

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Avaliação da atividade adjuvante da subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* fusionada ou co-administrada a rFimA de *Salmonella* Enteritidis

Carla Pohl Sehn

Pelotas, 2010

CARLA POHL SEHN

**Avaliação da atividade adjuvante da subunidade B
recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia
coli* fusionada ou co-administrada a rFimA de *Salmonella
Enteritidis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência (área do conhecimento: Imunologia Aplicada).

Orientadora: Ângela Nunes Moreira
Co-orientadores: Fabricio Rochedo Conceição
José Antonio Guimarães Aleixo

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

S456a 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* / Carla Pohl Sehn ; orientador Ângela Nunes Moreira; co-orientadores Fabricio Rochedo Conceição e José Antonio Guimarães Aleixo. - Pelotas, 2010.-60f. ; il.- Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Instituto de Biologia . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. Adjuvante 2. Resposta imune humoral 3. Ensaio de proteção animal 4. Via de administração 5. Quimera 6. Co-administração. I Moreira, Ângela Nunes (orientador) II . Título.

CDD 612.11822

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fabiana Kömmling Seixas, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Geferson Fischer, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas

DEDICATÓRIA

Dedico a minha família e aos meus queridos amigos

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de aprendizado que me proporcionou.

Ao Professor José Antônio Guimarães Aleixo pela oportunidade, incentivo, amizade, ensinamentos e principalmente por ter confiado na minha capacidade.

À minha orientadora Ângela Nunes Moreira e ao Professor Fabricio Rochedo Conceição pela confiança depositada, pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada, Flávia, Leonardo, Vanessa, Regina, Rodrigo, Henrique, Luciana, Caroline e Michele, pela convivência, amizade, incentivo, principalmente à Mariana e ao Marcelo por tudo que me ensinaram, muito obrigada!

Aos meus queridos estagiários, Eduardo, Rafaela, Mariana, Murrí, Francine, Suely e Marina, pelo carinho, confiança, lealdade e dedicação.

Aos demais estagiários do laboratório de Imunologia Aplicada, Neida, Juliana, Simone, Louise, Gustavo, pela valiosa ajuda nas tarefas do dia-a-dia, pelo convívio e amizade.

Aos grandes amigos Anelize, André, Clairton, Clarice, Éverton, Élen, Karla, Michel, Sibebe, Silvana, Samuel e Simone, por todas as longas conversas, pelo apoio, incentivo e amizade que tornaram os dias melhores durante este processo.

Aos demais colegas, estagiários e amigos do Centro de Biotecnologia pela amizade, convívio e apoio.

Aos meus pais, Ilvo e Dulce, pelo carinho e incentivo em todas as etapas de minha formação, não medindo esforços para que eu realizasse esse sonho.

Aos meus queridos irmãos Evandro, Alexandre e Cristiane, que apesar da distância sempre estiveram muito presentes em meu coração.

À todos meus amigos, que de longe ou de perto, sempre me apoiaram, obrigada, sem vocês eu não teria conseguido.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Resumo

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.

A associação de antígenos vacinais a potentes adjuvantes imunológicos é uma estratégia fundamental para melhorar o desempenho de vacinas de subunidade. Adjuvantes são substâncias que, usadas em combinação com um antígeno específico, induzem mais imunidade que o antígeno sozinho. Produtos microbianos, como a subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB), que é atóxica, têm sido utilizados com esse propósito. A LTB é reconhecida por sua grande eficiência como adjuvante da imunidade de mucosa e essa capacidade depende da forma de combinação ao antígeno (co-administrada ou fusionada), da via de imunização (mucosa ou parenteral) e da dose administrada. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade adjuvante da subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, fusionada ou co-administrada, por via oral (v.o.) ou intramuscular (i.m.), utilizando a subunidade fimbrial principal recombinante da fímbria tipo 1 (FimA) de *Salmonella* Enteritidis como antígeno. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados v.o. e i.m. com 3 doses de rLTB, PBS (controles) ou rFimA, ou rFimA associada a adjuvante de Freund incompleto (rFimA+AI, animais imunizados via i.m.), co-administrada ou fusionada a LTB (quimera). Os níveis de anticorpos sistêmicos totais, IgG1, IgG2a e IgA anti-rFimA foram mensurados por ELISA e um ensaio de proteção animal contra infecção por *S. Typhimurium* foi realizado. Os resultados obtidos demonstraram que a rLTB apresentou atividade adjuvante estatisticamente semelhante a do adjuvante comercial somente quando co-administrada i.m. a rFimA e em relação a produção de anticorpos totais. Esses resultados confirmam que a ação adjuvante da rLTB é influenciada pela forma de ligação ao antígeno (fusionada ou co-administrada) e pela via de administração. 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+AI. Além disso, os níveis de anticorpos totais, IgG1 e IgG2a obtidos pela forma quimérica imunizada tanto v.o. quanto i.m., foram semelhantes àqueles obtidos pelos animais imunizados somente com a rFimA. Os resultados obtidos apontam para uma possível atividade adjuvante da proteína rFimA.

Palavras chave: Adjuvante. Resposta imune humoral. Ensaio de proteção animal. Via de administração. Quimera. Co-administração.

Abstract

SEHN, Carla Pohl. **Evaluation of the adjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit fused or co-administered to rFimA of *Salmonella* Enteritidis.** 2010. 60f. Dissertation (Master Degree) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The association of vaccine antigens to potent immunological adjuvants is a key strategy to improve the performance of subunit vaccines. Adjuvants are components that, when used in combination with a specific antigen, induce more immunity than the antigen alone. Microbial products have been used as adjuvant, including the B subunit of the thermo labile enterotoxin of *Escherichia coli* (LTB), which is atoxic. LTB is known by its great efficiency as mucosal immunity adjuvant and this activity depends on the shape of the antigen combination (co-administered or fused), on the immunization route (mucosal or parenteral) and the dosage. This study aims to evaluate the adjuvant activity of recombinant LTB (rLTB), both as chimeric and co-administered orally or intramuscularly, using the major fimbrial unit type 1 (FimA) of *Salmonella* Enteritidis as antigen. BALB/c mice were immunized orally or intramuscularly with three doses of rLTB or PBS (controls) or rFimA, rFimA associated with Freund's incomplete adjuvant (rFimA+AI, i.m. immunized animals), co-administered or fused to LTB (chimera). The levels of total systemic antibodies, IgG1, IgG2a and IgA anti-rFimA were measured by ELISA and an animal protection assay against *S. Typhimurium* infection was performed. The results show that rLTB only showed adjuvant activity that resembled the commercial adjuvant when co-administered intramuscularly to rFimA and for total antibody production. These results confirm that the action of adjuvant rLTB is influenced by the shape of binding to the antigen (fused or co-administered) and route of administration. Immunizations did not induce protection of mice challenged with *S. Typhimurium*, but survival time was greater among animals immunized with only the rFimA and rFimA+AI. Furthermore, the total antibody titer, IgG1 and IgG2a obtained by the chimeric form, both orally as intramuscularly, were similar to those obtained by the animal only immunized with rFimA. These results suggest that rFimA has a possibility of having an adjuvant capability rFimA.

Keywords: Adjuvant. Humoral immune response. Mouse protection assay. Route of administration. Chimera. Co-administration.

Lista de Figuras

Figura 1	Análise em gel de agarose 1% do fragmento da região codificadora do gene <i>fimA</i> amplificado por PCR.....	34
Figura 2	Análise em gel de agarose 0,8% das digestões dos vetores pAE e pAE/ <i>ltb</i> e dos respectivos fragmentos do gene <i>fimA</i> purificados.....	35
Figura 3	Mapa representativo dos vetores recombinantes pAE/ <i>fimA</i> e pAE/ <i>ltb-fimA</i> , obtido através do <i>software</i> VectorNTI 9.1.	35
Figura 4	Análise em gel de agarose 0,8% da extração do DNA plasmidial dos clones recombinantes.....	36
Figura 5	Expressão em pequena escala da rFimA e rLTB/FimA.....	37
Figura 6	<i>Dot blot</i> da expressão da rFimA e rLTB-FimA pelas cepas de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Ril, Star, pLysS.....	38
Figura 7	SDS-PAGE 15% da expressão em larga escala da rFimA e da rLTB/FimA.....	38
Figura 8	SDS-PAGE 15% da purificação da proteína rFimA expressa em <i>E. coli</i>	39
Figura 9	Avaliação da ligação das proteínas produzidas ao gangliosídeo GM1, determinada através de ELISA indireto.....	40
Figura 10	Avaliação da resposta imune humoral anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via oral (diluídos 1:100), coletados nos dias 0, 9, 19, 29 e 39 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto.	43
Figura 11	Avaliação da resposta imune humoral anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via intramuscular (diluídos 1:100), coletados nos dias 0, 9, 19, 29 e 39 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto.....	44
Figura 12	Avaliação da resposta imune humoral anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via oral e intramuscular (diluídos 1:100), coletados no dia 29 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto.	45
Figura 13	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..	46

Figura 14 Avaliação dos níveis de anticorpos IgG1 anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via intramuscular (diluídos 1:100), coletados nos dias 0 e 29 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto. 47

Lista de Tabelas

Tabela 1	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para a amplificação do fragmento da região codificadora do gene <i>fimA</i> para a obtenção de rFimA e rLTB/FimA e enzimas de restrição utilizadas na clonagem.....	21
Tabela 2	Grupos vacinais e a quantidade de antígeno e adjuvante inoculados por diferentes vias de administração.....	30
Tabela 3	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 100DL ₅₀ de <i>S. Typhimurium</i>	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
2.3 Hipótese	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento	20
4.2 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes FimA (rFimA) e FimA fusionada a LTB (quimera rLTB/FimA).....	20
4.2.1 Desenho dos <i>primers</i>	20
4.2.2 Extração do DNA genômico de <i>S. Enteritidis</i>	21
4.2.3 Amplificação por PCR do fragmento da região codificadora do gene <i>fimA</i> de <i>S. Enteritidis</i>	22
4.2.4 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene <i>fimA</i> no vetor pAE.....	22
4.2.5 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene <i>fimA</i> no vetor pAE/ltb.....	23
4.2.6 Seqüenciamento e análise de restrição dos vetores recombinantes.....	23
4.2.7 Avaliação da expressão das proteínas rFimA e rLTB/FimA	23
4.2.8 Expressão das proteínas rFimA e rLTB/FimA em larga escala	25
4.2.9 Purificação das proteínas recombinantes.....	25
4.2.10 Diálise, concentração e quantificação das proteínas recombinantes	26
4.2.11 Avaliação da conformação da LTB expressa através da sua Ligação ao gangliosídeo GM1	26
4.3 Produção, purificação e quantificação de anticorpo policlonal anti-rFimA.....	27
4.4 Avaliação do efeito adjuvante da LTB sobre a resposta imune humoral e proteção contra infecção por <i>S. Typhimurium</i> em camundongos.....	28
4.4.1 Determinação da DL ₅₀ e da dose oral mínima de <i>S. Typhimurium</i> capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos.....	28

4.4.2 Protocolo de imunização e ensaio de proteção contra infecção por <i>S. Typhimurium</i> em camundongos	29
4.4.3 Análise histopatológica.....	31
4.4.4 Avaliação da resposta imune humoral	31
4.4.4.1 IgG total.....	31
4.4.4.2 IgG1 e IgG2a.....	32
4.4.4.3 IgA sérica e secretória.....	32
4.5 Análise estatística	33
5 RESULTADOS	33
5.1 Amplificação por PCR do fragmento da região codificadora do gene <i>fimA</i> de <i>S. Enteritidis</i>	33
5.2 Obtenção de clones recombinantes pAE/ <i>fimA</i> e pAE/ <i>ltb-fimA</i>	34
5.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes FimA e LTB/FimA	36
5.4 Purificação e quantificação das proteínas rFimA e rLTB-FimA	39
5.5 Avaliação da conformação da LTB expressa através da sua ligação ao gangliosídeo GM1	39
5.6 Produção, purificação e quantificação de anticorpo policlonal anti-rFimA.....	40
5.7 Resposta imune humoral.....	41
5.7.1 DL ₅₀ e dose oral mínima de <i>S. Typhimurium</i> capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos	41
5.7.2 Ensaio de proteção animal	41
5.7.3 Análise histopatológica.....	42
5.7.4 Resposta imune humoral.....	42
5.7.4.1 IgG total.....	42
5.7.4.2 IgG1 e IgG2a.....	45
5.7.4.3 IgA sérica e secretória.....	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	54
8 REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

Os avanços da área médica trouxeram melhorias para a condição de saúde da população, porém o controle e a erradicação de doenças infecciosas continuam sendo um dos principais desafios para a saúde pública nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. A vacinação é uma das estratégias de intervenção que tem se mostrado economicamente rentável e eficaz na prevenção e controle de doenças causadas por agentes microbianos (ULMER, 2006).

Em 1870, Edward Jenner (1749-1823), um cientista inglês, descobriu que a infecção com a vacínia (análogo bovino da varíola), responsável pela varíola bovina, era capaz de fornecer imunidade protetora contra a varíola humana. Esse processo ficou conhecido inicialmente como variolação. Mais tarde, Pasteur sugeriu o termo, vacinação, e o definiu como a capacidade de estimular proteção contra outros agentes infecciosos (JANEWAY et al., 2007). Desde então, diversas vacinas foram desenvolvidas contra vários agentes infecciosos, como por exemplo, as vacinas humanas para os vírus da Varíola, Sarampo, Rubéola, Hepatite A e B (NNII, 2010) e as vacinas animais contra Febre Aftosa, Brucelose, Diarréia Viral Bovina, Pneumonia Enzoótica suína, entre outras (MAPA, 2010).

Ainda que a maioria das vacinas para uso humano e animal seja administrada via parenteral, a vacinação através da mucosa é considerada desejável, uma vez que esta via é a porta de entrada para grande parte dos agentes infecciosos. Infecções desse tipo incluem: infecções do trato gastrointestinal, causadas por *Helicobacter pylori*, *Vibrio Cholera*, *Escherichia coli* Enteropatogênica, *Salmonella*, entre outras; infecções do trato respiratório, causadas por *Mycoplasma pneumoniae*, vírus Influenza, entre outras e infecções do trato geniturinário causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp, entre outras (SHATTOCK et al., 2008). Essas infecções ainda representam um grande desafio para o desenvolvimento de vacinas que impeçam a fixação e colonização da mucosa pelo agente infeccioso (bactérias não invasivas), impeçam a penetração e replicação do agente nesse local (bactérias invasivas e vírus), e que possam bloquear a ação de toxinas bacterianas (OGRA; FADEN; WELLIVER, 2001, ERIKSSON; HOLMGREN, 2002, SHATTOCK et al., 2008). As vacinas de mucosa são capazes de provocar uma resposta imune local (produção de imunoglobulina A) e, portanto, podem reduzir a colonização nas fases iniciais da infecção e a posterior disseminação sistêmica (ERIKSSON; HOLMGREN, 2002). Porém, o desenvolvimento de vacinas eficazes de mucosa é

particularmente difícil, devido a características próprias da superfície mucosa, fazendo-se necessária a utilização de adjuvantes para a apresentação de antígenos às células epiteliais especializadas (células M) (STAATS et al., 1994).

