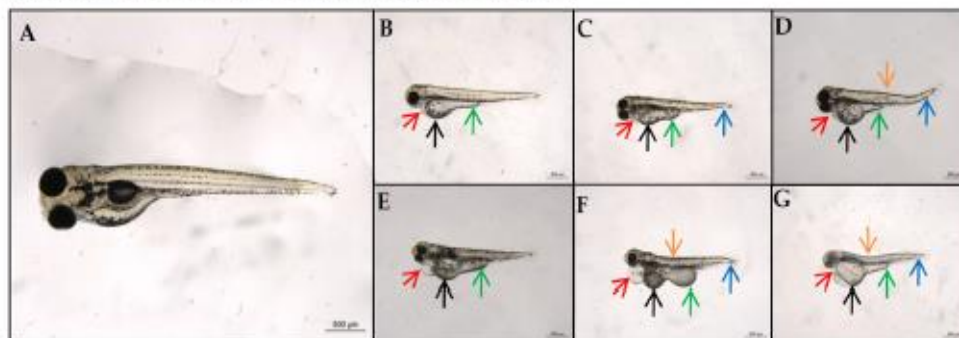


Figure S1. Phenotypes observed in zebrafish larvae, after FET test with different concentrations of LT-I toxin for 96 h. (A) Healthy zebrafish larva (control); (B–G) Larva evaluated after intoxication with LT-I (B) 0.31 nM. (C) 0.62 nM. (D) 1.5 nM. (E) 2.5 nM. (F and G) 5 nM. Red arrow: enlarged cardiac cavity; Black arrow: yolk edema; Green arrow: urogenital edema; Blue arrow: caudal curvature; Orange arrow: curvature of the spine.