

# EFEITO ADJUVANTE DA SUBUNIDADE B RECOMBINANTE DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE *ESCHERICHIA COLI* (rLTB) DEPENDE DA DOSE DE ADMINISTRAÇÃO

FISCHER, G.<sup>1</sup>; SIEDLER, B.<sup>2\*</sup>; CONCEIÇÃO, F.R.<sup>3</sup>; MORAES, C.M.M.<sup>3</sup>;  
FERREIRA, L.N.<sup>2</sup>; VILELA, C.O.<sup>2</sup>; VARGAS, G.D.<sup>2</sup>; HÜBNER, S.O.<sup>2</sup>; VIDOR, T.<sup>2</sup>;  
ROEHE, P.M.<sup>1</sup>

## Resumo

A busca por novos adjuvantes vacinais tem levado ao estudo de várias substâncias, como a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB). Apesar de reconhecida como um potente adjuvante de mucosa, escassas são as informações a respeito da utilização parenteral da LTB. Este estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações (2,5, 10, 20, 30 e 40 µg/dose) de uma LTB recombinante (rLTB) quando utilizada como adjuvante por via intramuscular (IM) ou subcutânea (SC). A utilização de 10 µg/dose de rLTB por via IM, associada a uma vacina inativada contra o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), inoculada em camundongos, proporcionou os maiores títulos médios de anticorpos anti-SuHV-1 ( $p < 0,05$ ). Concentrações menores ou maiores da proteína resultaram em títulos menores de anticorpos anti-SuHV-1, o que pode estar relacionado à imunogenicidade da rLTB uma vez que, quanto menor a resposta humoral anti-rLTB, medida por ELISA, maior foi a sua atividade adjuvante. As mesmas vacinas aplicadas por via SC promoveram títulos mais baixos de anticorpos anti-SuHV-1. O teste de desafio com SuHV-1 realçou a capacidade adjuvante da rLTB e a influência exercida pela concentração de uso e via de inoculação utilizadas sobre o sistema imunológico. As vacinas aplicadas por via IM, na concentração de 10 µg/dose resultaram em maior proteção e melhor relação custo/benefício. Portanto, a rLTB pode auxiliar significativamente na indução de anticorpos contra o SuHV-1 em camundongos, especialmente se utilizada na concentração de 10 µg/dose, por via intramuscular, representando uma nova alternativa na produção de vacinas.

## 1. Introdução

Apesar do grande avanço tecnológico da vacinologia nas últimas décadas, muitas proteínas solúveis, antígenos purificados e de baixa massa molecular podem ser pouco imunogênicos, necessitando a associação com substâncias adjuvantes (LECLERC, 2003). Um grande número de substâncias tem sido avaliado quanto a sua capacidade adjuvante, dentre as quais se destacam as emulsões oleosas, surfactantes naturais e sintéticos, sais inorgânicos, citocinas e derivados bacterianos, como a subunidade B da enterotoxina termolábil (LTB) de *Escherichia coli*, produzida por determinadas cepas enterotoxigênicas (BREWER, 2006; CONCEIÇÃO et al., 2006).

A LTB é uma potente molécula sinalizadora, capaz de modular a resposta do sistema imunológico (SIMMONS et al., 2001), resultando em imunossupressão ou imunoestimulação. A atividade adjuvante da LTB tem sido avaliada em experimentos envolvendo imunizações por via subcutânea (YAMAMOTO et al., 1997), intramuscular (CONCEIÇÃO et al., 2006), intraperitoneal (AGREN et al., 1999) e intravenosa (HORNQUIST & LYCKE, 1993). No entanto, somente sua ação como adjuvante da imunidade de mucosa está consolidada entre os pesquisadores (SIMMONS et al., 2001; YAMANAKA et al., 2006). Estudos sobre a atividade adjuvante parenteral da LTB são escassos (WELTZIN et al., 2000). Além disso, não existe nenhum estudo avaliando a influência de diferentes concentrações de LTB sobre a resposta imune a vacinas.