Vacinas de subunidade são uma boa alternativa para a imunização através da superfície mucosa, uma vez que, incluindo somente os antígenos requeridos para a imunização protetora, são mais seguras que as vacinas vivas atenuadas ou bacterinas (BURNETTE, 1991). Entretanto, devido à pureza dos antígenos de subunidade e a ausência de componentes imunomoduladores, associados com as vacinas atenuadas e bacterinas, essas vacinas, em geral, são pouco imunogênicas. Assim, a associação de antígenos vacinais a potentes adjuvantes imunológicos é uma estratégia fundamental para melhorar o desempenho de vacinas de subunidade (GUPTA et al., 1993).

Produtos microbianos, como as enterotoxinas termolábeis do *Vibrio cholera* (CT) e da *Escherichia coli* (LT), tem sido amplamente estudados quanto a sua ação adjuvante (SIMMONS et al., 2001a). A toxina LT é composta por uma molécula da subunidade A, de 27kDa, e por cinco moléculas da subunidade B (LTB), de 11,6kDa cada, a qual forma um homopentâmero. A subunidade A possui atividade catalítica ADP-ribosiltransferase e a subunidade B liga-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). Além disso, depende da forma de combinação ao antígeno (co-administrada ou fusionada), da via de imunização (via mucosa ou parenteral) (HAAN et al., 2001; PITCOVSKI et al., 2006) e da dose administrada (WELTZIN et al., 2000; FISCHER et al., 2010).

A via de administração tem papel importante na modulação da função adjuvante da LTB e, embora a LTB seja normalmente utilizada como potente adjuvante de mucosa (FINGERUT et al., 2006; YAMANAKA et al., 2006), a sua administração via parenteral também foi capaz de estimular resposta secretória e sistêmica de anticorpos (FISCHER et al., 2010).

Quanto à sua combinação ao antígeno, em alguns estudos, a administração da LTB fusionada foi capaz de estimular uma resposta sistêmica e secretória de anticorpos antígeno-específicos (YAMANAKA et al., 2006; FU et al., 2009), e em

outros, a co-administração da LTB a antígenos aumentou a resposta imune (WELTZIN et al., 2000, HAAN et al., 2001). Entretanto, no estudo de Fingerut et al. (2006), a forma co-administrada da LTB ao antígeno não foi capaz de induzir proteção.

Vários antígenos já foram utilizados para comprovar a eficiência do uso da LTB como adjuvante (WELTZIN et al., 2000, RICHARDS et al., 2001, CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006, FINGERUT et al., 2006, da SILVA RAMOS ROCHA et al., 2008) e a sua ligação à esses antígenos pode representar uma nova alternativa no desenvolvimento de 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, entretanto, somente uma, *S. enterica* subsp. *enterica* é de importância clínica para humanos e responsável por milhões de casos de toxinfecções de origem alimentar em todo o mundo a cada ano (LINAM; GERBER, 2007, GRASSL; FINLAY, 2008). Fímbrias são filamentos protéicos responsáveis pelo processo de aderência à células epiteliais e estão envolvidas na patogenicidade da bactéria (CLEGG; GERLACH, 1987, ASLANZADEH; PAULISSEN, 1992, 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*, na tentativa de aprofundar os estudos da atividade adjuvante da rLTB, 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.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade adjuvante da subunidade B recombinante da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli*, fusionada ou co-administrada, utilizando a subunidade fimbrial principal recombinante da fímbria tipo 1 de *Salmonella* Enteritidis como antígeno, por via oral ou intramuscular.

2.2 Objetivos Específicos

- Construir uma quimera recombinante composta pela subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) e pelo antígeno FimA de *Salmonella* Enteritidis;
- Clonar, expressar e purificar a FimA e a quimera LTB/FimA recombinantes;
- Avaliar a resposta imune induzida pela rFimA sem nenhum adjuvante, co-administrada e fusionada a rLTB (quimera), administradas via oral e intramuscular a camundongos;
- Avaliar a eficácia da rFimA sem nenhum adjuvante, co-administrada e fusionada a rLTB (quimera), administradas via oral e intramuscular através de ensaio de proteção contra infecção causada por *Salmonella* Typhimurium em camundongos.

2.3 Hipótese

A rLTB co-administrada e fusionada a rFimA (quimera) incrementa a resposta imune humoral quando utilizada como adjuvante administrado via oral e intramuscular e induz maior proteção contra a infecção causada por *Salmonella* Typhimurium do que a proporcionada por rFimA sem nenhum adjuvante ou associada a adjuvante de Freund incompleto.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Vacinas de mucosa

A maioria dos micro-organismos penetra no corpo do hospedeiro através dos tecidos da mucosa do trato gastrointestinal, geniturinário ou respiratório. As superfícies das mucosas são vulneráveis a infecção, pois são barreiras finas e permeáveis em função da atividade fisiológica que desempenham, como trocas gasosas, absorção de alimentos, atividades sensoras e de reprodução. A imunidade específica dos tecidos de mucosa é conferida pela própria mucosa (local) e a nível imunológico sistêmico (JANEWAY et al., 2007; O'HAGAN; VALIANTE, 2003). A vacinação parenteral é capaz de gerar uma resposta imune a nível sistêmico, mas dificilmente é capaz de induzir uma resposta eficaz a nível de mucosa (O'HAGAN; VALIANTE, 2003). Os tecidos da mucosa representam uma interface entre o hospedeiro e o meio ambiente e estão conectados através do sistema imune de mucosa (MALT) (JANEWAY et al., 2007). A utilização de vacinas de mucosa através das vias oral ou nasal é capaz de estimular todo o sistema imune de mucosa, sendo estas as rotas preferenciais em função da facilidade de administração e por serem consideradas menos invasivas (KOZLOWSKI et al., 1999). Vacinas vivas de mucosa utilizando micro-organismos vivos são baseadas na capacidade do micro-organismo penetrar através da mucosa. Vacinas de mucosa que utilizam micro-organismos atenuados, ou produtos purificados destes não apresentam essa característica e são apresentadas via MHC classe II como as vacinas vivas. Independente do tipo de vacina de mucosa, o principal obstáculo para o seu desenvolvimento é a baixa eficácia e a curta duração da resposta imune gerada (MCGHEE et al., 1992; SHALABY, 1995; CZERKINSKY et al., 1999).

A vacinação oral é a rota mais atrativa de vacinação da mucosa pela facilidade de administração. As vacinas orais são capazes de induzir tanto o MALT quanto o sistema imune sistêmico (SHATTOCK et al., 2008). Porém o progresso no desenvolvimento de vacinas orais ainda é limitado em função das características que essas vacinas devem apresentar, tais como: a capacidade de suportar o baixo pH e a ação de enzimas proteolíticas durante a passagem através do trato gastrointestinal, que podem resultar na degradação do antígeno ou perda da conformação; capacidade de aumentar a absorção do antígeno pelas células M ou

células epiteliais do TGI; capacidade de atravessar com certa facilidade a barreira epitelial; capacidade de ativar o sistema imune inato ou sistema imune específico em vez de induzir tolerância oral; e capacidade de induzir memória imunológica (RYAN; DALY; MILLS, 2001, OGRA; FADEN; WELLIVER, 2001; RESENDE et al., 2004). Além disso, vários fatores afetam o resultado da imunização oral, como o tipo de antígeno (CZERKINSKY et al., 1999), a dose de antígeno administrada, a frequência de administração, o protocolo de imunização, os sistemas de entrega e a utilização de adjuvantes (O'HAGAN; VALIANTE, 2003).

3.2 LTB como adjuvante de mucosa

Os adjuvantes, do Latim “*adjuvare*”, que significa ajudar (SINGH; O'HAGAN, 1999), são substâncias capazes de (i) reforçar a imunogenicidade de antígenos altamente purificados ou recombinantes, (ii) reduzir a quantidade de antígeno e/ou o número de imunizações necessárias para gerar imunidade protetora, (iii) melhorar a eficácia das vacinas em recém-nascidos, idosos ou pessoas imunocomprometidas ou (iv) atuar como sistema de entrega de antígenos para a absorção via mucosa (MCEL RATH, 1995; LINDBLAD, 2004).

Uma grande variedade de compostos tem demonstrado potente atividade adjuvante, como por exemplo os Ligantes dos Receptores Toll-like (TLR), citocinas, saponinas, nanopartículas produzidas a partir de fosfolipídios, emulsões, lipossomos e enterotoxinas bacterianas como a enterotoxina termolábel do *Vibrio cholerae* (toxina colérica) e *Escherichia coli* (LT) (RYAN; DALY; MILLS, 2001, PASHINE; VALIENTE; ULMER, 2005, CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006, GUY, 2007).

As enterotoxinas termolábeis de *Vibrio cholerae* (CT) e *Escherichia coli* (LT) apresentam mais de 80% de identidade (SIMMONS et al., 2001a, KIM et al., 2007). A LT da *Escherichia coli*, composta pela subunidade A (LTA), de 27 kDa, e por cinco moléculas da subunidade B (LTB), de 11,6 kDa cada, apresenta uma estrutura pentamérica em forma de cilindro com uma cavidade central, altamente estável (SIXMA et al., 1993). A subunidade A possui atividade catalítica ADP-ribosiltransferase, enquanto que a subunidade B possui receptores a nível celular com função de ligação. O principal receptor para LTB é o gangliosídeo GM1, o qual está amplamente distribuído na superfície de células eucarióticas. A entrada da subunidade A (porção tóxica) para o interior da célula ocorre quando a LTB se liga à

GM1 (SPANGLER, 1992). A capacidade de ligação da LTB à GM1 está diretamente associada a sua função adjuvante (DE HAAN et al., 1998). Além disso, ela depende da forma de combinação ao antígeno (co-administrada ou fusionada) (O'HAGAN; VALIANTE, 2003), da via de imunização (via mucosa ou parenteral) (HAAN et al., 2001, PITCOVSKI et al., 2006) e da dose administrada (WELTZIN et al, 2000; FISCHER et al., 2010).

A LTB é normalmente utilizada como potente adjuvante de mucosa (FINGERUT et al., 2006; YAMANAKA et al., 2006). Entretanto, estudos têm demonstrado que a sua administração via parenteral também é capaz de estimular resposta secretória e sistêmica de anticorpos (FISCHER et al., 2010).

Diversos antígenos podem ser conjugados a LTB através de fusão genética (produzindo quimeras protéicas) ou por conjugação química. Em alguns estudos, a administração da LTB fusionada foi capaz de estimular uma resposta sistêmica e secretória de anticorpos antígeno-específicos (WELTZIN et al., 2000, RICHARDS et al., 2001, FINGERUT et al., 2006, CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006, YAMANAKA et al., 2006, FU et al., 2009), e em outros, a co-administração da LTB a antígenos aumentou a resposta imune (WELTZIN et al., 2000, HAAN et al., 2001).

Estudos têm apontado a LTB como um adjuvante completo, capaz de induzir resposta imune celular, incluindo células T citotóxicas (SIMMONS et al., 2001), e humoral, estimulando resposta sistêmica e secretória de anticorpos contra antígenos co-administrados ou fusionados (GREEN et al, 1996, VERWEIJ, et al., 1998, WELTZIN et al. 2000, CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006, FINGERUT, 2006, PITCOVSKI et al., 2006). A LTB também ativa a diferenciação seletiva de linfócitos (WILLIAMS, 2000), influencia na maturação e ativação de células dendríticas (PETROVSKA et al., 2003, PITCOVSKI et al., 2006) e aumenta a apresentação de antígenos via MHC classe II (NASHAR; BETTERIDGE; MITCHELL, 2001, BONE; ECKHOLDT; WILLIAMS, 2002). Acredita-se que estas sejam a base de seu efeito imunoestimulatório (FINGERUT et al., 2006).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas e condições de crescimento

Cepas de referência de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* foram utilizadas, respectivamente, para a obtenção de DNA genômico e para a determinação da dose mínima necessária para provocar a morte de pelo menos 50% da população em estudo (DL_{50}) e da dose oral mínima capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos. Uma colônia isolada de cada uma das cepas foi cultivada em tubos contendo 2 mL de caldo Luria-Bertani (LB) e os tubos foram incubados a 37 °C, em agitador orbital (200 rpm) por 18 h. Em seguida, os tubos contendo os cultivos foram centrifugados, os pellets celulares foram lavados 3 vezes em salina fosfatada tamponada (PBS) estéril, pH 7,4 e a concentração celular ajustada para densidade ótica (DO_{600}) 1,0. As cepas foram armazenadas congeladas a -80 °C em alíquotas de 1 mL na concentração final de 20% de glicerol, até o momento do uso.

As bactérias utilizadas nos experimentos de clonagem e expressão das proteínas recombinantes (cepas de *Escherichia coli* comerciais) foram adquiridas da empresa Invitrogen (USA). A cepa *E. coli* Top10F foi utilizada para a construção dos vetores recombinantes, enquanto que *E. coli* BL21 (DE3) Star, pLysS e Ril foram empregadas na expressão das proteínas. As cepas foram cultivadas em caldo LB à 37 °C, em agitador orbital (200 rpm) por 18 h, em meio suplementado com 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cloranfenicol, quando necessário.

4.2 Clonagem e expressão das proteínas recombinantes FimA (rFimA) e FimA fusionada a LTB (quimera rLTB/FimA)

4.2.1 Desenho dos *primers*

Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados, com o objetivo de amplificar a região codificadora do gene que codifica a subunidade fimbrial principal da fímbria tipo 1 de salmonelas (*fimA*), a partir da seqüência do gene depositado no banco de dados de genomas GenBank (número de acesso S76043). Um fragmento de aproximadamente 496 pares de bases (pb), correspondente a região codificadora do gene sem a porção hidrofóbica da proteína FimA nativa, é esperado após a amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a clonagem

direcional do gene *fimA* no plasmídeo pAE (RAMOS et al., 2004) para a obtenção de rFimA, foi desenhado um *primer forward* contendo um sítio de restrição para a enzima *BamH I* e, para a clonagem do gene *fimA* no plasmídeo pAE/*ltb* (CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006) para a obtenção de rLTB/FimA, outro *primer forward* contendo um sítio de restrição para enzima *Kpn I*. Para ambas as clonagens foi desenhado um único *primer reverse* contendo um sítio de restrição para a enzima *EcoR I* (tab. 1).

Tabela 1 - Seqüência dos *primers* utilizados para a amplificação do fragmento da região codificadora do gene *fimA* para a obtenção de rFimA e rLTB/FimA e enzimas de restrição utilizadas na clonagem.

Primers	Seqüência dos primers 5' - 3'^a	Enzima
LTB/FimAFor	F: GGGGTACCGATCCTACTCCGGTGAGC	<i>Kpn I</i>
FimAForNew	F: TTCGGATCCGATCCTACTCCGGTGAGC	<i>BamH I</i>
FimARev^b	R: CCGAATTCTCACATGATAAAGGTGGCG	<i>EcoR I</i>

^a Em negrito, os sítios de restrição das enzimas.

^b *primer reverse* utilizado para amplificar o fragmento do gene *fimA* em ambas as clonagens. For/Rev : *primer forward* e *reverse*, respectivamente.

