

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADJUVANTE DA SUBUNIDADE FIMBRIAL PRINCIPAL RECOMBINANTE DA FIMBRIA TIPO 1 DE *Salmonella Enteritidis*

BAMPI, Suely Ribeiro^{1,2}; SEHN, Carla Pohl²; PHILIPPSEN, Francine Rodrigues², SANTOS, Marina dos^{2,3}

¹ Bolsista CNPq, Faculdade de Nutrição, UFPel

² Laboratório de Imunologia Aplicada, CDTEC/ Biotecnologia, UFPel

³ Faculdade de Nutrição, UFPel

suely_rbampi@hotmail.com

MOREIRA, Ângela Nunes^{2,3}

² Laboratório de Imunologia Aplicada, CDTEC/ Biotecnologia, UFPel

³ Faculdade de Nutrição, UFPel

1 INTRODUÇÃO

As pesquisas na área da saúde pública mundial crescem constantemente, com vistas a proporcionar a população uma maior longevidade e qualidade de vida, combatendo doenças infecciosas. Assim a vacinação é uma das estratégias que tem sido cada vez mais estudadas e utilizadas pela sua economia e eficácia na prevenção e no controle de doenças causadas por micro-organismos (ULMER, 2006). Apesar dos grandes avanços tecnológicos alcançados, ainda hoje várias vacinas são pouco imunogênicas ou não apresentam resposta imune capaz de prevenir doenças, sendo necessária a associação de adjuvantes (SINGH & O'HAGAN, 2002).

Adjuvantes, dentre eles a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), são substâncias que quando administradas em combinação a um antígeno específico induzem maior resposta imune do que o antígeno sozinho (SINGH & O'HAGAN, 1999). Vários antígenos já foram utilizados para comprovar a eficiência do uso da LTB como adjuvante (FINGERUT et al., 2006; PITCOVSKI et al., 2006). Sua ligação a antígenos pode gerar o desenvolvimento de novas vacinas contra patógenos que invadem o hospedeiro através da mucosa.

O gênero *Salmonella* inclui três espécies, *Salmonella enterica*, *bongori* e *subterranea*. *S. enterica* inclui seis subespécies, porém, somente a *S. enterica* subsp. *enterica* apresenta importância clínica para humanos e é responsável por milhões de casos de toxinfecções de origem alimentar em todo o mundo (LINAM; GERBER, 2007, GRASSL; FINLAY, 2008). Fímbrias são filamentos protéicos responsáveis pelo processo de aderência às células epiteliais e estão envolvidas na patogenicidade da bactéria (WULLT et al., 2001). Em outro trabalho, a subunidade fimbrial principal recombinante da fímbria tipo 1 (rFimA) de *Salmonella Enteritidis* foi selecionada como antígeno modelo para a ligação à LTB, administrada via oral ou parenteral, co-administrada ou fusionada a outros antígenos, já que parece haver uma forte influência do antígeno na atividade adjuvante da LTB (SEHN, 2010). Entretanto, os soros dos animais imunizados somente com rFimA apresentaram níveis de anticorpos maiores ou semelhantes aos dos animais imunizados com rFimA fusionada ou co-administrada a LTB, resultado que sugere que rFimA pode apresentar uma atividade adjuvante. Por isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a potencial atividade

adjuvante da subunidade fimbrial principal recombinante da fímbria tipo 1 (rFimA) de *Salmonella* Enteritidis.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para avaliar a potencial atividade adjuvante da rFimA de *Salmonella* Enteritidis, grupos contendo 6 camundongos BALB/c, foram vacinados com rFimA (grupos 1 e 6), com rFimA fusionada a rLTB (rLTB/FimA, grupos 2 e 7) ou co-administrada à rLTB (rFimA + rLTB, grupos 3 e 8), com rLTB (grupos 4 e 10) e com PBS (controle, grupos 5 e 11) por duas vias: via oral (V.O., grupos 1 a 5) e intramuscular (I.M., grupos 6 a 11). O protocolo de imunização consistiu de 3 doses contendo 60 µg de rFimA e/ou 40 µg de rLTB ou PBS, com intervalo de 10 dias entre cada uma delas (dias 0, 10 e 20).