<sup>1</sup> – Centro de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS;

<sup>2</sup> – Laboratório de Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel;

<sup>3</sup> – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito adjuvante de diferentes concentrações de LTB recombinante (rLTB), quando inoculada por via IM, sobre a resposta imune de camundongos. Para tanto, em função de nossa experiência prévia, foi utilizada como modelo uma vacina inativada contendo herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1).

## 2. Materiais e métodos

A rLTB foi fornecida pelo Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). As vacinas experimentais foram produzidas a partir de uma amostra do SuHV-1 isolada de um surto da Doença de Aujeszky, fornecida pelo Laboratório de Virologia e Imunologia, da UFPel, seguindo metodologia conhecida (FISCHER et al., 2007).

Para avaliação da capacidade adjuvante da rLTB, 35 camundongos BALB/c fêmeas, com 6-8 semanas de idade, divididos em 7 grupos de 5 animais, foram inoculados nos dias 0 e 21 com 250 µl das vacinas inativadas, associadas ou não à rLTB. Os grupos 1 e 2, utilizados como controle negativo, foram inoculados com PBS e PBS+SuHV-1, respectivamente. Os grupos 3 a 7 foram inoculados com a suspensão inativada de SuHV-1, acrescida de 2,5, 10, 20, 30 e 40 µg/dose de rLTB, respectivamente. Todas as vacinas, inoculadas por via IM, foram preparadas a partir de suspensões com o mesmo título infeccioso inicial.

Para avaliação da resposta imune humoral, amostras de sangue foram coletadas através de punção do plexo venoso retro-ocular nos dias 0, 21 e 42. O soro, após processado, foi armazenado a -20° C. A titulação dos anticorpos neutralizantes contra o SuHV-1 foi feita pela técnica de soroneutralização (FISCHER et al., 2007). Cada soro foi diluído de 1:4 até 1:256 e testado em quadruplicata. O título de anticorpos foi calculado pelo método de Behrendts & Kärber (MAYR et al., 1982). Por esta metodologia, e partindo-se de uma diluição inicial dos soros de 1:4, conforme descrito, foi possível a detecção de títulos iguais ou superiores a 3,35, o que corresponde a 1,74 log<sub>2</sub>. Todos os títulos abaixo deste valor foram considerados soronegativos.

Para avaliar a capacidade de proteção das vacinas experimentais, 21 dias após a segunda vacinação todos os animais foram desafiados por via subcutânea com 0,1 ml contendo 50 doses letais (DL) de SuHV-1. Diariamente, até o décimo dia após o desafio, o número de animais mortos por tratamento foi registrado.

A detecção de anticorpos anti-rLTB foi determinada em um imunoensaio do tipo ELISA. Resumidamente, placas de poliestireno (Cral) foram sensibilizadas durante a noite a 4° C com 250 ng/cavidade de rLTB, diluída em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6. Após tríplice lavagem das placas com PBS-T, duplicatas dos soros nas diluições 1:200 e 1:400 foram incubadas por 1 hora a 37° C. Como controle positivo foi utilizada IgG de coelho anti-toxina colérica, nas diluições 1:250 ou 1:500. Após três lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas por 1 h a 37° C com IgG de cabra anti-IgG de camundongo, ou IgG de cabra anti-IgG de coelho, ambas conjugadas com peroxidase e na diluição 1:1000. Após três lavagens com PBS-T, as reações foram reveladas com uma solução de OPD (o-phenylenediamine dihydrochloride - Sigma) e peróxido de hidrogênio como recomendado. A leitura da densidade ótica foi feita a 450 nm (DO<sub>450</sub>) em leitor de ELISA (Dynatech Labs Inc., Chantilly, VA, USA), 15 minutos após adição do revelador.

Os dados foram expressos pela média ± desvio padrão e avaliados estatisticamente usando-se análise de variância (ANOVA). O teste LSD foi utilizado para determinar diferenças significativas (p<0.05) entre as médias de cada tratamento através do programa SAS.

