

RESPOSTA IMUNE HUMORAL GERADA PELA VACINAÇÃO COM QUIMERAS RECOMBINANTES PARA CONTROLE DO BOTULISMO BOVINO

**CUNHA, Carlos Eduardo Pouey da¹; GIL, Luciana Aquini Fernandes²;
MOREIRA, Gustavo¹; CONCEIÇÃO, Fabricio Rochedo³**

¹Curso de Bacharelado em Biotecnologia, ²Faculdade de Medicina Veterinária, ³Centro de Desenvolvimento Tecnológico - Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.
cpouey@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

Clostridium botulinum é um bacilo anaeróbio formador de esporos encontrado no solo, água e matéria orgânica cujos esporos podem resistir por longos períodos nos mais diversos ambientes, germinando e proliferando em carcaças ou material vegetal em decomposição, onde pode produzir neurotoxinas, as quais são responsáveis pelo botulismo bovino, uma doença fatal caracterizada por paralisia muscular (Smith, 2009). As neurotoxinas botulínicas (BoNTs) são classificadas por suas diferenças antigênicas e são divididas em sete sorotipos: A, B, C₁, D, E, F e G (Smith, 2009), embora tenham ações farmacológicas semelhantes (Simpson, 2004). No Brasil, os surtos de botulismo bovino são causados pelas BoNTs C e D (Dutra et al., 1993; Fernandes, 2001). Nos últimos anos, têm-se registrado surtos em extensas regiões do país acometendo, sobretudo, fêmeas em gestação ou lactação, com a estimativa de centenas de milhares de mortes (Döbereiner et al., 1998), causando grandes prejuízos econômicos para o Brasil.

As BoNTs são compostas por uma cadeia leve (CL) e uma pesada (CP), que formam três domínios característicos (Montecucco & Schiavo, 1995). O domínio catalítico, constituído pela CL, está ligado por uma ponte dissulfeto ao domínio de translocação, que constitui a porção N-terminal da CP. A porção C-terminal da CP, atóxica, constitui o domínio de ligação ao receptor neuronal (CPR), onde estão localizados os epítomos protetores (Ravichandran, 2007). Caso não possa haver ligação entre o domínio CPR e o receptor neuronal, nenhum dano é causado, sendo necessária a presença de anticorpos no momento da intoxicação, os quais podem ser gerados por vacinação (Lee et al., 2007).

Contudo, apesar da eficiência, os toxóides botulínicos comerciais apresentam limitações relativas a sua produção industrial: *C. botulinum* produz baixos níveis de BoNTs; a produção em larga escala é laboriosa, onerosa e dificilmente previsível, além da alta periculosidade. De tal forma, há uma demanda para o desenvolvimento de vacinas recombinantes que minimizem os problemas associados à produção industrial de toxóides botulínicos. Para tanto, quimeras recombinantes compostas pelos domínios CPR^C e CPR^D, com a presença ou não da subunidade B da toxina termolábel de *Escherichia coli* (LTB), um potente adjuvante da resposta imune humoral (Fischer et al., 2010), foram construídas (rLTBCD e rCD, respectivamente). As construções foram expressas em *E. coli* e usadas como vacina.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a resposta imune humoral gerada pela vacinação experimental de camundongos com as quimeras recombinantes.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

2.1 Produção e avaliação da quimera recombinante

A quimera recombinante rLTBCD foi produzida, purificada e caracterizada conforme Cunha et al. (2011a) e sua antigenicidade foi avaliada conforme Cunha et al. (2011b). Também foram expressas, em *E. coli*, a quimera rCD para vacinação, bem como cada subunidade da quimera (rC e rD) para utilização na avaliação dos resultados da vacinação.