4.2.2 Extração de DNA genômico de *S. Enteritidis*

O DNA genômico de *S. Enteritidis* foi extraído conforme método adaptado a partir de Sambrook e Russell (2001). Primeiramente, 1,5 mL de um cultivo de *S. Enteritidis* foi centrifugado por 5 min a 15700 x g a temperatura ambiente. O *pellet* formado foi ressuspensão em 100 µL de tampão STES [Tris-HCl 0,2 M; NaCl 0,5 M; SDS 0,1%; EDTA 0,01 M; pH 7,6] e aproximadamente 50 µg de pérolas de vidro e 100 µL de fenol-clorofórmio foram adicionados à mistura, a qual foi homogeneizada e centrifugada nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi coletado, a este foi adicionado etanol 100% (2X o volume inicial) e NaCl 5 M (0,1X o volume inicial) e a mistura foi incubada a -20 °C por 1 h. Em seguida, foi realizada nova centrifugação a 15700 x g por 20 min, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* lavado 2 vezes em álcool 70%, deixado secar a 37 °C e o DNA eluído em 30 µL de tampão de eluição (Tris-EDTA, Tris-HCl 100 mM pH 7,4, EDTA 10 mM pH 8). Às amostras de DNA extraídas foi adicionado 1 µL de RNase (10 mg.mL⁻¹). A pureza do DNA

extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e as amostras armazenadas à -20 °C até o momento do uso.

4.2.3 Amplificação por PCR do fragmento da região codificadora do gene *fimA* de *S. Enteritidis*

O fragmento da região codificadora do gene *fimA* foi amplificado por PCR utilizando DNA genômico de *S. Enteritidis* como DNA molde. Para padronização da reação, foram testadas diferentes temperaturas de anelamento, concentrações de *primers* e de MgCl₂. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo aproximadamente 20 ng de DNA molde, 0,4 µM de cada um dos *primers forward* e *reverse*, 1,5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTPs, 1x tampão PCR e 1 unidade da enzima Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen). As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf (modelo Mastercycle Gradient) sendo submetidas às etapas de desnaturação inicial (94 °C, 7 min) seguida de 35 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 min), anelamento (45 °C, 1 min) e extensão (68 °C, 2 min). Ao término destes 35 ciclos, a reação foi submetida a um ciclo de extensão final (68 °C, 7 min). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com kit GFXTM PCR and gel Band Purification (GE Healthcare), de acordo com as orientações do fabricante.

4.2.4 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene *fimA* no vetor pAE

Todos os procedimentos de clonagem foram realizados de acordo com metodologia descrita por Sambrook & Russell (2001), com algumas modificações. O fragmento da região do gene que codifica a proteína FimA sem a porção hidrofóbica (produto da PCR) amplificado com os *primers* FimAForNew e FimARev e o vetor pAE foram digeridos com as enzimas de restrição *BamH* I e *EcoR* I 37 °C por 1 h e purificados com o kit GFXTM PCR DNA and gel Band Purification. A reação de ligação foi realizada mediante relação equimolar entre inserto e vetor, na presença da enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) a 16 °C, por 1 h.

Um volume de 1 µL do produto da ligação foi utilizado para transformar, por eletroporação, 50 µL de células competentes de *E. coli* Top10F (Invitrogen), as quais foram preparadas segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). O

produto da transformação foi cultivado em placa contendo ágar LB suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina a 37°C , *overnight*. As colônias obtidas foram submetidas a um processo de triagem rápida pelo método microprep (JOUGLARD et al., 2002) para identificação dos clones recombinantes, e aquelas selecionadas foram cultivadas em 5 mL de caldo LB suplementado com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ampicilina. DNAs plasmidiais foram extraídos de 1,5 mL desses cultivos utilizando-se o kit de extração de DNA plasmidial GFXTM Micro Plasmid Prep (GE Healthcare).

4.2.5 Clonagem do fragmento da região codificadora do gene *fimA* no vetor pAE/*ltb*

A construção da quimera rLTB/FimA foi realizada utilizando-se o fragmento da região do gene que codifica a proteína FimA sem a porção hidrofóbica (produto da PCR) amplificado com os *primers* LTB/FimAFor e FimARev e o vetor de expressão em *E.coli* pAE contendo o gene *ltb* (pAE/*ltb*) (CONCEIÇÃO; MOREIRA; DELLAGOSTIN, 2006). O produto da PCR e o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *Kpn* I e *EcoR* I e purificados com o kit GFXTM PCR DNA and gel Band Purification. A reação de ligação e a obtenção dos clones recombinantes foram realizadas conforme descrito anteriormente.

4.2.6 Sequenciamento e análise de restrição dos vetores recombinantes

Para verificar se a clonagem foi realizada com sucesso, os vetores construídos (pAE/*fimA* e pAE/*ltb-fimA*) foram digeridos com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na construção, a fim de gerar dois fragmentos a partir da clivagem entre o inserto e o vetor. Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 0,8%. Além disso, os vetores foram sequenciados em seqüenciador MegaBACE 1000 (Amershan Biosciences, GE Healthcare). Os dados provenientes do seqüenciamento foram agrupados e analisados no programa ContigExpress (Invitrogen), e as *contigs* foram alinhadas no programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) com outras seqüências previamente depositadas no GenBank.

4.2.7 Avaliação da expressão das proteínas rFimA e rLTB/FimA

Os clones recombinantes, confirmados por seqüenciamento e análise de restrição, foram utilizados para transformar células competentes de *E. coli* BL21

(DE3), visando a expressão das proteínas recombinantes. As proteínas foram produzidas fusionadas á uma cauda de 6 histidinas, a fim de favorecer a sua purificação. Primeiramente, foi avaliada a expressão em pequena escala utilizando-se a cepa *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada por eletroporação com os clones pAE/*fimA* e pAE/*ltb-fimA*. Para avaliar a expressão da rFimA e da rLTB/FimA em diferentes cepas de expressão em procariotos, os clones recombinantes foram utilizados para transformar, por choque térmico, células de *E. coli* BL21 (DE3) Star, pLysS e Ril. As células recombinantes, selecionadas em ágar LB, foram cultivadas em 5 mL de caldo LB, ambos contendo os antibióticos correspondentes nas concentrações adequadas para cada, e os cultivos foram mantidos sob agitação de 200 rpm, a 37 °C, *overnight*. Passado esse período, 1 mL do cultivo foi adicionado a tubos contendo 9 mL de caldo LB acrescido de 100 µg.mL⁻¹ de ampicilina e os tubos foram incubados a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, até a fase log de crescimento (DO₆₀₀ de 0,6 a 0,8). Nesse momento, o cultivo foi dividido em duas alíquotas de volumes iguais: uma suplementada com 0,5 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG), para induzir a expressão da proteína recombinante, e a outra não foi induzida, para posterior utilização como controle negativo. Para avaliar a expressão das proteínas recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), após 3 h de incubação nas mesmas condições iniciais, 1 mL de cada alíquota foi coletado, centrifugado a 15700 x g por 1 min, 5 µL de tampão de amostra foi acrescentado aos *pellets* formados (extrato protéico total de cada clone) e a mistura submetida a SDS-PAGE a 12%, como descrito por Sambrook e Russel (2001).

Para avaliar a expressão das proteínas recombinantes por *Dot blot*, após 3 h de incubação, aproximadamente 10 µL das culturas foram aplicadas diretamente em membranas de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare). As membranas foram secas à temperatura ambiente por aproximadamente 10 min, bloqueadas com 5% de leite em pó diluído em PBS por 1 h, lavadas 3 vezes em PBS, pH 7,4 acrescido de 0,5% de Tween 20 (PBS-T) e incubadas com anticorpo monoclonal anti-cauda de histidina (Anti-His, Sigma) (1:5000). Após 1 h, nova lavagem foi realizada e anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase (1:3000) foi adicionado e incubado por mais 1 h. A reação de *Dot blot* foi revelada incubando-se a membrana em solução cromógena de tetrahidrocloro de diaminobenzedina

(DAB, 0,6 mg de 3.3 diaminobenzidina-tetrahydrocloro; 10 μ L de H₂O₂ 30%; 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6; 1 mL de Sulfato de Níquel 0,3%) até o desenvolvimento de cor. Todas as reações foram realizadas a temperatura ambiente. Como controle positivo da reação, foi utilizada uma proteína recombinante de 44 kDa (rOmpX) e, como controle negativo, alíquotas das culturas não induzidas.

A avaliação da expressão das proteínas recombinantes por *Western blot* foi realizada conforme descrito por Sambrook e Russell (2001). As proteínas foram submetidas à SDS-PAGE 15% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare), a qual foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em PBS-T e incubada *overnight* a 4 °C. A membrana contendo a rFimA e rLTB/FimA foi incubada em PBST contendo anticorpo monoclonal anti-cauda de histidina (Anti-His, Sigma) (1:5000) e contendo anticorpo de cabra anti-imunoglobulina de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) (1:3000), ambos por 1h a temperatura ambiente. Após cada uma das incubações, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T. Por fim, a reação foi revelada em solução cromógena de tetrahydrocloro de diaminobenzidina (DAB, 0,6 mg de 3.3 diaminobenzidina-tetrahydrocloro; 10 μ L de H₂O₂ 30%; 9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,6; 1 mL de Sulfato de Níquel 0,3%) até o desenvolvimento de cor.

4.2.8 Expressão das proteínas rFimA e rLTB/FimA em larga escala

Para a expressão das proteínas recombinantes em maior escala, a cepa *E. coli* BL21 (DE3) Ril foi utilizada. Um clone recombinante de cada plasmídeo foi usado para inocular 25 mL de caldo LB contendo 100 μ g.mL⁻¹ de ampicilina e 50 μ g.mL⁻¹ de cloranfenicol e cultivado *overnight*, a 37 °C, sob agitação (200 rpm). Esse cultivo foi utilizado para inocular 500 mL de caldo LB, nas mesmas condições anteriormente descritas, até atingir a fase log de crescimento. Neste momento, a expressão das proteínas foi induzida com 0,5 mM de IPTG por 3 h.

4.2.9 Purificação das proteínas recombinantes

A purificação da rFimA e da rLTB/FimA foi realizada através de cromatografia de afinidade em coluna Hi-Trap (GR Healthcare) carregada com níquel (Ni⁺²-Sepharose, Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Para purificação das proteínas recombinantes em maior escala, os 500 mL do cultivo foram divididos em

duas partes iguais e centrifugados a 12076 x g por 20 min a 4 °C. Os *pellets* celulares foram ressuspensos em PBS contendo 0,05% de Triton X-100 (PBS-Triton X-100), pH 7,4, suplementado com 250 µL de lisozima e as soluções incubadas a 4 °C por 1 h, sob agitação. Em seguida, as células foram sonicadas (6x, 15 s, 20 kHz), as soluções centrifugadas a 12076 x g por 30 min a 4 °C e os *pellets* lavados 4 vezes em PBS-Triton X-100. Um dos *pellets* resultantes das lavagens de cada amostra foi ressuspensão em 30 mL de tampão ÄKTA wash (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazole) e o outro em 30 mL de tampão ÄKTA wash contendo 6 M de uréia. As soluções foram mantidas sob agitação de 60 rpm à 4 °C por 24 h. Os *pellets* das amostras que se mostraram insolúveis foram novamente centrifugados e submetidos a SDS-PAGE 15%. Todos os sobrenadantes obtidos foram filtrados em filtro 0,8 µm (Millipore) e submetidos à purificação por cromatografia de afinidade. Ao final, as eluições das proteínas foram coletadas em alíquotas de 1 mL e o grau de pureza das proteínas recombinantes visualizado através de SDS-PAGE 15%.

4.2.10 Diálise, concentração e quantificação das proteínas recombinantes

As frações eluídas contendo as proteínas recombinantes coletadas durante o processo de purificação foram dialisadas de forma rápida. As frações foram depositadas em membranas de diálise e dializadas contra tampão Tris 100 mM NaCl 200 mM, pH 8,0 (1000x o volume) a 4 °C por aproximadamente 24 h. Durante esse período, foram realizadas duas trocas de todo o tampão. Ao final do processo de diálise, as proteínas rFimA e rLTB/FimA foram concentradas em solução de polietilenoglicol (PM 20.000) a 20% e quantificadas pelo Kit BCATM Protein Assay (Pierce), segundo instruções do fabricante.

4.2.11 Avaliação da conformação da LTB expressa através da sua ligação ao gangliosídeo GM1

Como a atividade biológica da LTB depende de sua ligação ao gangliosídeo GM1, e essa ligação depende da adequada conformação tridimensional da LTB, a atividade biológica da LTB expressa foi avaliada examinando sua ligação a este receptor utilizando um ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) indireto. Placas de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng por cavidade de

gangliosídeo GM1 bovino (Sigma Aldrich Co.) diluído em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) (100 µL/cavidade) e incubadas *overnight* a 4 °C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com 200 µL de PBS-T por cavidade e bloqueadas com 1% de leite em pó diluído em PBS-T. Todas as reações subseqüentes ocorreram por 1 h a 37 °C, os reagentes foram utilizados a um volume de 100 µL/cavidade e após todas as etapas de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com 200 µL/cavidade de PBS-T. Após a etapa de bloqueio das placas, foram adicionadas, em triplicata, 100 ng por cavidade de rLTB (FISCHER et al., 2010), rLTB/FimA, rFimA ou CT (Sigma Aldrich Co.) e as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C. Após, foi adicionado anticorpo de coelho anti-CT na diluição 1:6000 ou anticorpo anti-FimA 1:100 e as placas incubadas por 1 h a 37 °C. Após as lavagens, as placas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-anticorpo de coelho conjugado a peroxidase (1:6000) ou anticorpo de cabra anti-anticorpo de camundongo conjugado a peroxidase (1:6000), conforme o anticorpo primário utilizado. Após a remoção do excesso de conjugados através de 5 lavagens com PBS-T, as reações foram reveladas utilizando solução contendo ortofenilenodiamina (OPD) diluída em tampão citrato-fosfato pH 4,0 (0,2 M com 0,01% de H₂O₂) e as placas incubadas ao abrigo da luz por 15 minutos. A reação foi cessada através da adição de 25 µL de H₂SO₄ e a leitura realizada em espectrofotômetro para microplacas (Thermo Plate) com filtro de 492nm. Como controle sobre a ligação específica entre as proteínas e o gangliosídeo utilizou-se poços sem GM1, como controles negativos, rFimA e PBS, e como controle positivo utilizou-se a proteína CT.