A resposta imune humoral anti-rLTB das vacinas administradas V.O. e I.M. foi avaliada através de um ELISA indireto, utilizando a proteína recombinante rLTB como antígeno e os soros dos animais vacinados coletados no dia 29 após a 1ª imunização (diluídos 1:100) como anticorpo primário. Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:3000) diluído em PBS-T foi utilizado como anticorpo secundário marcado. Todas as reações ocorreram por 1 h (com exceção da sensibilização que ocorreu overnight), o volume dos reagentes foi de 50 µL/cavidade e após todas as etapas de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL/cavidade de PBS-T. Após a remoção de excesso de conjugado através de 5 lavagens com PBS-T. As reações foram reveladas através da adição da solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD) diluída em tampão fosfato-citrato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂). As placas foram mantidas no escuro por 15 min a temperatura ambiente e a leitura das reações foi realizada em espectrofotômetro para microplacas Thermo Plate a 450 nm. Como controle negativo do ELISA, foi utilizado soro de camundongo não imunizado, e como controle positivo, anticorpo policlonal anti-rFimA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados, como mostra a Figura 1, demonstraram que a rLTB foi capaz de gerar uma resposta de anticorpos antígeno específica. Os maiores níveis de anticorpos anti-rLTB foram detectados nos soros dos animais imunizados I.M. com rFimA co-administrada a LTB seguido dos soros dos animais imunizados com rLTB. Os níveis de anticorpos não diferiram significativamente entre os dois grupos. Entre os grupos imunizados V.O., os vacinados com rFimA co-administrada a LTB e com rLTB, seguidos dos soros dos animais imunizados com a quimera rLTB/rFimA apresentaram os maiores níveis de anticorpos anti-rLTB. Entretanto não houve diferença estatisticamente significativa entre eles. As maiores respostas imunes foram obtidas quando os animais foram imunizados por via intramuscular.

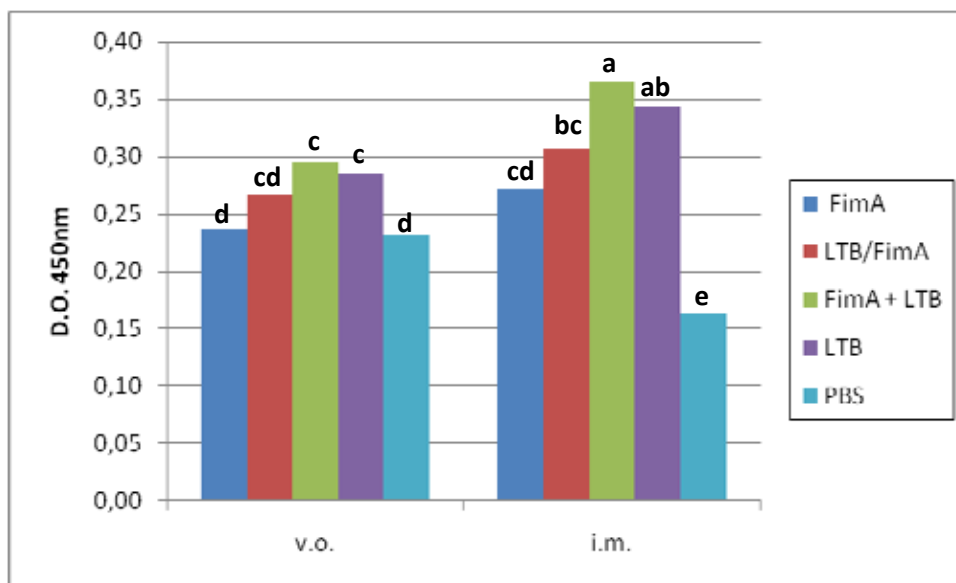


Figura 1. Avaliação da resposta imune humoral anti-rLTB dos soros dos animais imunizados via oral e intramuscular (diluídos 1:100), coletados no dia 29 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto. Os dados estão representados como D.O. média de duplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as médias.

4 CONCLUSÕES

Esses resultados sugerem que a rFimA induziu a produção de anticorpos anti-rLTB quando co-administrada a rFimA (quimera) e assim, apresenta um efeito adjuvante. Entretanto, mais estudos devem ser realizados visando a avaliação do potencial efeito adjuvante da rFimA de *S. Enteritidis*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 *Veterinarian Immunology Immunopathology*, v. 112, p. 253–263, 2006.
- GRASSL G.A.; FINLAY R.B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion Gastroenterology**. v.24, p.22–26, 2008.
- LINAM W.M.; GERBER M.A. Changing epidemiology and prevention of *Salmonella* infections. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 26, p.747–748, 2007.
- PITCOVSKI, J.; BAZAK, Z.; WASSERMAN, E.; ELIAS, O.; LEVY, A.; PERETZ, T.; FINGERUT, E.; FRANKENBURG, S. Heat labile enterotoxin of *E. coli*: a potential adjuvant for transcutaneous cancer immunotherapy. **Vaccine**, 24, 636-643, 2006.

SEHN, Carla Pohl. **Avaliação da atividade adjuvante da subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* fusionada ou co-administrada a rFimA de *Salmonella Enteritidis***. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SINGH, M.; O'HAGAN, D.T. Advances in vaccine adjuvants. **Nature Biotechnology**, v.17, p.1075-1081, 1999.

SINGH, M.; O HAGAN, D.T. Recent advances in vaccine adjuvants. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, p.715-28, 2002.

ULMER, J. B., et al. A gene-based vaccines: recent technical and clinical advances. **TRENDS in molecular medicine**, v.12, n 5, p.216-222, 2006.

WULLT, B.; BERGSTEN, G.; SAMUELSSON, M.; GEBRETSADIK, N.; HULL, R.; SVANBORG, C. The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. **Journal Infectious Diseases**. v.183, p. 43-46, 2001.