2.2 Imunização dos camundongos

Para avaliação da imunogenicidade das quimeras recombinantes, camundongos Swiss fêmeas com 18 a 20 gramas foram imunizados. Os grupos, de oito animais cada, foram distribuídos conforme segue: 1 – rLTBCD; 2 – rLTBCD com Al(OH)₃ 15%; 3 – rCD com Al(OH)₃ 15%; 4 – toxóide comercial contra botulismo bovino; 5 – PBS. Foram administradas três doses via intraperitoneal contendo 40 µg de cada domínio antigênico nos dias 0, 14 e 28. O sangue dos animais foi coletado do plexo venoso retro-orbital no dia 35. Os soros foram separados por centrifugação, misturados em proporções iguais (*pool*) e armazenados à -20°C. Os animais foram mantidos durante todo o experimento de acordo com as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas.

2.3 Avaliação da resposta imune humoral

Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 200 ng por cavidade de rC ou rD diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) (100 µL/cavidade) e incubadas *overnight* a 4°C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 5% (w/v) de leite em pó diluído em PBS-T. Todas as reações subsequentes ocorreram por 1 hora a 37 °C, os reagentes foram utilizados a um volume de 100 µL/cavidade e as placas lavadas três vezes com PBS-T após cada etapa. Após o bloqueio das placas, foram adicionados os *pools* de cada soro, em triplicata, diluídos 1:800. Seguindo esta etapa, as placas foram incubadas com anticorpo de coelho anti-anticorpo de camundongo conjugado com peroxidase (1:6000). Após a remoção do excesso de conjugado, as reações foram reveladas utilizando solução contendo 0,4 mg/mL de ortofenilenodiamina (OPD) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% (v/v) de H₂O₂) e as placas incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplacas (Thermo Plate) com filtro de 450 nm.

O *pool* de soros também foi titulado por soroneutralização em camundongos, como preconizado pela European Pharmacopoeia (1998), sendo o título de neutralização de cada soro expresso em UI/mL.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vacina se mostrou inócua e os resultados da avaliação da resposta imune humoral por ELISA demonstraram a geração de altos níveis de anticorpos em comparação com o toxóide comercial com, obtendo diferença estatística ($p < 0,05$) em todos os grupos com formulações de vacinas experimentais, conforme demonstrado na Fig. 1.

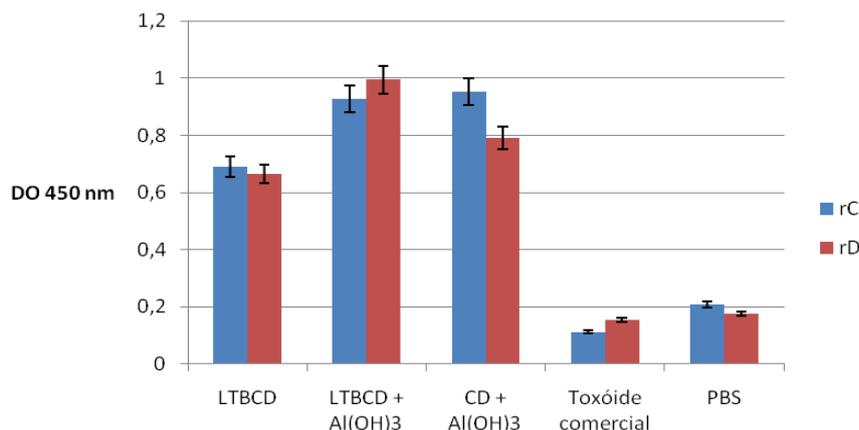


Figura 1 - Níveis de anticorpos antitoxinas botulínicas C e D, determinadas por ELISA, presentes nos soros de camundongos vacinados experimentalmente com as quimeras recombinantes.

De forma congruente, os resultados do ensaio de soroneutralização também apresentaram significativos níveis de antitoxinas gerados pela vacinação com as quimeras recombinantes, conforme Tab. 1.

