Camila Mathias dos Santos

**Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli*
enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2014

Camila Mathias dos Santos

**Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli*
enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Camila Mathias dos.

Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória / Camila Mathias dos Santos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Desenvolvimento de novos adjuvantes derivados de proteínas bacterianas.

Versão do título para o inglês: Type II heat-labile toxins (LTs) from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): adjuvant effect and inflammatory activity.

1. Adjuvantes imunológicos 2. Toxinas (efeitos adversos) 3. Vacinas 4. *Escherichia coli* enterotoxigênica 5. Enterotoxinas 6. Pele I. Ferreira, Prof. Dr. Luis Carlos de Souza II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0113/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Camila Mathias dos Santos.

Título da Tese: Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória.

Orientador(a): Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **053** nas fls. **87** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Luís Carlos de Souza Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória** do qual participou(aram) o(s) **Camila Mathias dos Santos, Jaime Henrique Amorin dos Santos e a pesquisadora Juliana Falcão Rodrigues**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **21.05.2010**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 24 de maio de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 022.13

São Paulo, 11 de abril de 2013.

REF.: Protocolo nº 053/10.

*"Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC):
efeito adjuvante e atividade inflamatória"*

Prezado Professor,

Informo que a sua licença para uso de animais em
experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até**
21.05.2016.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de
novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB
deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo.Sr.

Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos meus pais,

José Francisco e Maria Amália

À minha irmã,

Carolina

AGRADECIMENTOS

À minha família (José Francisco, Maria Amália e Carolina) pelo apoio, incentivo e compreensão durante esses onze anos de formação acadêmica. Por “segurar a barra” em todos os momentos em que não pude estar presente e me ajudar a enfrentar as dificuldades, principalmente quando elas existiam apenas na minha imaginação. Obrigada!

Ao professor Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira pela orientação, exemplo, incentivo e paciência. Agradeço por ter me dado o privilégio de frequentar seu laboratório por oito anos - um ambiente repleto de pessoas dispostas a dedicar seu bem mais precioso, o tempo - à pesquisa científica. Agradeço ainda por todo o conhecimento, profissional e também pessoal, que adquiri ao longo desses anos. Obrigada!

À professora Dra. Rita de Cássia Café Ferreira sempre disposta a conversar sobre os mais diversos temas, pela alegria e zelo com o laboratório e seus componentes.

À Dra. Maria Elisabete Sbrogio-Almeida pela orientação no manejo de animais de laboratório, fundamental para a execução deste trabalho, e por todo o carinho com todos do grupo, obrigada por ser para todos os integrantes do LDV a “mãe Bete”.

À Dra. Juliana Falcão Rodrigues, que já ocupou muitos espaços na minha vida, já foi orientadora, carrasca (risos), colega, parceira de quarto, companheira de viagens e tornou-se ao longo dos anos, sem sombra de dúvidas, uma irmã que a vida me permitiu escolher. Obrigada ainda por todas as discussões, sempre muito produtivas, relacionadas aos mais diversos temas científicos ou não. Esse trabalho não seria o que é sem sua ajuda! Obrigada!

Ao Dr. Juliano Domiraci Paccez que mesmo de outro continente se fez presente ao longo da jornada do meu doutorado, muitas vezes servindo de muro das lamentações (risos). Obrigada pela amizade sincera, por ser sempre solícito aos meus pedidos (que não foram poucos) e pelas conversas que me ajudaram a não largar tudo e ir vender minha arte na Av. Paulista!

Ao Dr. Wilson Barros Luiz (hoje Professor Wilsonnnn!) pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório e pela amizade sincera. Seus comentários e opiniões foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada!

Ao Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante por todo o carinho e amizade. Por todas as noites de cervejas no Duetos e em tantos outros estabelecimentos, embaladas por ótimas conversas sobre os mais diversos temas. Agradeço por estar ao meu lado sempre que precisei, e por continuar presente apesar da distância. Obrigada por toda a paciência (aliás, de onde vem TANTA PACIÊNCIA?). Que nossos caminhos nunca se desencontrem meu amigo! Obrigada!

À Renata Damásio de Souza pela amizade ao longo de toda essa jornada, por ser uma ótima companheira de apartamento e pelo exemplo e incentivo aos ventos da mudança, espero de coração continuar sua “colega de trabalho” em outra instituição, em breve!