4.3 Produção, purificação e quantificação de anticorpo policlonal anti-rFimA

Camundongos da linhagem BALB/c com 6-8 semanas de idade foram imunizados via intraperitoneal (i.p.) com 50 µg da proteína recombinante. No dia zero, os camundongos receberam a dose de proteína co-administrada com Adjuvante de Freund Completo e as doses subseqüentes foram realizadas com Adjuvante de Freund Incompleto, totalizando 4 imunizações. No sexto dia após a primeira imunização os camundongos foram tratados, via i.p., com 0,5 mL de Pristane (Sigma). Em torno do décimo dia após a última imunização, os camundongos foram puncionados para a retirada do fluido ascítico, que, em

seguida, foi centrifugado por 5 min a 1.500 x g. Para a purificação, os sobrenadantes dos fluidos ascíticos foram filtrados em filtro de 0,8 μm e purificados em coluna de proteína A-Sepharose de acordo com as instruções do fabricante (Amersham, MS). Alíquotas de 1 mL foram coletadas em Tris-HCl pH 9 e dialisadas contra PBS (500 x o volume total das frações) a 4 °C por 24 h. Após a diálise, os anticorpos foram concentrados em solução de polietilenoglicol a 20% (PM 20.000) e a concentração (mg.mL^{-1}) dos anticorpos foi determinada por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 280 nm. O cálculo foi realizado através do coeficiente de extinção da IgG (1,35). Após purificação, os anticorpos policlonais foram titulados através de ELISA indireto com a proteína rFimA ajustada para 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os anticorpos foram armazenados a -20 °C até o momento do uso.

4.4 Avaliação do efeito adjuvante da LTB sobre a resposta imune humoral e proteção contra infecção por *S. Typhimurium* em camundongos

4.4.1 Determinação da DL_{50} 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_{50}) e a dose oral mínima capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos. *S. Typhimurium* armazenada em glicerol a 20% a -80 °C (50 μL) foi cultivada em 950 μL de caldo LB e o cultivo incubado a 37 °C, sob agitação de 200 rpm, por 18 h. Após este período, o cultivo foi transferido para 19 mL de 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 D.O. das diluições foram lidas em espectrofotômetro a 600 nm para quantificação do número de células presentes em cada diluição (FRANÇA et al., dados não publicados).

A DL_{50} 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 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 células de *S. Typhimurium*. Os animais foram monitorados diariamente para determinação da DL_{50}

e os que sobreviveram após 10 dias, foram sacrificados por eutanásia e tiveram seu baço, fígado e intestino dissecados e analisados histopatologicamente para a determinação da dose oral mínima capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos.

4.4.2 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 66 camundongos BALB/c fêmeas, de 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da UFPel. Os mesmos foram separados em 11 grupos contendo 6 animais cada. Os camundongos foram vacinados com rFimA e com rFimA fusionada (rLTB/FimA) ou co-administrada à LTB (rFimA + rLTB) por duas vias: via oral (v.o.) e intramuscular (i.m.). Os grupos vacinais e as doses inoculadas são demonstrados na tab. 2. O grupo 9 foi imunizado com rFimA co-administrada com adjuvante de Freund incompleto em quantidade equimolar, não ultrapassando o volume final total de 200 μ L. O protocolo de imunização consistiu de 3 doses, com intervalo de 10 dias entre cada uma delas (dias 0, 10 e 20).

Tabela 2 - Grupos vacinais e a quantidade de antígeno e adjuvante inoculados por diferentes vias de administração.

Grupos	Via administração	Vacina	Quantidade inoculada
1	v.o. ^a	rFimA	60 µg de rFimA
2	v.o.	rLTB/FimA	40 µg de rLTB e 60 µg de rFimA
1	v.o.	rFimA+rLTB	60 µg de rFimA+40 µg de rLTB
4	v.o.	rLTB	40 µg de rLTB
5	v.o.	PBS	100 µL
6	i.m. ^b	rFimA	60 µg de rFimA
7	i.m.	rLTB/FimA	40 µg de rLTB e 60 µg de rFimA
8	i.m.	rFimA+rLTB	60 µg de rFimA+40 µg de rLTB
9	i.m.	rFimA+Adj. Inc. ^c	60 µg de rFimA+AI
10	i.m.	rLTB	40 µg de rLTB
11	i.m.	PBS	100 µL

^a v.o. via oral

^b i.m. via intramuscular

^c Adjuvante de Freund Incompleto

No 10º dia após a última imunização (dia 30), os camundongos imunizados via oral foram infectados com a dose mínima da cepa de *S. Typhimurium* utilizada capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos (10^2 células) e monitorados diariamente. No 20º dia após a última imunização (dia 40), os camundongos foram eutanaziados em condições assépticas para coleta do baço, do intestino e do fígado.

Os camundongos dos grupos imunizados via intramuscular foram desafiados no 10º após a última imunização (dia 30) com aproximadamente 5×10^3 células de *S. Typhimurium* ($100 \times DL_{50}$), 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.

4.4.3 Análise histopatológica

Amostras do baço, fígado e intestino foram coletadas em condições assépticas e submersas em formol tamponado 10%. Os fragmentos foram submetidos à técnica histológica de rotina e coloração com método usual de hematoxilina-eosina. As lâminas com cortes histológicos foram avaliadas quanto à presença ou ausência de lesão.

4.4.4 Avaliação da resposta imune humoral

Para a avaliação da resposta imune humoral, soros dos animais imunizados foram coletados através do plexo retro ocular nos dias zero (pré-imune), 9, 19, 29 e 39 após a primeira imunização, processados e mantidos a -20 °C até o momento do uso. Todas as respostas imunes humorais foram avaliadas individualmente, através de ELISA indireto, utilizando rFimA e/ou rLTB como antígenos. Todas as reações ocorreram por 1 h (com exceção da sensibilização que ocorreu overnight), os reagentes foram utilizados a um volume 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 D.O.s realizada em espectrofotômetro para microplacas Thermo Plate a 450nm. Como controle negativo das reações, foi utilizado soro de camundongo não imunizado, e como controle positivo, anticorpo policlonal anti-rFimA.

4.4.4.1 IgG total

A determinação de IgG total anti-rFimA e anti-rLTB dos soros coletados foi realizada através de ELISA indireto. Cavidades de microplacas de 96 cavidades de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng de rFimA ou 100 ng de rLTB, diluídas em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6), e as placas incubadas a 4 °C, *overnight*. Em seguida, os soros dos animais coletados nos dias zero, 9, 19, 29 e 39 e os soros controles, diluídos 1:100 em PBS-T, foram adicionados e as placas incubadas a 37 °C por 1 h. Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a

peroxidase (1:3000) diluído em PBS-T foi adicionado às placas e as mesmas foram novamente incubadas a 37 °C por 1 h. Passado esse período, a reação foi revelada e a leitura efetuada conforme descrito anteriormente. A avaliação dos soros de cada animal foi realizada em triplicata. Após, a avaliação das respostas imunes anti-rFimA e anti-rLTB foram realizadas com os soros dos animais coletados no dia 29, diluídos 1:100 em PBST.

4.4.4.2 IgG2a e IgG1

Para determinação do nível de anticorpos IgG1 e IgG2a contra o antígeno rFimA, cavidades de microplacas de 96 cavidades de poliestireno foram sensibilizadas com 100 ng de rFimA em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6) e as placas mantidas a 4 °C, *overnight*. Após lavagem das placas para remoção de antígenos não ligados, diluições dos soros dos animais vacinados coletados no dia 29 após a 1ª imunização (1:100 em PBS-T) foram adicionadas às cavidades das placas e estas incubadas a 37 °C por 1 h. Após, anticorpo de cabra anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo (Sigma), diluídos 1:4000 em PBS-T e anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase (Sigma), diluído 1:4000 em PBS-T foram adicionados às cavidades das placas e estas foram incubadas por 1 h a 37 °C. Após esse período, foi adicionada a solução cromógena e efetuada a leitura. A titulação dos soros de cada animal foi realizada em duplicata.

4.4.4.3 IgA sérica e secretória

Os níveis de IgA sérica e secretória foram determinados por ELISA indireto utilizando 100 ng de rFimA como antígeno imobilizado nas cavidades de microplacas de 96 cavidades. Para determinação do nível de anticorpos IgA séricos contra o antígeno rFimA, diluições dos soros dos animais vacinados coletados no dia 29 após a 1ª imunização (1:50 em PBS-T) foram adicionadas às placas. Para determinação do título de anticorpos IgA secretórios contra o antígeno rFimA, fezes de todos os grupos vacinais foram coletadas nos dias 0, 9, 19, 29 e 39 após a 1ª imunização e raspados de mucosa intestinal dos grupos vacinados via oral foram coletados após a eutanásia dos animais. O *pool* das fezes coletadas no dia 29 de cada grupo foi pesado, homogeneizado adicionando-se solução de 5 mM de EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% de gelatina, 0,05% de Tween 80 e 0,05% de NaN₃ diluído em PBS (2X o peso

inicial) e mantidos sob agitação de 60 rpm a 4 °C *overnight*. Após, a solução foi centrifugada a 1500 x g por 4 min e o sobrenadante adicionado diretamente às cavidades da placa. A mesma metodologia foi realizada com os raspados de mucosa intestinal dos animais vacinados via oral. As placas foram incubadas por 2 h a 37 °C e em seguida, anticorpo de cabra anti-IgA de camundongo (Sigma) diluído 1:2000 em PBS-T foi adicionado às cavidades. Após 1 h de incubação a 37 °C, anticorpo de coelho anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase, diluído 1:4000 em PBS-T, foi adicionado às placas e estas novamente incubadas sob as mesmas condições. Finalmente, foi adicionada a solução cromógena e efetuada a leitura. A avaliação do *pool* das fezes e o raspado de mucosa foram realizadas em duplicata.

4.5 Análise estatística

Análise de variância e teste de Tukey foram utilizados para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias aritméticas. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistix 9.

5. RESULTADOS

5.1 Amplificação por PCR do fragmento da região codificadora do gene *fimA* de *S. Enteritidis*

Os fragmentos da região codificadora do gene *fimA* foram amplificados por PCR a partir dos *primers* descritos na tab. 1 e visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1% (Fig. 1). Tais oligonucleotídeos foram desenhados de forma a amplificar fragmentos do gene que codificam a proteína FimA sem a porção hidrofóbica N-terminal (peptídeo sinal), correspondentes a 496 pb. Como controles positivos, foram utilizados *primers* que amplificam um fragmento de 566 pb, correspondente ao gene *fimA* inteiro e *primers* que amplificam um fragmento de 1140 pb, correspondente ao gene *ompX* de *S. Enteritidis*.

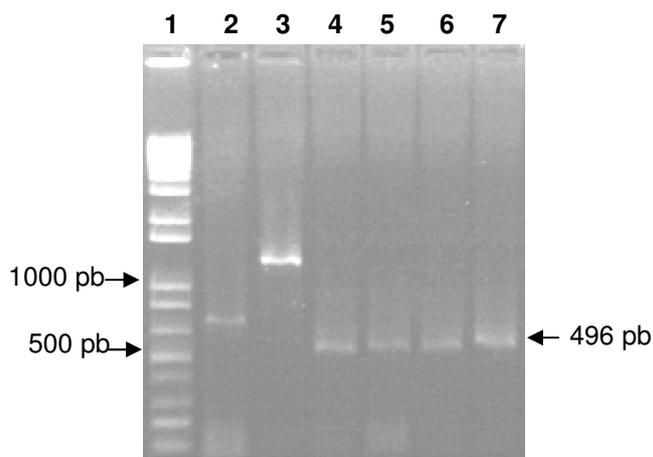


Figura 1. Análise em gel de agarose 1% do fragmento da região codificadora do gene *fimA* amplificado por PCR. 1- Marcador de massa molecular 1kb DNA Plus Ladder (Invitrogen); 2- Fragmento da região codificadora do gene *fimA* inteiro (contendo o peptídeo sinal); 3- Fragmento da região codificadora do gene *ompX*; 4 e 5- Fragmento da região codificadora do gene *fimA* sem a porção hidrofóbica N-terminal para clonagem no vetor pAE; 6 e 7- Fragmento da região codificadora do gene *fimA* sem a porção hidrofóbica N-terminal para clonagem no vetor pAE/ltb.

5.2 Obtenção dos clones recombinantes pAE/*fimA* e pAE/*ltb-fimA*

Os produtos purificados da PCR, bem como os vetores pAE e pAE/*ltb* foram digeridos com as enzimas de restrição correspondentes, conforme apresentado na tab. 1 e posteriormente purificados. A eficiência das digestões foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Fig. 2). Após, os vetores foram desfosforilados, purificados e submetidos à reação de ligação aos insertos, resultando em pAE/*fimA* e pAE/*ltb-fimA* (Fig. 3).

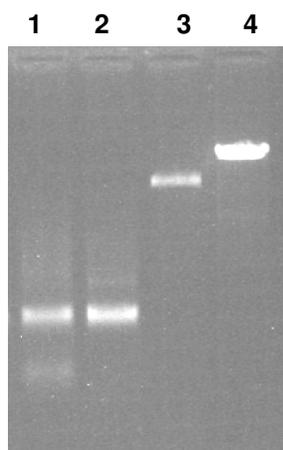


Figura 2. Análise em gel de agarose 0,8% das digestões dos vetores pAE e pAE/*ltb* e dos respectivos fragmentos do gene *fimA* purificados. 1- Fragmento do gene *fimA* digerido com *KpnI* e *EcoRI*; 2- fragmento do gene *fimA* digerido com *BamHI*; 3- pAE digerido com *BamHI* e *EcoRI*; 4 – pAE/*ltb* digerido com *KpnI* e *EcoRI*.

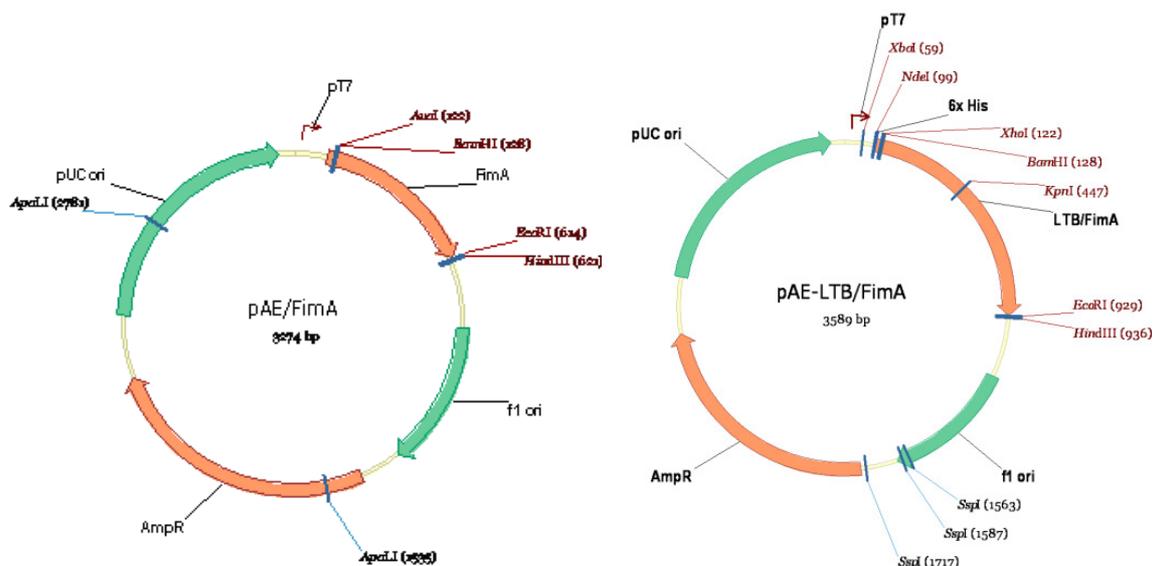


Figura 3. Mapa representativo dos vetores recombinantes pAE/*fimA* e pAE/*ltb-fimA*, obtido através do software VectorNTI 9.1.