### 3. Resultados

Os resultados das titulações de anticorpos neutralizantes e o número de animais mortos após teste de desafio são representados na Tabela 1. Conforme esperado, os controles (PBS ou PBS + SuHV-1) não apresentaram títulos detectáveis de anticorpos ( $< 1,74 \log_2$ ), e portanto foram considerados soronegativos. Além disso, todos os animais destes grupos morreram após o desafio com SuHV-1. A utilização de 2,5  $\mu\text{g}/\text{dose}$  de rLTB foi insuficiente para estimular uma resposta humoral contra o SuHV-1, uma vez que todos os animais destes tratamentos também apresentaram-se soronegativos. O maior título de anticorpos anti-SuHV-1 foi observado no grupo de animais inoculados com a vacina experimental contendo 10  $\mu\text{g}/\text{dose}$  de rLTB. Surpreendentemente, à medida em que aumentaram as concentrações desta proteína, houve redução na média dos títulos de anticorpos neutralizantes do SuHV-1, de 3,54  $\log_2$  (10  $\mu\text{g}/\text{dose}$  de rLTB) para 0,5  $\log_2$  (40  $\mu\text{g}/\text{dose}$  de rLTB).

Tabela 1: Títulos de anticorpos neutralizantes ( $\log_2$ ) de camundongos imunizados com SuHV-1 associado a diferentes concentrações de rLTB, por via intramuscular (IM) e proteção mediante desafio com SuHV-1

Tratamentos	Título de anticorpos $\pm$ SD	Desafio <sup>1</sup>	Via de inoculação
PBS	0 $\pm$ 0	5/5	IM <sup>2</sup>
PBS + SuHV-1	0 $\pm$ 0	5/5	IM
Ag + 2,5 $\mu\text{g}/\text{dose}$ LTB	0 $\pm$ 0	4/5	IM
Ag + 10 $\mu\text{g}/\text{dose}$ LTB	3,54 $\pm$ 0,80	1/5	IM
Ag + 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$ LTB	2,65 $\pm$ 0,13	1/5	IM
Ag + 30 $\mu\text{g}/\text{dose}$ LTB	1,00 $\pm$ 0,22	2/5	IM
Ag + 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$ LTB	0,50 $\pm$ 0,33	3/5	IM

<sup>1</sup> – relação de animais mortos/total de animais desafiados. Cada animal foi desafiado com 50 DL do SuHV-1;

<sup>2</sup> – intramuscular;

Na avaliação da capacidade de proteção das vacinas que utilizaram concentrações entre 10 e 40  $\mu\text{g}/\text{dose}$  de rLTB como adjuvante, pode-se perceber, conforme esperado, um aumento do número de animais mortos à medida em que reduziram os títulos de anticorpos. A detecção de anticorpos anti-rLTB foi avaliada mediante ELISA. Os animais apresentaram níveis crescentes de anticorpos contra a rLTB à medida que aumentaram as concentrações desta proteína na vacina (Figura 1). Além disso, estes níveis também foram crescentes entre a primeira e a última coleta de sangue ( $p < 0,05$ ).