À Milene Tavares Batista por ser um importante ponto de apoio, sempre. Pela conversa leve e divertida, pelo suporte e incentivo e por estar sempre ao meu lado. É ótimo saber que temos com quem contar, esteja o mundo desabando ou não (he he he). Obrigada!

À “velha-guarda” do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas que inclui também Melissa, Bruna, Francisco Cariri e Mariana Diniz. Obrigada por colorirem meus dias por oito anos. A amizade de vocês é sem dúvida um dos itens mais preciosos acondicionados na “bagagem” que levo ao deixar a Universidade de São Paulo.

Às queridas Denicar e Mariana Cintra, nova geração do “grupo LT”, por toda a ajuda (e que ajuda!) e paciência. Quero que saibam que apesar do meu jeito duro tenho grande admiração por vocês. Foi ótimo observar o crescimento científico de ambas ao longo do período desse trabalho, sei que vocês vão longe! Obrigada!

À Raíza por ser um ombro MUITO amigo, pela tolerância e carinho mesmo quando eu não merecia. Foi ótimo desfrutar da sua companhia no laboratório e fora dele. Não suma e obrigada!

Aos demais integrantes e ex-integrantes do LDV com os quais convivi. Aprendi muito durante o período em que estivemos juntos. Obrigada pela oportunidade de aprender e ensinar que todos vocês me proporcionaram.

Aos grandes amigos Filipe, Fernanda, Mariana, Flávia, Natália, Christiane, André, Laura e Gustavo por me proporcionarem ao longo desses anos um ambiente social saudável e que teve importância ímpar para a execução deste trabalho.

A todos os funcionários e ex-funcionários da USP com os quais tive o prazer de conviver até aqui, em especial aos técnicos de laboratório Camila Calderon, Eduardo Gimenes e Joelcimar, as secretárias de departamento Aninha e Naíde e de pós-graduação Alice e Gisele e a bibliotecária Mônica. Sem vocês esse trabalho não existiria.

To Terry, Pat, John, Natalie, Chris, Lorrie and Jessie by all the support and friendship during my stay at Buffalo.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho e não citados até aqui, meus sinceros agradecimentos!

Às agências de financiamento CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE) do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“A viagem não acaba nunca. Só os viajantes acabam. E mesmo estes podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa. Quando o visitante sentou na areia da praia e disse: ‘Não há mais o que ver’, saiba que não era assim. O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na primavera o que se vira no verão, ver de dia o que se viu de noite, com o sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomençar a viagem. Sempre.”

José Saramago

RESUMO

MATHIAS-SANTOS, C. **Toxinas termo-lábeis (LTs) do tipo II de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC): efeito adjuvante e atividade inflamatória.** 2014. 139 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A atividade adjuvante de toxinas termo-lábeis (LTs) expressas por linhagens de ETEC têm sido intensamente estudada em condições experimentais de imunização empregando várias vias de administração, sobretudo, vias de mucosa. Essas moléculas são classificadas em dois grandes grupos, LTs do tipo I (LT-I) e II (LT-II), sorologicamente distinguíveis, com base em características genéticas, bioquímicas e imunológicas. A principal diferença desses dois grupos de toxinas consiste na baixa identidade de aminoácidos em suas subunidades B, que acarreta na especificidade da ligação a receptores de superfície nas células-alvo e pode afetar as respostas imunológicas induzidas. Pesquisas sobre os efeitos adjuvantes de LTs têm, até hoje, priorizado a toxina LT-I e mutantes gerados a partir dela. O principal objetivo desta tese foi estudar, pela primeira vez, os efeitos adjuvantes das três variantes conhecidas de LT-II (LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc) empregando a pele como via de administração (vias intradérmica e transcutânea). Inicialmente as proteínas recombinantes foram purificadas a partir de uma linhagem laboratorial de *Escherichia coli* (*E. coli*) e avaliadas quanto à funcionalidade in vitro. Em etapa posterior, os efeitos adjuvantes e as reações inflamatórias após administração intradérmica foram avaliados em ensaios de imunização empregando ovalbumina como antígeno modelo em camundongos. Para a avaliação das atividades adjuvantes das LT-IIs pela via transcutânea foram testadas as toxinas LT-IIa e LT-IIb associadas ao domínio III da glicoproteína E do envelope viral (proteína EIII) do vírus dengue do tipo 2 (DENV2) como antígeno modelo. Os resultados obtidos demonstram que o potencial adjuvante das LT-IIs varia de acordo com a via de administração empregada. Além disto, a reatogenicidade induzida pelas LT-IIs é menor do que aquela observada com a toxina LT-I após administração pela via intradérmica. Os resultados obtidos abrem perspectivas para o emprego das toxinas LT-II como adjuvantes administrados pela pele.

