

# AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ADJUVANTE DA LTB RECOMBINANTE FUSIONADA OU CO-ADMINISTRADA A *rFimA* DE *Salmonella* Enteritidis SOBRE A PROTEÇÃO CONTRA INFECÇÃO POR *S. Typhimurium* EM CAMUNDONGOS

**BANDEIRA, Rafaela Oliveira<sup>1,2</sup>; SEHN, Pohl Carla<sup>2</sup>, CASTELLI, Regina Maria<sup>2,3</sup>, PHILIPPSEN, Francine Rodrigues<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Bolsista FAPERGS, Faculdade de Nutrição/UFPeI,

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, CDTec/UFPeI

<sup>3</sup> Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/UFPeI  
[nutribandeira@gmail.com](mailto:nutribandeira@gmail.com)

**MOREIRA, Ângela Nunes<sup>2,4</sup>**

<sup>4</sup> Faculdade de Nutrição/UFPeI

<sup>2</sup> Laboratório de Imunologia Aplicada, CDTec/UFPeI

## 1 INTRODUÇÃO

Produtos microbianos, como as enterotoxinas termolábeis do *Vibrio cholera* (CT) e da *Escherichia coli* (LT) têm sido amplamente estudados quanto a sua ação adjuvante (SIMMONS et al., 2001). A toxina LT é composta por uma molécula da subunidade A, a qual possui atividade catalítica ADP-ribosiltransferase e por cinco moléculas da subunidade B (LTB), que ligam-se a receptores na superfície celular, tais como o gangliosídeo GM1, presente na superfície de células eucarióticas, permitindo que a subunidade A (porção tóxica) entre na célula (SPANGLER, 1992). A função adjuvante da LTB está diretamente relacionada a sua capacidade de se ligar ao gangliosídeo GM1 (DE HAAN et al., 1998) e de sua forma de combinação ao antígeno, co-administrada ou fusionada (PITCOVSKI et al., 2006).

As fímbrias são filamentos protéicos responsáveis pelo processo de aderência às células epiteliais e estão envolvidas na patogenicidade da bactéria (WULLT et al., 2001). A subunidade fimbrial principal recombinante da fímbria tipo 1 de *Salmonella* Enteritidis foi selecionada como antígeno modelo para a ligação à subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*.

O presente trabalho objetivou avaliar a atividade adjuvante da LTB fusionada ou co-administrada à *rFimA* através de ensaio de proteção contra infecção causada por *S. Typhimurium* em camundongos.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Determinação da DL<sub>50</sub> e da dose oral mínima de *S. Typhimurium* capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos

*S. Typhimurium* 8429 foi utilizada para a determinação da dose mínima necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo (DL<sub>50</sub>). *S. Typhimurium* armazenada em glicerol a 20% a -80 °C (50 µL) foi cultivada em caldo Luria Bertani (LB) e incubada a 37 °C, sob agitação por 18 h. Após este período, o cultivo foi transferido para caldo LB e incubado sob as mesmas condições iniciais, por 24 h. O cultivo foi centrifugado por 10 min a 1500 x g e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. A solução foi diluída em

série decimal e a densidade ótica (D.O.) das diluições foi lida em espectrofotômetro a 600 nm para quantificação do número de células presentes em cada diluição (FRANÇA et al., dados não publicados).

A DL<sub>50</sub> foi determinada conforme Método de Reed e Munch (JOSEPH, et al., 1966). Resumidamente, camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da UFPel, foram divididos em grupos de 4 animais e inoculados, via intraperitoneal e via oral, com 200 µL de cada uma das diluições seriadas contendo aproximadamente 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> células de *S. Typhimurium*. Os animais foram monitorados diariamente para determinação da DL<sub>50</sub>.

## **2.2 Protocolo de imunização e ensaio de proteção contra infecção por *S. Typhimurium* em camundongos**

Todas as etapas referentes à imunização e desafio dos animais foram realizadas no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e os animais usados neste trabalho foram tratados de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Foram utilizados 36 camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da UFPel. Os mesmos foram separados em 6 grupos contendo 6 animais cada. Os grupos vacinais e as doses inoculadas por camundongo foram: 1) rFimA, 60 µg; 2) rLTB/FimA, 40 µg de rLTB e 60 µg de rFimA; 3) rFimA+rLTB, 60 µg de rFimA+ 40 µg de rLTB; 4) rFimA+ Adjuvante de Freund Incompleto (AI), 60 µg de rFimA; 5) rLTB, 40 µg e 6) PBS, 100 µL. O protocolo de imunização consistiu de 3 doses, com intervalo de 10 dias entre cada uma delas (dias 0, 10 e 20).

Os camundongos foram desafiados no 10º dia após a última imunização (dia 30) com aproximadamente 5x10<sup>3</sup> células de *S. Typhimurium* (100x DL<sub>50</sub>), conforme preconizado pelo Code of Federal Regulations Title 9 (CFR9) do United States Department of Agriculture (USDA). Os camundongos foram monitorados diariamente quanto a sintomatologia e a ocorrência de morte.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O ensaio de proteção animal não revelou proteção total dos camundongos imunizados. Conforme a tabela 2, embora não tenha protegido totalmente, o grupo vacinado com a rFimA apresentou um retardo da mortalidade, semelhante ao encontrado para o grupo imunizado com a rFimA co-administrada com Adjuvante de Freund Incompleto.

**Tabela 2** - Proteção conferida pela imunização com a proteína rFimA sem nenhum adjuvante, co-administrada e fusionada à LTB e associada a adjuvante de Freund incompleto, avaliada através do tempo de sobrevivência (em dias) após o desafio com 100 DL<sub>50</sub> de *S. Typhimurium*.

Grupos*	Vacina	Dias até a morte	Nº de sobreviventes
1	rFimA	5, 5, 5, 5, 6, 7	0/6
2	rLTB/FimA	4, 4, 4, 5, 5, 5	0/6
3	rFimA+rLTB	4, 4, 5, 5, 5, 5	0/6
4	rFimA+Adj. Inc.	4, 4, 5, 6, 6, 7	0/6
5	rLTB	4, 4, 4, 5, 5, 6	0/6
6	PBS	4, 4, 4, 4, 5, 5	0/6

\* Animais vacinados três vezes com 10 dias de intervalo e desafiados com  $5 \times 10^9$  células de *S. Typhimurium* 10 dias após a última imunização.

Os resultados obtidos demonstraram também uma eficiência semelhante da rFimA administrada sem nenhum adjuvante em relação a co-administrada ou fusionada a rLTB. Esses resultados apontam para uma possível capacidade adjuvante da proteína rFimA devido ao fato de ter prolongado o tempo de vida dos animais imunizados somente com a rFimA.

#### 4. CONCLUSÃO

As imunizações não induziram proteção de camundongos desafiados com *S. Typhimurium*, porém o tempo de sobrevivência foi maior entre os animais imunizados somente com a rFimA e rFimA+Al.

#### 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DE HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; FEIL, I.K.; HOLTROP, M.; HOL, W.G.J.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Role of GM1 binding in the mucosal immunogenicity and adjuvant activity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit. **Immunology**, v.94, p.424-430, 1998.

JOSEPH L. MELNICK, EDWARD A. ADELBERG, ERNEST JAWTZ; **Manual de Microbiología Médica**. Séptima edición 1966.

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**, v.24, p.636-643, 2006.

RESENDE, F. C. B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S. I. A. C.; ZANETTI, C. R.; LIMA, H. C. Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatologia**. Vol. 27, nº 3. Curitiba, PR. 2004.

SIMMONS, C. P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B. 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.