Os produtos das ligações (pAE/*fimA* e pAE/*ltb-fimA*) foram utilizados para transformar células de *E. coli* Top10F' eletrocompetentes que, depois de cultivadas em placas, foram submetidas a triagem pelo método de lise rápida “microprep”. Os clones caracterizados como possíveis recombinantes foram cultivados e seus DNAs

plasmidiais extraídos (Fig. 4), digeridos com as enzimas de restrição utilizadas nas clonagens, para confirmação da presença do inserto, e sequenciados. Uma banda de aproximadamente 496 pb, referente ao fragmento amplificado a partir do gene *fimA* (inserto), e outra banda de 2788 pb, correspondente ao vetor pAE, foram obtidas a partir da digestão do clone recombinante pAE/*fimA*. A digestão do clone recombinante pAE/*ltb-fimA* gerou o padrão de bandas esperado, ou seja, uma banda correspondente ao fragmento do gene *fimA* e outra, ao vetor pAE/*ltb*, ambas dos tamanhos esperados. A orientação, fase e sequência dos insertos, e a legitimidade da fusão entre os genes *ltb/fimA* foram confirmadas através do seqüenciamento dos vetores construídos.

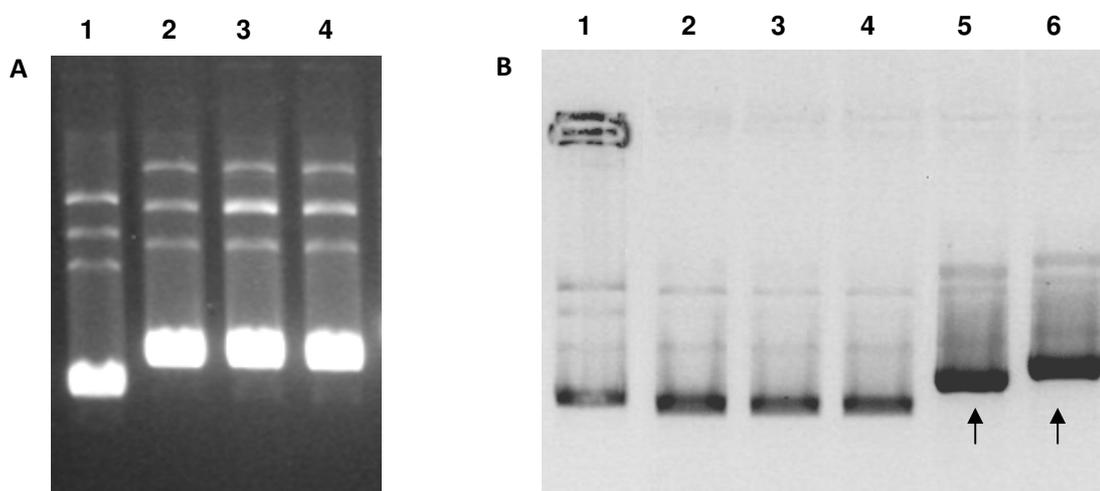


Figura 4. Análise em gel de agarose 0,8% da extração do DNA plasmidial dos clones recombinantes. **A.** 1- pAE/*ltb*; 2 a 4- clones pAE/*ltb-fimA* recombinantes. **B.** 1- pAE; 2 a 6- extração de DNA total de colônias cultivadas após transformação com o produto da ligação. Setas indicando possíveis clones recombinantes.

5.3 Avaliação da expressão das proteínas recombinantes FimA e LTB/FimA

Os clones caracterizados como recombinantes foram cultivados em caldo LB e tiveram sua expressão induzida. Os *pellets* formados a partir da centrifugação de 1 mL dos cultivos foram coletados e utilizados para verificar a expressão das proteínas recombinantes, através de SDS-PAGE 15% com extrato protéico total de cada clone.

E. coli BL21 (DE3) Star transformada com os vetores de expressão pAE/*fimA*

e pAE/*ltb-fimA* expressaram com eficiência uma proteína recombinante de aproximadamente 17,5 kDa e outra de 37,5 kDa, massas moleculares previstas para rFimA e para rLTB/FimA, respectivamente (Fig. 5 A). A expressão de rFimA e rLTB/FimA foi confirmada também através de *Western blot* utilizando MAb anti-histidina como anticorpo primário (Fig. 5 B). O vetor pAE, utilizado para as clonagens, expressa proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de seis resíduos de histidinas, na porção N-terminal, o que possibilita a purificação da proteína de interesse por cromatografia de afinidade, utilizando colunas com níquel, e a sua detecção por imunotécnicas, utilizando MAb anti-histidina como anticorpo primário.

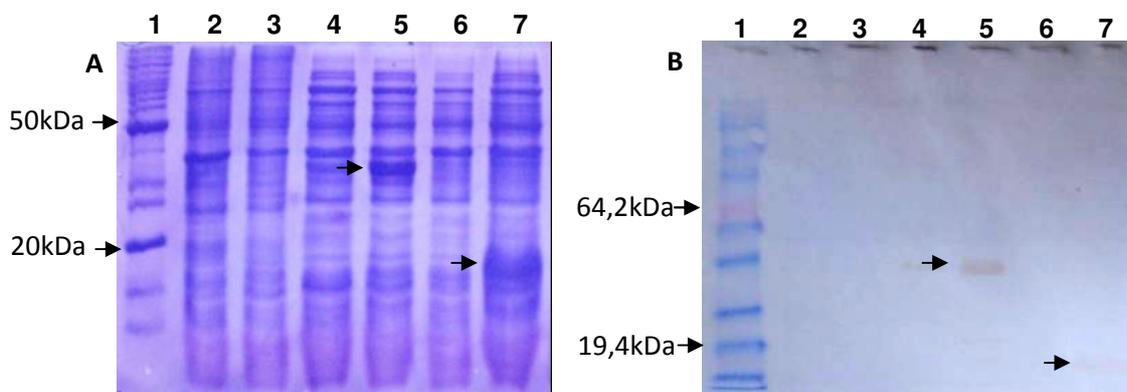


Figura 5. Expressão em pequena escala da rFimA e rLTB/FimA (indicadas pelas setas). **A-** SDS-PAGE 15%; 1- Marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen); **B-** *Western blot*; 1- Marcador de massa molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen); **A e B-** 2- *E. coli* BL21 (DE3) Star não induzida; 3- *E. coli* BL21 (DE3) Star induzida; 4- *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/*ltb-fimA* não induzida; 5- *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/*ltb-fimA* induzida; 6- *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/*fimA* não induzida; 7- *E. coli* BL21 (DE3) Star transformada com pAE/*fimA* induzida.

Dot blot foi realizado para avaliar a expressão das proteínas recombinantes pelas cepas de expressão *E. coli* BL21 (DE3) Star, pLysS e Ril. Pode-se observar diferentes níveis de expressão das proteínas recombinantes rFimA e rLTB/FimA em função da cepa utilizada (Fig. 6). A cepa de *E. coli* BL21 (DE3) Ril apresentou o melhor desempenho e foi a selecionada para a expressão em larga escala, tanto da rFimA, quanto da rLTBFimA.

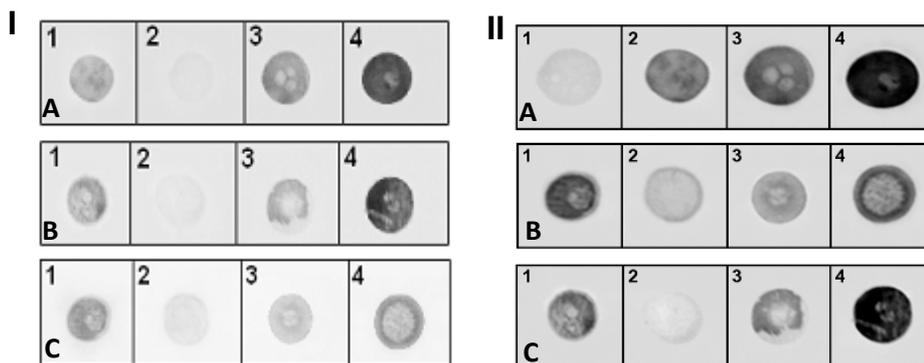


Figura 6. Dot blot da expressão da rFimA e rLTB-FimA pelas cepas de *E. coli* BL21 (DE3) Ril (**A**), Star (**B**) e pLysS (**C**); **I-** Dot blot da expressão da rFimA 1– rOmpX; 2– *E. coli* não induzida; 3 – *E. coli* transformada com pAE/*fimA* não induzida; 4 - *E. coli* transformada com pAE/*fimA* induzida. **II-** Dot blot da expressão da rLTB/FimA. 1– rOmpX; 2–*E. coli* não induzida; 3 – *E. coli* transformada com pAE/*ltb-fimA* não induzida; 4 - *E. coli* transformada com pAE/*ltb-fimA* induzida.

Para a produção das proteínas recombinantes em maior escala, os cultivos foram realizados em caldo LB, em um volume final de 500 mL. As avaliações das expressões da rFimA e da rLBT/FimA em larga escala são demonstradas na Fig. 7.

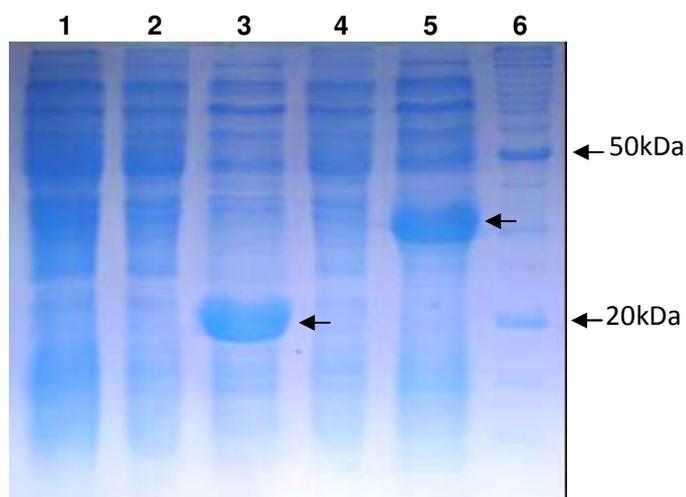


Figura 7. SDS-PAGE 15% da expressão em larga escala da rFimA e da rLTB/FimA (indicadas pelas setas). 1- *E. coli* BL21 (DE3) Ril não induzida; 2- *E. coli* BL21 (DE3) Ril transformada com pAE/*fimA* não induzida; 3- *E. coli* BL21 (DE3) Ril transformada com pAE/*fimA* induzida; 4- *E. coli* BL21 (DE3) Ril transformada com pAE/*ltb-fimA* não induzida; 5- *E. coli* BL21 (DE3) Ril transformada com pAE/*ltb-fimA* induzida; 6- Marcador de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).

5.4 Purificação e quantificação das proteínas rFimA e rLTB-FimA

As lavagens dos *pellets* de células com PBS-Triton X-100 contribuíram para a purificação das proteínas recombinantes (rFimA e a rLTB/FimA), uma vez que foram capazes de eliminar boa parte das proteínas de *E. coli*. Durante o processo de lavagem, as proteínas recombinantes mantiveram-se no pellet, o que demonstra que as mesmas foram expressas na forma insolúvel (corpos de inclusão). Após a solubilização em tampão ÄKTA wash 6 mM de uréia, as proteínas foram purificadas através de cromatografia de afinidade e eluídas em frações de 1 mL, as quais foram analisadas por SDS-PAGE 15%. Como pode-se visualizar na Fig. 8, a rFimA foi purificada com eficiência, ou seja, apresentou satisfatório grau de pureza assim como a rLTB/FimA. A quantificação realizada pelo método de BCA revelou uma concentração da rFimA de aproximadamente 0,200 mg/mL e da rLTB/FimA de 0,300 mg/mL.

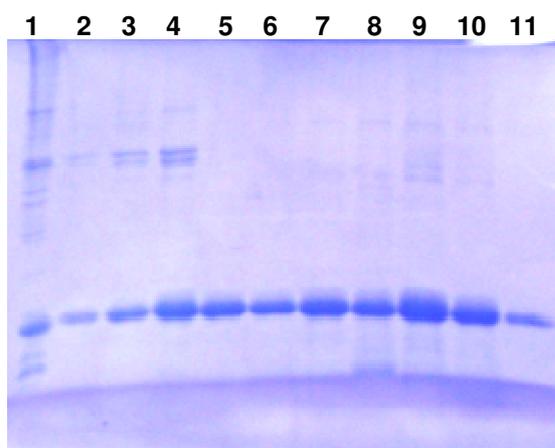


Figura 8. SDS-PAGE 15% da purificação da proteína rFimA expressa em *E. coli*. 1- rFimA expressa em pequena escala; 2 a 11- frações da proteína coletadas durante o processo de purificação.

5.5 Avaliação da conformação da LTB expressa através da sua ligação ao gangliosídeo GM1

As proteínas rLTB e rLTB/FimA produzidas e purificadas foram avaliadas *in vitro* quanto a sua conformação através da avaliação da capacidade de ligação ao gangliosídeo GM1 por ELISA indireto. Conforme pode-se observar na Fig. 9, as proteínas rLTB e rLTB/FimA ligaram-se especificamente ao gangliosídeo GM1. A intensidade da reação entre o anticorpo anti-CT e rLTB foi estatisticamente

semelhante a observada entre o mesmo anticorpo e a toxina colérica comercial, o que demonstra que a conformação da rLTB expressa esta adequada. A ligação da quimera rLTB/FimA ao gangliosídeo GM1 foi de menor intensidade do que a da rLTB ou CT, porém foi significativamente superior a observada pelo controle rFimA ($p < 0,01$). Nas reações utilizando anticorpo policlonal anti-rFimA, apenas a quimera rLTB/FimA apresentou resposta positiva, já que o anticorpo não reconhece CT e rLTB e a rFimA não possui afinidade pelo GM1. Estes resultados sugerem que a fusão entre LTB e FimA não alterou a atividade biológica da LTB, assim como a rLTB produzida manteve a conformação da molécula nativa.