Tabela 2 - Níveis de antitoxinas botulínicas C e D, determinados por soroneutralização, presentes nos soros de camundongos vacinados experimentalmente com as quimeras recombinantes expressos em unidades internacionais por mililitro (UI/mL). ND = não detectável

Formulação	Antitoxina botulínica C	Antitoxina botulínica D
rLTBCD	2 UI/mL	1 UI/mL
rLTBCD + Al(OH) ₃	2 UI/mL	2 UI/mL
rCD + Al(OH) ₃	2 UI/mL	1 UI/mL
Toxóide comercial	5 UI/mL	1 UI/mL
PBS	ND	ND

Os resultados acima expostos evidenciam o potencial adjuvante da LTB, visto que o grupo inoculado com rLTBCD apresentou níveis de anticorpos neutralizantes similares ao do grupo rCD + Al(OH)₃. Os dados acima também mostram que a quimera recombinante rLTBCD associada ao adjuvante obteve uma melhor resposta para antitoxina D, apresentando um título superior ao obtido com o toxóide comercial. Já para antitoxina C, a utilização das quimeras recombinantes associadas ou não ao adjuvante apresentou títulos menores ao obtido com o toxóide comercial. Esses resultados demonstram que as quimeras recombinantes foram imunogênicas, estimulando níveis de anticorpos neutralizantes detectáveis na soroneutralização em camundongos, sendo rLTBCD + Al(OH)₃ a melhor opção para prevenção do botulismo bovino, estando de acordo com os pré-requisitos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

4 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciam o potencial protetor e imunogênico das quimeras construídas além do potencial adjuvante da LTB. Ensaios na espécie alvo serão realizados em breve.

5 REFERÊNCIAS

CUNHA, C.E.P.; MOREIRA, G.M.S.G.; GIL, L.; CONCEICAO, F.R. Solubilização e purificação de uma quimera recombinante composta pela LTB e domínios receptores das toxinas botulínicas C E D. In: **IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia**, 2011, Bento Gonçalves. IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, 2011a.

CUNHA, C.E.P.; GIL, L.A.F.; MOREIRA, G.M.S.G.; SANTOS, D.G.; CONCEIÇÃO, F.R. Avaliação da antigenicidade dos domínios receptores das toxinas botulínicas tipos C e D de uma quimera recombinante. In: **XX Congresso de Iniciação Científica**, 2011, Pelotas. XX Congresso de Iniciação Científica e III Mostra Científica, 2011b.

DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; LANGENEGGER, J.; et al. Epizootic botulism of cattle in Brazil. **Dtsch. Tierärztl. Wschr.** 99:188-190, 1998.

DUTRA, I.S.; WEISS, H.E.; WEISS, H.; et al. Diagnóstico de botulismo em bovinos no Brasil pela técnica de microfixação de complemento. **Pesq. Vet. Bras.** 13:83-86, 1993.

FERNANDES, C.G. Botulismo. In: CORREA, R.F.; SCHILD, A.L.; MÉNDEZ, M.C.; et al. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2 ed. São Paulo: Livraria. Varela, 2001. 426p.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L.; MORAES, C.M.; FERREIRA, L.N.; VILELA, C.O.; CAETANO, C.F.; VARGAS, G.D.; HÜBNER, S.O.; VIDOR, T.; ROEHE, P.M. Recombinant Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **W. J. Microbiol & Biotechnol**, 26:489-495, 2010.

LEE, J.C.; HWANG, H.J.; SAKAGUCHI, Y.; et al. C terminal half fragment (50 kDa) of heavy chain components of Clostridium botulinum type C and D neurotoxins can be used as an effective vaccine. **Microbiol. Immunol.** 51(4):445-55, 2007.

MONTECUCCO, C.; SCHIAVO, G. Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. **Q. Rev. Biophys.** 28:423-472, 1995.

RAVICHANDRAN, E.; AL-SALEEM, F.H.; ANCHARSKI, D.M.; et al. Trivalent vaccine against botulinum toxin serotypes A, B, and E that can be administered by the mucosal route. **Infect. Immun.** 75:3043-3054, 2007.

SIMPSON, L.L. Identification of the major steps in botulinum toxin action. **Annu. Vet. Pharmacol. Toxicol.** 44:67-93, 2004.

SMITH, L. A. Botulism and vaccines for its prevention. **Vaccine.** 27:33-39, 2009.