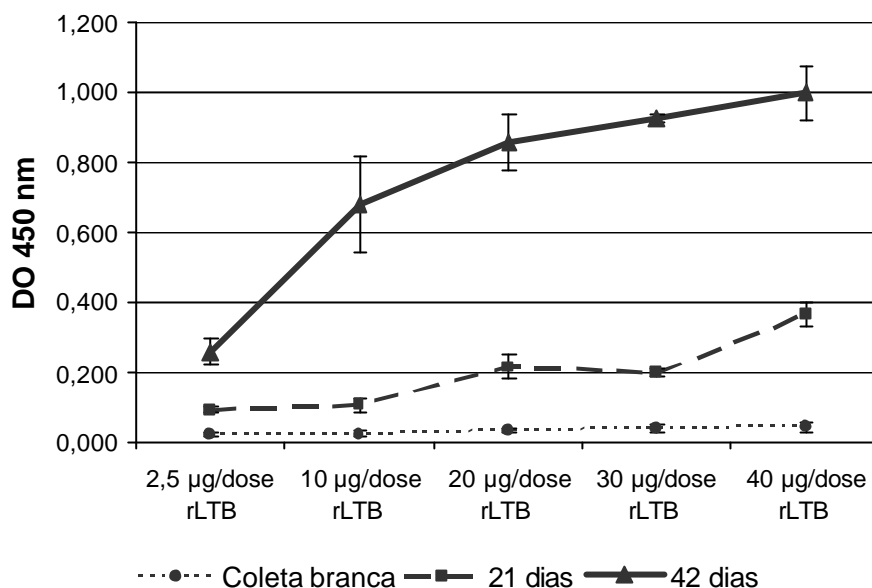


Fig. 1: Níveis de anticorpos anti-rLTB, determinados por ELISA, de camundongos imunizados com SuHV-1, por via intramuscular, utilizando 2,5, 10, 20, 30 ou 40 µg/dose de rLTB como adjuvante. As amostras de sangue foram coletadas no dia 0 (coleta branca), 21 e 42 após a primeira inoculação. Dados representados pela média da absorbância a 450 nm, de soros diluídos 1:200 ± desvio padrão (n=5).

#### 4. Discussão

Neste estudo foi avaliada a capacidade adjuvante da LTB recombinante quando integrante de uma vacina inativada anti-SuHV-1, inoculada por via intramuscular em camundongos. O uso de 10 µg/dose de rLTB proporcionou os maiores títulos médios de anticorpos anti-SuHV-1 dentre as concentrações avaliadas ( $p < 0,05$ ), sugerindo atividade adjuvante da rLTB, enquanto que a concentração de 2,5 µg/dose, por sua vez, não estimulou a resposta humoral (Tabela 1). Estes dados sugerem a necessidade de uma concentração mínima de rLTB para estimulação da resposta humoral, quando inoculada por via IM, provavelmente entre 2,5 e 10 µg/dose. De forma controversa, a co-administração de rLTB por via intramuscular não incrementou a resposta imune de galinhas vacinadas com antígenos recombinantes (FINGERUT et al., 2006). A hipótese postulada por estes pesquisadores é que a habilidade da rLTB incrementar a resposta imune contra antígenos co-administrados depende do antígeno e da via de administração.

Surpreendentemente, nas demais vacinas o título médio de anticorpos anti-SuHV-1 diminuiu à medida que as concentrações de rLTB aumentaram (Tabela 1). Uma vez que a LTB é imunogênica (RANALLO et al., 2005), foi realizado um ELISA para a mensuração de anticorpos séricos anti-rLTB. De forma coerente, o nível de anticorpos séricos anti-rLTB foi inversamente proporcional ao nível de anticorpos anti-SuHV-1, sugerindo que a atividade adjuvante da segunda dose de rLTB pode ter sido neutralizada pelos anticorpos anti-rLTB gerados após a primeira dose vacinal. A resultante sub-dose do adjuvante provocou o rápido processamento do antígeno pelas células do sistema imune, induzindo uma resposta humoral fraca (COX & COULTER, 1997), justificando, assim, a redução dos títulos médios de anticorpos anti-SuHV-1 das vacinas, à medida em que aumentaram as concentrações de rLTB.

Na avaliação da capacidade de proteção das vacinas, todos os animais utilizados neste estudo foram desafiados com 50 doses letais (DL) do SuHV-1, 21 dias após a última vacinação. Os resultados obtidos realçam a capacidade adjuvante da rLTB e a

influência exercida pela concentração de uso sobre o sistema imunológico. Como pode ser observado na Tabela 1, a utilização de 10 µg/dose de rLTB, além de ter proporcionado os maiores títulos médios de anticorpos, também conferiu os maiores percentuais de proteção após desafio com SuHV-1.