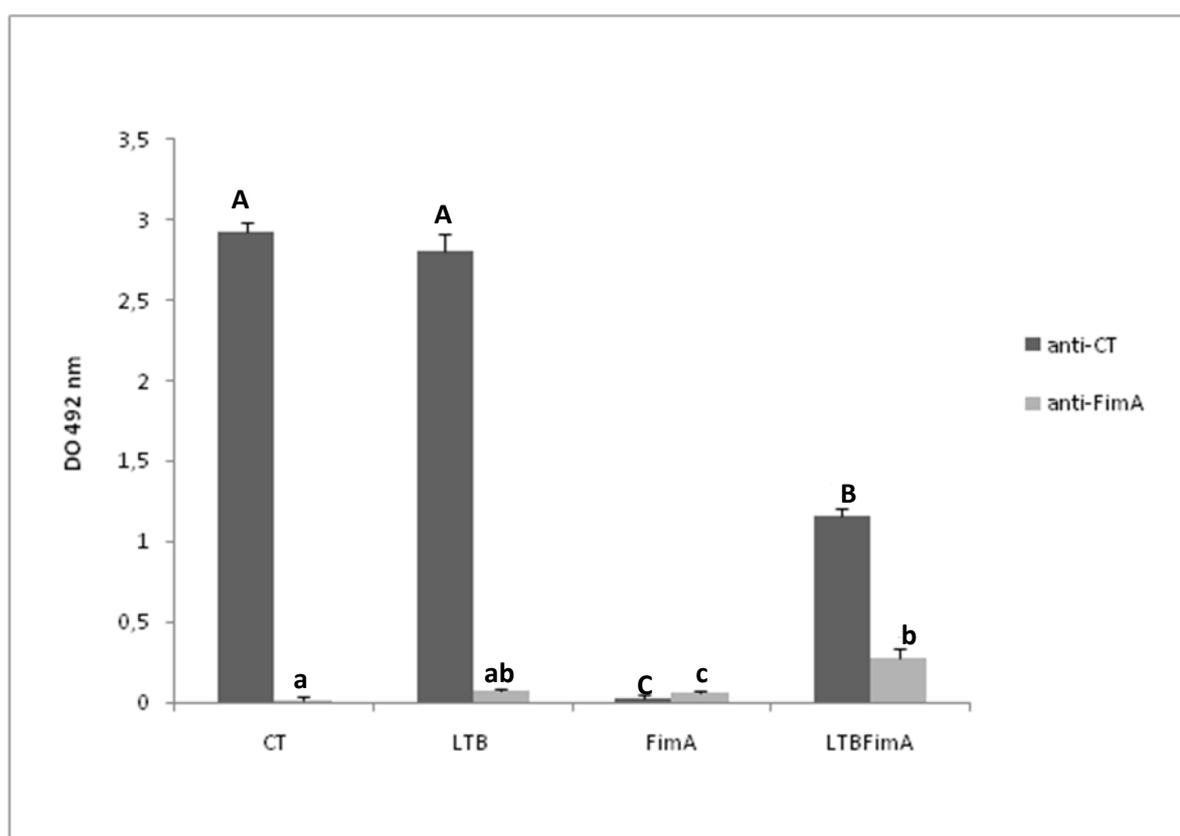


Figura 9. Avaliação da ligação das proteínas produzidas ao gangliosídeo GM1, determinada através de ELISA indireto. Os dados foram obtidos pela média das absorbâncias em triplicatas, utilizando o Teste *t* de Student. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa.

5.6 Produção, purificação e quantificação de anticorpo policlonal anti-rFimA

Após a produção de ascite, o anticorpo policlonal anti-rFimA foi purificado por cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose, dialisado contra

PBS, concentrado em PEG e sua pureza confirmada por SDS-PAGE 12%. Além disso, o mesmo foi quantificado após leitura em espectrofotômetro a 280 nm e apresentou uma concentração de aproximadamente 1,85 µg/mL.

5.7 Resposta imune humoral

5.7.1 DL₅₀ e dose oral mínima de *S. Typhimurium* capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos

A DL₅₀ da *S. Typhimurium* utilizada no presente estudo, determinada para o desafio intraperitoneal dos grupos imunizados via intramuscular, foi de 5×10^1 UFC. E a dose oral mínima necessária para causar lesão sem causar a morte dos camundongos, determinada para o desafio via oral dos grupos imunizados por esta via, foi de 10^2 UFC.

5.7.2 Ensaio de proteção animal

Camundongos BALB/c imunizados via intramuscular foram desafiados via intraperitoneal com aproximadamente 5×10^3 células de *S. Typhimurium* ($100 \times$ DL₅₀), no 10º dia após a última imunização (dia 30). O ensaio de proteção animal não revelou proteção total dos camundongos imunizados. Conforme pode-se observar na tab. 3, 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 3 - 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 DL₅₀ de *S. Typhimurium*.

Grupos*	Vacina	Dias até a morte	N° 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 5×10^9 células de *S. Typhimurium* 10 dias após a última imunização.

5.7.3 Análise histopatológica

Nos órgãos encaminhados para o estudo histológico não foram observadas lesões.

5.7.4 Resposta imune humoral

5.7.4.1 IgG total

A capacidade das proteínas recombinantes estimularem a produção de anticorpos específicos após imunização dos camundongos foi determinada através de ELISA indireto, o qual avaliou a reatividade dos soros com a proteína recombinante FimA. Os grupos dos animais imunizados via oral foram assim identificados: grupo 1: FimA; grupo 2: LTB/FimA; grupo 3: FimA+LTB; grupo 4: LTB e grupo 5: PBS.

A imunização via oral com as proteínas avaliadas foi capaz de induzir resposta imune humoral específica somente nos animais vacinados com a rFimA no dia 39, como mostra a Fig. 10, onde foi observado um aumento significativo da resposta imune específica após a administração da última dose, quando comparado aos demais grupos. Os grupos vacinados com rLTB/FimA e com rFimA+LTB mantiveram os níveis de anticorpos anti-rFimA próximos aos dos grupos controle negativo (rLTB e PBS).

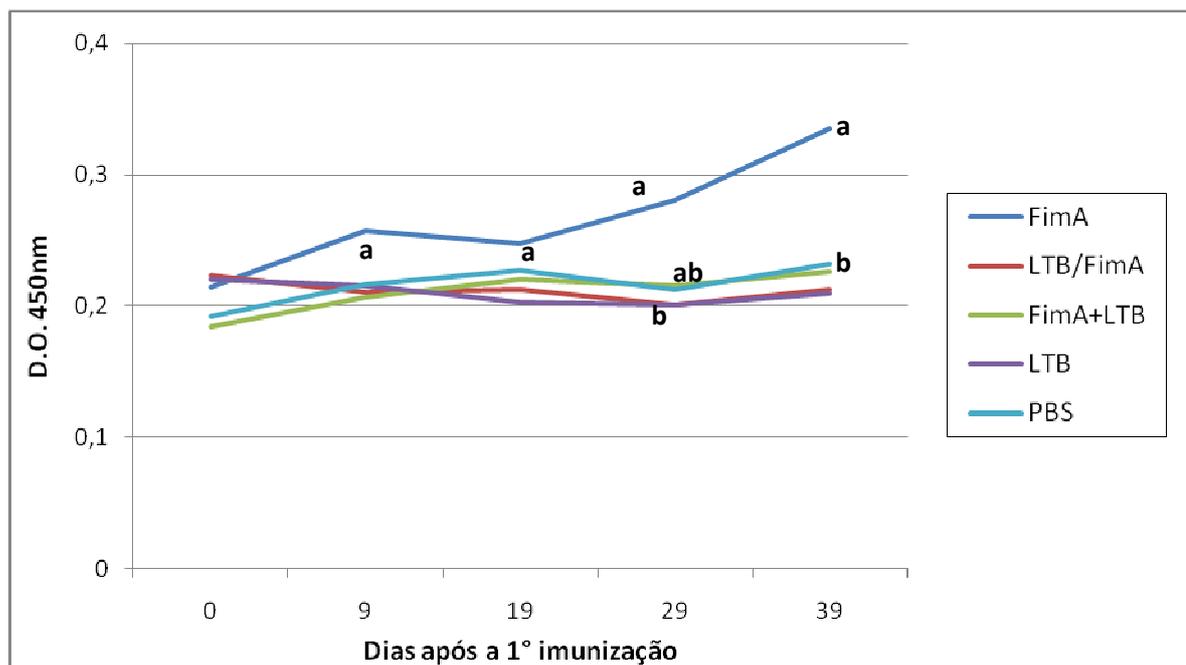


Figura 10. Avaliação da resposta imune humoral anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via oral (diluídos 1:100), coletados nos dias 0, 9, 19, 29 e 39 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto. Os dados estão representados como D.O. média de duplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as médias.

Os grupos dos animais imunizados via intramuscular foram assim identificados: grupo 6: FimA; grupo 7: LTB/FimA; grupo 8: FimA+LTB; grupo 9: FimA+ AI (Adjuvante de Freund Incompleto); grupo 10: LTB e grupo 11: PBS. Como observado na Fig. 11, os soros dos animais de todos os grupos vacinais (rFimA, rFimA +AI, rLTB/FimA e rFimA+rLTB) apresentaram um aumento na produção de anticorpos anti-FimA a partir da primeira imunização. Após a 2ª imunização, o nível de anticorpos anti-rFimA detectados nos soros dos animais do grupo rFimA+AI foi estatisticamente superior ao dos demais grupos. Entretanto, nos dias 29 e 39 após a 1ª imunização, ou seja, após a 3ª imunização (Fig. 11), os soros dos animais vacinados com rFimA co-administrada a rLTB apresentaram nível de anticorpos anti-FimA estatisticamente semelhante aos do grupo vacinado com rFimA acrescido de adjuvante de Freund incompleto e estatisticamente superior ao dos demais grupos. Não houve diferença estatística entre o nível de anticorpos anti-rFimA dos soros dos camundongos imunizados somente com rFimA e com rFimA co-administrada a rLTB e entre o nível de anticorpos dos animais imunizados com rFimA e com a quimera rLTB/FimA no dia 39. Entretanto, os soros dos animais do grupo rFimA

apresentaram maior nível de anticorpos específicos anti-rFimA do que os do grupo imunizado com a quimera.

Em relação aos soros dos grupos controle negativo (rLTB e PBS), estes apresentaram nível de anticorpos anti-rFimA estatisticamente inferior aos dos animais dos grupos vacinados.

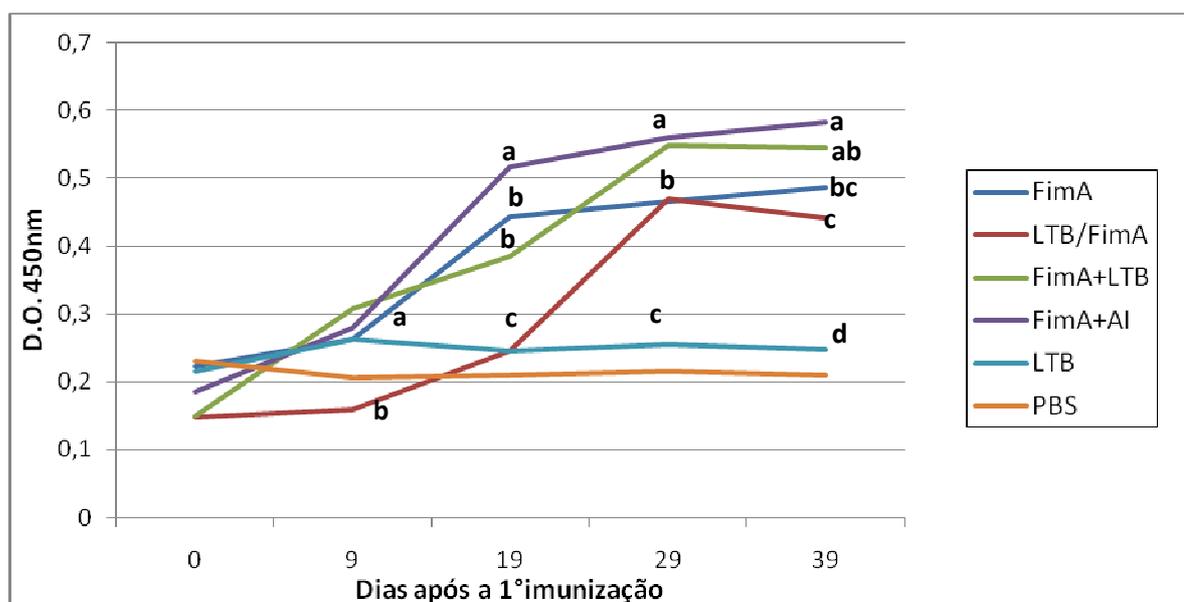


Figura 11. Avaliação da resposta imune humoral anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via intramuscular (diluídos 1:100), coletados nos dias 0, 9, 19, 29 e 39 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto. Os dados estão representados como D.O. média de duplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as médias.

O fato de os soros dos animais imunizados v.o. com rFimA apresentarem maiores níveis de anticorpos que os dos animais imunizados com rFimA fusionada ou co-administrada a LTB (fig. 10) e dos animais imunizados via i.m. com rFimA apresentarem níveis de anticorpos anti-rFimA semelhantes aos dos animais imunizados com rFimA fusionada ou co-administrada a rLTB (Fig. 11), sugere que rFimA pode apresentar uma atividade adjuvante. Para tentar comprovar essa hipótese, a resposta imune humoral anti-rLTB (Fig. 12) das vacinas administradas v.o. e i.m. foi avaliada através de um ELISA indireto, utilizando os soros dos animais vacinados coletados no dia 29 após a 1ª imunização (diluídos 1:100) como anticorpo primário, e a proteína recombinante rLTB como antígeno.

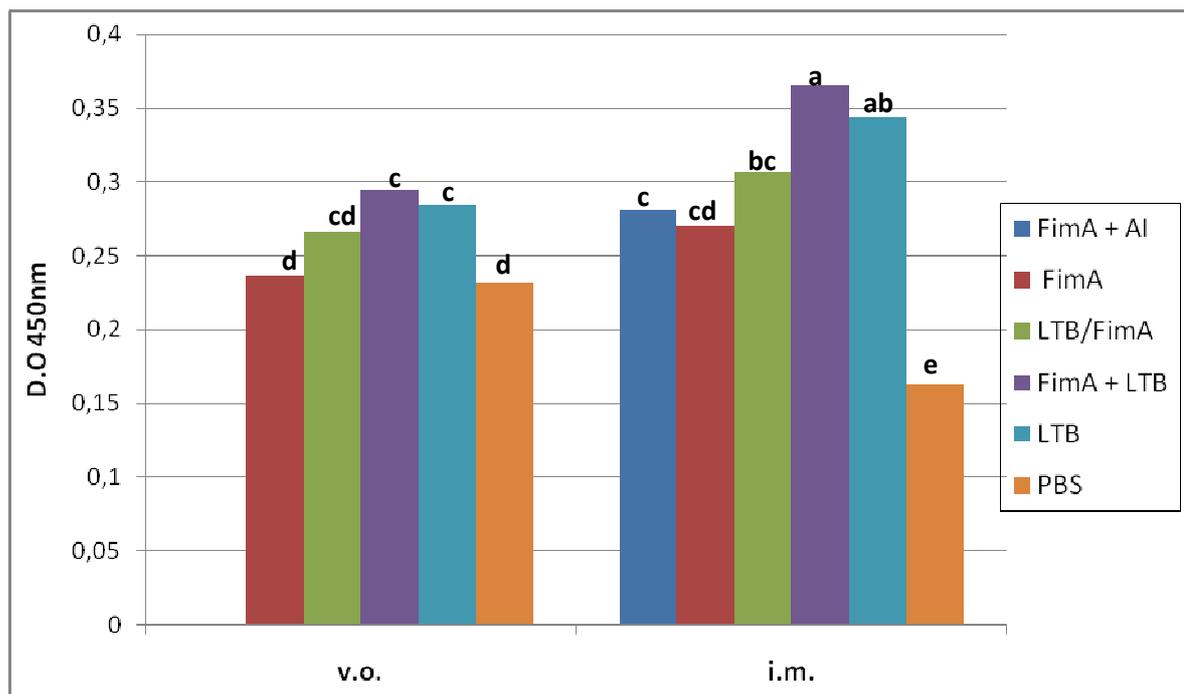


Figura 12. Avaliação da resposta imune humoral anti-rLTB dos soros dos animais imunizados via oral e intramuscular (diluídos 1:100), coletados no dia 29 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto. Os dados estão representados como D.O. média de duplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as médias.