Muitos estudos sugerem que a LTB atua sobre o sistema imunológico modulando-o para uma resposta humoral (Th2) (SIMMONS et al., 2001; PETROVSKA et al., 2003). No entanto, a proteção dos camundongos frente ao desafio com SuHV-1, sugere que a rLTB também incrementou a resposta imune celular, visto que WITTMANN (1982) comprovou que este tipo de imunidade é responsável pela proteção contra a Doença de Aujeszky, causada pelo SuHV-1.

Os dados apresentados neste estudo permitem concluir que a rLTB pode auxiliar significativamente na indução de imunidade contra o SuHV-1 em camundongos, especialmente se utilizada por via intramuscular na concentração de 10 µg/dose. A concentração desta proteína exerce influência direta sobre o seu desempenho como substância adjuvante, o que está relacionado à produção de anticorpos anti-rLTB. A tendência observada neste trabalho foi de que quanto menor a resposta anti-rLTB, maior é a atividade adjuvante desta proteína.

## Referencias

AGREN, L.C.; EKMAN, L.; LOWENADLER, B.; NEDRUD, J.G.; LYCKE, N.Y. Adjuvanticity of the cholera toxin A1-based gene protein, CTA1-DD, is critically dependent on the ADP-ribosyltransferase and Ig-binding activity. *J Immunol* 1999;162:2432-40.

BREWER, J.M. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006;102:10-15.

CONCEIÇÃO, F.R.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. *Vaccine* 2006;24:5734-43.

COX, J.C.; COULTER, A.R. Adjuvants – a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997;15(3):248-56.

FINGERUT, E.; GUTTER, B.; GOLDWAY, M.; ELIAHOO, D.; PITCOVSKI, J. B subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;112:253-63.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; DUMMER, L.A.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O.; et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. *Vaccine* 2007;25:1250-6.

HORNQUIST, E.; LYCKE, N. Cholera toxin adjuvant greatly promotes antigen printing of T cells. *Eur J Immunol* 1993;23:2136-43.

LECLERC, C. New approaches in vaccine development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2003;26:329-41.

MAYR, A.; BACHMANN, P.A.; BIBRACK, B.M.; WITTMANN, G. *Virologische Arbeitsmethoden - Band IV - Sicherheit bei virologischen arbeiten - Biometrische Methoden*. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, 1982.

PETROVSKA, L.; LOPES, L.; SIMMONS, C.P.; PIZZA, M.; DOUGAN, G.; CHAIN, B.M. Modulation of dendritic cell endocytosis and antigen processing pathways by *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and mutant derivatives. *Vaccine* 2003;21:1445-54.

RANALLO, R.T.; FONSEKA, C.P.; CASSELS, F.; SRINIVASAN, J.; VENKATESAN, M.M. Construction and characterization of bivalent *Shigella flexneri* 2a vaccine strains SC608 (pCFAI) and SC608 (pCFAI/LTB) that express antigens from Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2005;73:258-67.

SIMMONS, C.P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B.M.; WILLIAMS, N.A. et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scand J Immunol* 2001;53:218-26.

WELTZIN, R.; GUY, B.; THOMAS JR, W.D.; GIANNASCA, P.J.; MONATH, T.P. Parenteral adjuvant activities of *Escherichia coli* heat-labile toxin and its B subunit for immunization of mice against gastric *Helicobacter pylori* infection. *Infect Immun* 2000;68:2775-82.

WITTMANN, G. Aujeszky's disease. *An Res Dev* 1982;16:7-32.

YAMAMOTO, S.; TAKEDA, Y.; YAMAMOTO, M.; KURAZONO, H.; IMAOKA, K.; YAMAMOTO, M.; et al. Mutants in the ADP-ribosyltransferase cleft of cholera toxin take diarrhea-genicity but retain adjuvanticity. *J Exp Med* 1997;185:1203-10.

YAMANAKA, H.; ISHIBASHI, D.; YAMAGUCHI, N.; YOSHIKAWA, D.; NAKAMURA, R.; OKIMURA, N.; et al. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Vaccine* 2006;24:2815-23.