Os resultados 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 (não diferiram significativamente). 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 (não diferiram significativamente). Novamente, as maiores respostas imunes foram obtidas quando os animais foram imunizados via intramuscular.

5.7.4.2 IgG1 e IgG2a

Os soros dos animais coletados nos dias 0 e 29 após a 1ª imunização v.o e i.m foram diluídos 1:100 e o título de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-rFimA específicos foram determinados através de ELISA indireto.

Foi observado aumento significativo dos níveis de anticorpos IgG1 anti-rFimA no 29º dia após a primeira imunização em todos os grupos, exceto no grupo LTB e

PBS imunizados via i.m.. Entretanto, em relação aos níveis de anticorpos IgG1 anti-rFimA obtidos após administração via oral, não houve diferença estatística entre os soros dos grupos imunizados e os controles. Já entre os soros dos animais imunizados via intramuscular (Fig. 13), os maiores níveis de anticorpos IgG1 anti-rFimA foram detectados nos soros dos animais imunizados com rFimA+AI, seguido dos soros dos animais imunizados com rFimA co-administrada a LTB e sem adjuvante (os dois últimos não diferiram significativamente).

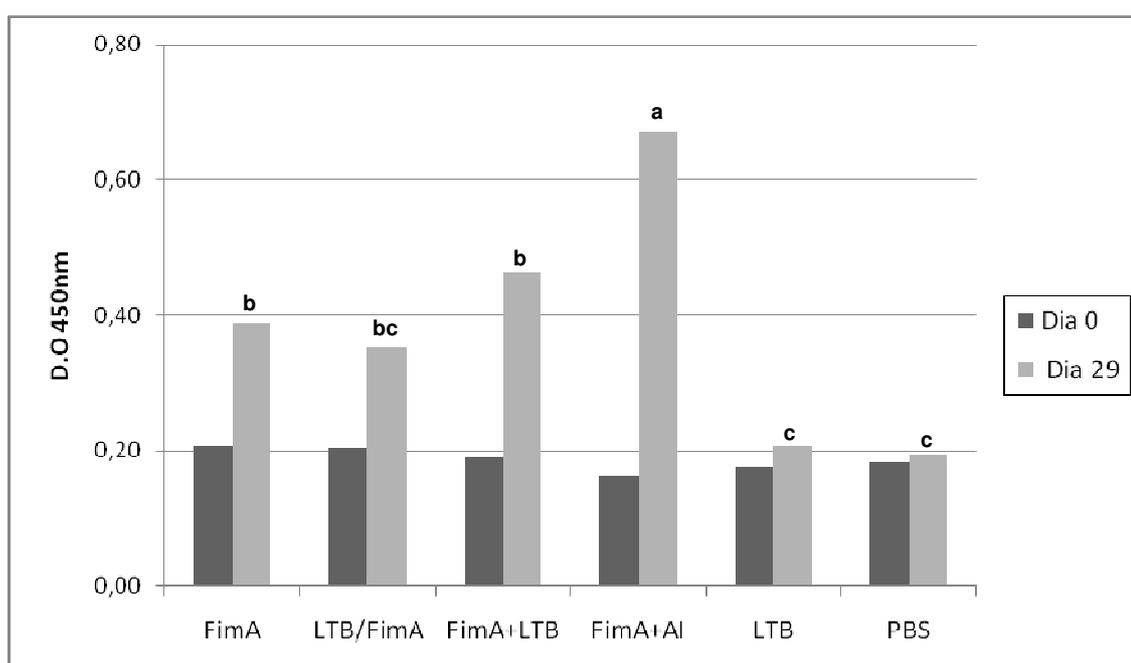


Figura 13. Avaliação dos níveis de anticorpos IgG1 anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via intramuscular (diluídos 1:100), coletados nos dias 0 e 29 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto. Os dados estão representados como D.O. média de duplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre as médias. As D.Os. médias entre as amostras do dia 0 e 29 diferiram estatisticamente, exceto as dos grupos LTB e PBS.

rFimA induziu aumento significativo ($p < 0,05$) da produção de anticorpos IgG2a no 29º após a primeira imunização nos grupos imunizados v.o e i.m. Entretanto, em relação aos níveis de anticorpos IgG2a anti-rFimA obtidos após administração via oral, não houve diferença estatística entre os soros dos grupos imunizados e os controles. Já entre os animais imunizados via i.m., os maiores

níveis de anticorpos IgG2a anti-rFimA foram detectados nos soros dos animais imunizados com rFimA+AI, seguido dos animais imunizados com rFimA co-administrada a rLTB (Fig. 14).

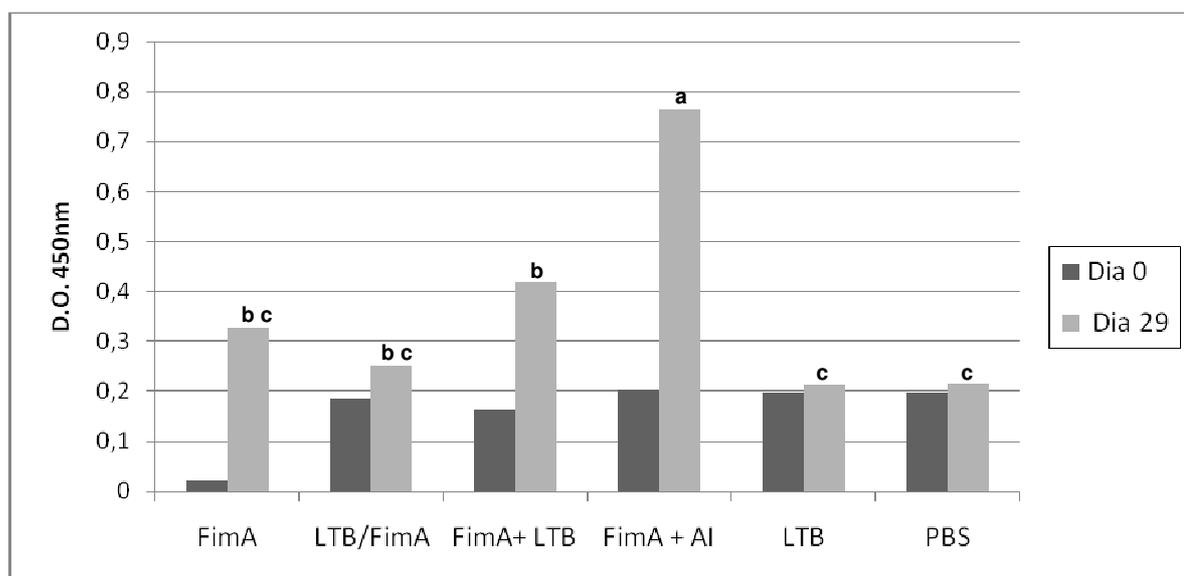


Figura 14. Avaliação dos níveis de anticorpos IgG2a anti-rFimA dos soros dos animais imunizados via intramuscular (diluídos 1:100), coletados nos dias 0 e 29 após a 1ª imunização, através de ELISA indireto. Os dados estão representados como D.O. média de duplicatas. Letras diferentes representam diferenças estatísticas ($p < 0,01$) entre as médias. As D.Os. médias entre as amostras do dia 0 e 29 diferiram estatisticamente, exceto as dos grupos LTB e PBS.

A rFimA sem nenhum adjuvante, co-administrada e fusionada a rLTB (quimera) induziram níveis semelhantes de IgG1 e IgG2a nos grupos imunizados via intramuscular, sugerindo uma resposta mista (Th1/Th2), enquanto que quando associada a adjuvante de Freund incompleto estimulou maiores níveis de IgG2a do que de IgG1, sugerindo uma resposta predominantemente Th1.

5.7.4.3 IgA sérica e secretória

Foi observado aumento significativo dos níveis de anticorpos IgA séricos anti-rFimA no 29º dia após a primeira imunização em todos os grupos. Entretanto, não houve diferença estatística entre os níveis séricos de IgA dos soros dos animais dos grupos controles e os dos animais imunizados via oral e intramuscular.

Em relação aos anticorpos IgA secretórios anti-rFimA, não foi observada produção significativa destes nos raspados da mucosa intestinal e no *pool* de fezes dos animais imunizados via oral em nenhum dos grupos avaliados.

6. DISCUSSÃO

Novas gerações de vacinas, em particular as vacinas de subunidade, baseadas em proteínas recombinantes ou purificados protéicos e peptídeos sintéticos, são menos reatogênicas, porém pouco imunogênicas em comparação com as vacinas que utilizam organismos inteiros que apresentam muitos componentes imunoestimuladores. Assim, as vacinas de subunidade normalmente são administradas com adjuvantes para amplificar e direcionar uma imunidade específica (SINGH, 2002; ULMER, 2006).

A necessidade de melhorar a eficácia das vacinas existentes e/ou o desenvolvimento de novas vacinas tem sido suplementado pela utilização de adjuvantes. A subunidade B da enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB) tem se destacado pela sua capacidade adjuvante sendo capaz de aumentar a reposta imune humoral e celular antígeno-específicas (WELTZIN et al., 2000; WILLIAMS, 2000, ROCHA et al, 2008, FISCHER et al, 2010).

No presente estudo, foi produzida uma quimera recombinante composta pela subunidade fimbrial principal da fímbria tipo 1 de *S. Enteritidis* (FimA) e a subunidade B da enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB) visando a avaliação da ação adjuvante da LTB recombinante (rLTB) fusionada ou co-administrada à rFimA por via oral e intramuscular.

A FimA foi escolhida como antígeno modelo pois um ensaio de proteção animal frente ao desafio com *S. Typhimurium* já foi padronizado em nosso laboratório, utilizando camundongos BALB/c. Além disso, resultados de estudos prévios sugerem que a FimA pode ser um antígeno adequado para induzir proteção contra a infecção por salmonelas. Esses estudos demonstraram que esse antígeno fimbrial é conservado entre a maioria dos sorovares de salmonelas e, embora produzam fímbria tipo 1, alguns, como *Salmonella Gallinarum*, produzem somente fímbria tipo 2. Entretanto, esta é estruturalmente e antigenicamente relacionada à fímbria tipo 1 (DORAN et al., 1994; COHEN; MECHANDA; LIN, 1996).

Como a seqüência do gene *fimA* apresenta uma região inicial altamente hidrofóbica correspondente ao peptídeo sinal, a qual dificultaria o processo de purificação dessa proteína, os *primers* foram desenhados visando a sua amplificação sem a porção inicial.

A proteína recombinante FimA e a quimera recombinante LTB/FimA foram clonadas de forma eficaz nos vetores pAE e pAE contendo previamente o gene *ltb*. A rFimA e a rLTB/FimA apresentaram alto nível de expressão em *E.coli* Ril. Entretanto, corpos de inclusão insolúveis foram formados durante a expressão, sendo necessária a utilização de um agente desnaturante para a sua solubilização no interior da célula (GEORGIU; SEGATORI, 2005).

A fusão da FimA à LTB, bem como a expressão da quimera na forma insolúvel, aparentemente não alteraram a conformação da rLTB expressa, pois a mesma manteve a capacidade de ligação ao gangliosídeo GM1, observada através de ELISA indireto. A adjuvanticidade da LTB está diretamente relacionada à capacidade de ligação ao GM1 (DE HAAN et al., 1998). Porém, quando avaliado os títulos de anticorpos totais dos soros dos animais dos grupos imunizados com a rLTB, sua adjuvanticidade foi confirmada somente nos soros dos animais dos grupos imunizados com a LTB co-administrada e fusionada a rFimA por via intramuscular e foi significativamente maior no grupo co-administrado. Esse resultado vem de encontro ao de outros estudos, nos quais a co-administração da LTB com alguns antígenos foi capaz de aumentar a resposta imune (VERWEIJ et al., 1998; HAAN et al., 2001). Em outro trabalho, a LTB co-administrada com a proteína recombinante Knob apresentou resposta imune ao antígeno quando administrada por via oral e pela via transcutânea, mas nenhuma resposta quando administrada pela via intramuscular. Esse resultado vem de encontro ao de outros estudos, que demonstram que a capacidade adjuvante da LTB é dependente da via de administração (WELTZIN et al., 2000; FINGERUT et al., 2006).

Os baixos títulos de anticorpos gerados pelos grupos imunizados via oral podem estar relacionados a possível instabilidade dos antígenos frente às barreiras físicas e químicas do trato gastrintestinal, como a presença de muco, peristaltismo, pH ácido do estômago, sais biliares, entre outros (JANEWAY et al., 2007). Outro fator poderia ser a dose administrada. Fischer et al. (2010), ao estudar o efeito de diferentes concentrações (2,5, 10, 20, 30 e 40 µg/dose) da LTB recombinante utilizada como adjuvante em camundongos imunizados via intramuscular (i.m) ou subcutânea (sc), associadas a uma vacina inativada contra o herpesvírus suíno tipo 1 (SuHV-1), obteve maiores títulos de anticorpos anti-SuHV-1 via i.m quando administrado aproximadamente 10 µg/dose. Esses resultados demonstram que a

capacidade imunomoduladora e adjuvante da LTB podem variar também conforme a quantidade de antígeno administrado. No presente estudo, foram utilizadas doses de 40 µg de rLTB.

A utilização de antígenos associados a substâncias adjuvantes pode modificar ou aumentar a potência da resposta imune humoral e/ou celular. Elas também podem prolongar a resposta imune ou ainda promover imunidade de mucosa. Para avaliar a modulação do sistema imune frente à utilização de um determinado adjuvante, em geral se determina o nível de anticorpos IgG1 e IgG2a gerados após a imunização. Os anticorpos IgG1, em camundongos, estão associados a uma resposta Th2 enquanto que, anticorpos IgG2a, estão associados a resposta Th1 (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Assim, a razão entre IgG1/IgG2a reflete a relativa contribuição de cada um dos tipos de resposta gerada contra o antígeno, podendo ser ela humoral (predomínio de IgG1) ou celular (predomínio de IgG2a) (MAASSEN et al., 2003, FERREIRA et al., 2008, HABJANEC; HALASSY; TOMASIC, 2008). A análise da resposta de subtipos anti-rFimA em nosso estudo mostrou que a imunização de camundongos via intramuscular com rFimA induziu aumento de IgG1 e IgG2a. A rFimA sem nenhum adjuvante, co-administrada e fusionada a rLTB (quimera) induziram níveis semelhantes de IgG1 e IgG2a, sugerindo uma resposta mista (Th1/Th2). Já a imunização com rFimA associada a adjuvante de Freund incompleto estimulou maiores níveis de IgG2a em relação a IgG1, sugerindo uma resposta predominantemente Th1, como efeito do adjuvante comercial utilizado e da infecção por *S. Typhimurium*.

A IgA secretora é o isotipo de anticorpo associado com o sistema de mucosa e é considerado a primeira linha de defesa nesses locais (RODRIGUEZ et al., 2005). Sua expressão difere entre os dois principais compartimentos nos quais elas são encontradas, no sangue e nas secreções das mucosas. IgA está presente em concentrações significativas no soro de muitas espécies, atuando como segunda linha de defesa contra patógenos que invadem o hospedeiro via mucosa (JANEWAY et al., 2007). A indução de IgA pode induzir proteção específica contra infecções respiratórias, entéricas e genitais (BIET et al., 2003). O pilar da atividade adjuvante da imunidade de mucosa observada pelo uso de LTB é sua capacidade de produzir IgA sérica e de mucosa. A indução de IgA sérica observada no nosso trabalho não condiz com achados da literatura (PITCOVSKI et al., 2006; ROCHA et al., 2008). E

os níveis de IgA secretória encontrados no *pool* das fezes dos grupos vacinados não diferiram entre si, bem como os níveis de IgA encontrados no raspado de mucosa dos grupos vacinados via oral.

Os resultados descritos no presente estudo demonstram que a rLTB somente apresentou atividade adjuvante semelhante a do adjuvante de Freund incompleto quando co-administrada via intramuscular a rFimA e em relação a produção de anticorpos totais. O restante dos resultados obtidos demonstrou uma maior eficiência do adjuvante comercial em relação à ação adjuvante da LTB, embora seu efeito adjuvante sobre a imunidade de mucosa esteja bem documentado (FINGERUT et al., 2006; YAMANAKA et al., 2006). Todavia, a falha da LTB como adjuvante pode ser correlacionada ao tipo de antígeno, a dose e a via de administração. Assim, esses fatores devem ser determinados para outros estudos de vacinas associadas a esse adjuvante.

Com relação ao ensaio de proteção frente ao desafio com *S. Typhimurium*, as imunizações não induziram proteção dos camundongos desafiados, porém o tempo de sobrevivência foi maior entre os animais imunizados somente com a rFimA e rFimA associada a adjuvante de Freund incompleto. A infecção via oral por *S. Typhimurium* utilizando camundongos como modelo animal gera uma resposta sistêmica semelhante a febre tifóide, envolvendo a penetração intestinal das placas de Peyer's e rápida disseminação no fígado, baço e medula óssea (SRINIVASAN; MCSORLEY, 2006). Entretanto, a dose mínima de *S. Typhimurium* capaz de causar lesão sem causar a morte dos camundongos utilizada no presente estudo não causou nenhuma lesão nos órgãos avaliados.

Os resultados obtidos demonstraram também uma eficiência semelhante estatisticamente 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 aos níveis de anticorpos subtipos IgG1 e IgG2a antígeno-específicos, quando administrada via intramuscular e anticorpos totais, quando administrada por ambas as vias e, devido ao fato de ter prolongado o tempo de vida dos animais imunizados somente com a rFimA. Para tentar comprovar essa hipótese, a resposta imune humoral anti-rLTB após a administração das vacinas por ambas as vias foi avaliada através de um ELISA indireto, utilizando os soros dos animais vacinados coletados no dia 29 após a 1ª

imunização como anticorpo primário, e a proteína recombinante rLTB como antígeno. Os animais imunizados por ambas as vias com rFimA co-administrada a LTB induziram maiores níveis de anticorpos anti-rLTB do que os soros dos animais imunizados somente com a rLTB (não diferiram significativamente). Esses resultados sugerem que a rFimA pode ter induzido a produção de anticorpos anti-rLTB quando co-administrada a rFimA (quimera) e assim, pode apresentar um efeito adjuvante. Entretanto, mais estudos devem ser realizados visando a avaliação do potencial efeito adjuvante da rFimA de *S. Enteritidis*.

7. CONCLUSÕES

- A fusão da rFimA à rLTB não alterou a conformação da rLTB expressa.
- As proteínas rFimA e rLTB/FimA mostraram-se antigênicas e imunogênicas.
- O efeito adjuvante da rLTB foi influenciado pela forma de ligação ao antígeno (fusionado ou co-administrado) e pela via de administração (via oral ou intramuscular).
- A rLTB apresentou atividade adjuvante estatisticamente semelhante a do adjuvante comercial somente quando co-administrada i.m. a rFimA e em relação a produção de anticorpos totais a partir da terceira imunização.
- 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.

8. REFERÊNCIAS

ASLANZADEH, J.; PAULISSEN L. J. Role of the type 1 and type 3 fimbriae adherence and pathogenicity of *Salmonella enteritidis* in mice. **Microbiology Immunology**. v.36, p.351–359, 1992.

BIET, F.; KREMER, L.; WOLOWCZUK, I.; DELACRE, M.; LOCHT, C. Immune response induced by recombinant *Mycobacterium bovis* BCG producing the cholera toxin B subunit. **Infection and Immunity**, v.71, p. 2933-2937, 2003.

BONE, H.; ECKHOLDT, S.; WILLIAMS, N.A. Modulation of B lymphocyte signaling by the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **International Immunology**, v.14, p.647–658, 2002.

BURNETTE, W. N. Recombinant subunit vaccines. **Current Opinion in Biotechnology**, v.2, p 882– 92, 1991.

CHAPTER I- ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Animals and Animal Products**. Disponível em < http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/9cfrv1_03.html > Acesso em: 26 de junho de 2010.

CLEGG, S.; GERLACH, G. F. Enterobacterial fimbriae. **Journal Bacteriology**. v.169, p.934–938, 1987.

COHEN, H.J.; MECHANDA, S.M.; LIN, W. PCR Amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4303-4308, 1996.

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**, v. 24, p.5734-43, 2006.

CZERKINSKY, C.; ANJUERE, F.; MCGHEE, J.H.; GEORGE-CHANDY, A.; HOLMGREN, J.; KIENY, M.P., et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. **Immunology Review**. v.222. p.170-197, 1999.

da SILVA RAMOS ROCHA, A.; CONCEIÇÃO, F. R.; GRASSMANN, A. A.; LAGRANHA, V. L.; DELLAGOSTIN, O. A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Canadian Journal of Microbiology**. v.54, n.8, p.677-86, 2008.

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.

DORAN, J.L.; COLLINSON, S.K.; KAY, C.M.; BANSER, P.A.; BURIAN, J.; MUNRO, C.K.; LEE, S.H.; SOMERS, J.M.; TODD, E.C.D.; KAY, W.W. *fimA* and *tctC* based DNA diagnostics for *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.8, p.291-310, 1994.

ERIKSSON, K.; HOLMGREN, J., Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. **Current Opinion in Immunology**. v.14, p.666-672, 2002.

FERREIRA, D.M.; DARRIEUX, M.; OLIVEIRA, M.L.; LEITE, L.C.; MIYAJI, E.N. Optimized immune response elicited by a DNA vaccine expressing pneumococcal surface protein A is characterized by a balanced immunoglobulin G1 (IgG1)/IgG2a ratio and proinflammatory cytokine production. **Clinical Vaccine Immunology**, v.15, p.499-505, 2008.

FISCHER, G.; CONCEICAO, F.R.; LEITE, F.P.L.; MORAES, C.M.; FERREIRA, L.N.; VILELA CO, et al. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.26, n. 3, p.489-95, 2010.

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.

FU, N.; KHAN, S.; QUINTEN, E.; DE GRAAF, N.; PEMBERTON, A.J.; RIVETT, A.J. Effective CD8(+) T cell priming tumor protection by enterotoxin B subunit-conjugated peptides targeted to dendritic cells. **Vaccine**, v. 27, n.38, p.5252-5258, 2009.

GEORGIU, G.; SEGATORI, L. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. **Current opinion in Biotechnology**, v.16, p.538-545, 2005.

GRASSL G.A.; FINLAY R.B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion Gastroenterology**. v.24, p.22–26, 2008.

GREEN, E.A; BOTTING, C.; WEBB, H.M.; HIRSTT, T.R.; RANDALL, R.E. Construction, purification and immunogenicity of antigen-antibody-LTB complexes. **Vaccine**, v.14, n. 10, p.949-958, 1996.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN- FRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants — a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**. v.11, p. 293–306, 1993.

GUY B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nature Review Microbiology**. v.5, n.7, p.505-17, 2007.

HABJANEC L.; HALASSY, B.; TOMASIC, J. Immunomodulatory activity of novel adjuvant formulations based on Montanide ISA oil-based adjuvants and peptidoglycan monomer. **International Immunopharmacology**, v.8, n. 5, p.717-24, 2008.

HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; HOLTROP, M.; BRANDS, R.; SCHARRENBURG, G. J. M.; PALACHE, A. M.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity. **Vaccine**, v.19, p. 2898–2907, 2001.

JANEWAY, Charles A. Jr et al. **Imunologia**: o sistema imune na saúde e na doença. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

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

JOUGLARD, S. D.; MEDEIROS, M. A.; VAZ, E. K.; BASTOS, R. G.; DA CUNHA, C. W.; ARMOA, G. R. G.; DELLAGOSTIN, O. A. An ultra-Rapid and inexpensive plasmid preparation method for screening recombinant colonies. **Abstracts American Society for Microbiology**, v.71, p.234, 2002.

KIM, T. G.; KIM, M. Y.; KIM, B. G., et al. Synthesis and assembly of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). **Protein Expression & Purification**, v. 51, p. 22-27, 2007.

KOZLOWSKI, P. A.; CU-UVIN, S.; NEUTRA, M. R.; FLANIGAN, T. P. Mucosal vaccination strategies for women. **Journal Infectious Diseases**. v.179, n.3, p.493-8, 1999.

LINAM W.M.; GERBER M.A. Changing epidemiology and prevention of Salmonella infections. **Pediatric Infectious Disease Journal**. v. 26, p.747–748, 2007.

LINDBLAD E.B. Aluminium adjuvants – in retrospect and prospect. **Vaccine**; v. 22, p.3658-68, 2004.

MAASSEN, C.B.; BOERSMA, W.J.; VAN HOLTEN-NEELEN, C.; CLAASSEN, E.; LAMAN, J.D. Growth phase of orally administered *Lactobacillus* strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. **Vaccine**, v. 21, p. 2751-2757, 2003.

MCGHEE, J.R.; MESTECKY, J.; DERTZBAUGH, M.T.; ELDRIDGE, J.H.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. **Vaccine**. v.10 (2).p.75-88, 1992)

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECURÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/>> Acesso em 09 de julho de 2010.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Th1 e Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Reviews Immunology**, v.7, p.145, 1989.

NASHAR, T. O.; BETTERIDGE, Z. E.; MITCHELL, R. N. Evidence for a role of ganglioside GM1 in antigen presentation: binding enhances presentation of

Escherichia coli enterotoxin B subunit (EtxB) to CD4(+) T cells. **International Immunology**, v.13, p.541–551, 2001.

NATIONAL NETWORK FOR IMMUNIZATION INFORMATION (NNII). Disponível em: <<http://www.immunizationinfo.org/es>> Acesso em: 11 de julho de 2010.

OGRA, P. L.; FADEN, H.; WELLIVER, R. C. Vaccination strategies for mucosal immune responses. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, p.430-445, 2001.

O'HAGAN, D.T.; VALIANTE, N.M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nature Review Drug Discovery**. v.2, n.9, p.727-35, 2003.

PASHINE, A.; VALIANTE, N.M.; ULMER, J.B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature Medicine**. v.11, n.4, p.S63-8, 2005.

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**, v.21, p.1445–1454, 2003.

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.

RAMOS, C. R.; ABREU, P. A.; NASCIMENTO, A. L.; HO, P. L. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 37, n.8, 2004.

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. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 27, p. 116-124, 2004.

RICHARDS, C. M.; AMON, A. T.; HIRST, T. R.; HILL, T. J.; WILLIAMS, N. A. Protective immunity to ocular herpes simplex virus type-1 infection in mice using *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Journal of Virology**, v.75, p.1664–71, 2001.

ROCHA, A.S.R.; CONCEIÇÃO, F.R.; GRASSMANN, A.A.; LAGRANHA, V.L.; DELLAGOSTIN, O.A. B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvant of humoral immune response in recombinant BCG vaccination. **Canadian Journal of Microbiology**, v.54, n. 8, p.677-686, 2008.

RODRIGUEZ, A.; TJÄRNLUND, A.; IVANJI, J.; SINGH, M.; GARCIA, I.; WILLIAMS, A.; MARSH, P.D.; TROYE-BLOMBERG, M.; FERNÁNDEZ, C. Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with *Mycobacterium bovis* BCG. **Vaccine**, v.23, p. 2565-2572, 2005.

RYAN, E. J.; DALY, L. M.; MILLS, K. H. Immunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. **Trends and Biotechnology**. v.19,n.8, p. 293-304, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning – A laboratory Manual. **Cold Spring Harbor**, Ed., 2001.

SHALABY, W.S. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. **Clinical Immunology Immunopathology**. v.74, n.2, p. 127-34., 1995.

SHATTOCK, R.J.; HAYNES, B.F.; PULENDRAN, B.; FLORES, J.; ESPARZA, J. Improving defences at the portal of HIV entry: mucosal and innate immunity. **PLoS Medicine**. v.8, p.81, 2008.

SIMMONS, C. P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B. M.; WILLIAMS, N.A.; et al. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scand Journal Immunology**.v. 53, p.28–226, 2001a.

SIMMONS, C. P.; HUSSELL, T.; SPARER, T.; WALZL, G.; OPENSHAW, P.; DOUGAN, G. Mucosal delivery of a respiratory syncytial virus CTL peptide with enterotoxin-based adjuvants elicits protective, immunopathogenic, and immunoregulatory antiviral CD8+ T cell responses. **Journal Immunology**. v.166, n.2, p.1106-13, 2001.

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.

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

SRINIVASAN, A.; MCSORLEY, S. J. Activation of Salmonella-specific immune responses in the intestinal mucosa. **Arch Immunology Ther Exp (Warsz)**. v.54, p.25-31, 2006.

STAATS, H.F.; JACKSON, R.J.; MARINARO, M.; TAKAHASHI, I.; KIYONO H.; MCGHEE J.R. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Current opinion in immunology**, v.6, p.572–583, 1994.

SIXMA, T.K.; KALK, K.H.; van ZANTEN, B.A.; DAUTER, Z.; KINGMA, J.; WITHOLT, B.; et al. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **J Molecular Biology**. v.230, n.3, p. 890-918, 1993.

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.

VERWEIJ, W. R.; DE HAAN, L.; HOLTROP, M.; AGSTERIBBE, E.; BRANDS, R.; VAN SCHARRENBURG, G. J. M.; WILSCHUT, J. Mucosal immunoadjuvant activity of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and its B subunit: induction of systemic IgG and secretory IgA responses in mice by intranasal immunization with influenza virus surface antigen. **Vaccine**, v.16, n. 20, p.2069-2076, 1998.

WELTZIN, R.; GUY, B.; THOMAS, 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. **Infection and Immunity**, v.68, p.2775-2782, 2000.

WILLIAMS, N.A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxin B-subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. **International Journal Medical Microbiology**, v.290, p.447–453, 2000.

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.

YAMANAKA, H.; ISHIBASHI, D.; YAMAGUCHI, N.; YOSHIKAWA, D.; NAKAMURAB, R.; OKIMURA, N.; ARAKAWA, T.; TSUJI, T.; KATAMINE, S; SAKAGUCHI, S. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Vaccine**, v. 24, p. 2815-2823, 2006.