Palavras-chave: Adjuvantes imunológicos. Toxinas bacterianas. Vacinas. Toxinas termo-lábeis. *Escherichia coli* enterotoxigênica.

ABSTRACT

MATHIAS-SANTOS, C. **Type II heat-labile toxins (LTs) from enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): adjuvant effect and inflammatory activity.** 2014. 139 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The adjuvant activity of heat-labile toxins (LTs) expressed by ETEC strains have been intensively studied under experimental conditions using various immunization routes, particularly mucosal routes. These molecules are classified in two major groups, named type I LTs (LT-I) and type II LTs (LT-II), serologically distinguished, by genetic, biochemical and immunological features. The main difference between these two LT groups rely on the B subunit low aminoacid identity which results in different binding specificities to target cell surface receptors that may affect the induction of immune responses. So far, most of the studies dealing with the LT adjuvant effects had focused on LT-I and mutants generated from it. The main objective of the present thesis study was the evaluation of adjuvant properties of the type II LTs (LT-IIa, LT-IIb and LT-IIc) using the skin as an administration route. Initially, the recombinant proteins were purified from a laboratory strain of *E. coli* and evaluated for in vitro functionality. At a later stage, the adjuvant effects and inflammatory activities were evaluated after intradermal immunization using ovalbumin as a model antigen in mice. For the evaluation of the transcutaneous adjuvant activity of the LT-IIs, LT-IIa and LT-IIb were employed in combination with the domain III of the type 2 dengue virus (DENV2) envelope glycoprotein (EIII protein) as a model antigen. Our results show that the adjuvant potential of LT-IIs may vary according to the administration route employed. In addition, the reactogenicities induced by these molecules after intradermal administration are lower than that observed with LT-I. The results open perspectives for the use of LT-II as skin-delivered vaccine adjuvants.

Keywords: Immunological adjuvants. Bacterial toxins. Vaccines. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Heat-labile toxins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de ação propostos para os adjuvantes vacinais	26
Figura 2. Estrutura das toxinas termo-lábeis (LTs) de ETEC	28
Figura 3. Imunização intradérmica e transcutânea	33
Figura 4. Imunização transcutânea empregando adesivos vacinais	50
Figura 5. Protocolo de imunização pela via transcutânea	51
Figura 6. Caracterização por migração eletroforética (SDS-PAGE 17%) das toxinas termo-lábeis após o processo de purificação	55
Figura 7. Purificação da proteína recombinante EIII	55
Figura 8. Avaliação da atividade biológica das LTs purificadas - Ensaio de citotoxicidade em células eucariotas murinas Y-1	57
Figura 9. Resposta humoral sistêmica OVA-específica desencadeada pela administração intradérmica de LT-IIb ou LT-IIc como adjuvante	59
Figura 10. Número de linfócitos T CD8 ⁺ OVA-específicos presentes no sangue periférico de animais imunizados pela via intradérmica com os adjuvantes LT-IIb e LT-IIc.....	61
Figura 11. Número de linfócitos T CD8 ⁺ antígeno-específicos produtores de IFN-gama presentes no sangue periférico de animais imunizados pela via intradérmica com os adjuvantes LT-IIb e LT-IIc.....	62
Figura 12. Monitoramento do número de linfócitos T CD8 ⁺ OVA-específicos secretores de IFN-gama presentes no sangue periférico de animais imunizados pela via intradérmica com os adjuvantes LT-IIb e LT-IIc ao longo do protocolo de imunização	64
Figura 13. Expressão de CD107a em esplenócitos de animais imunizados pela via intradérmica com LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes	66
Figura 14. Citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8 ⁺ antígeno-específicos desencadeada pela administração de LT-IIb ou LT-IIc como adjuvante por via intradérmica.....	67
Figura 15. Aspecto macroscópico do sítio de inoculação 24 h após a injeção intradérmica de diferentes toxinas termo-lábeis (vista lateral e superior).....	69
Figura 16. Cinética de edemaciamento após a inoculação intradérmica de diferentes toxinas termo-lábeis	70

Figura 17. Análise dos níveis de mediadores inflamatórios presentes no líquido intercelular das regiões edemaciadas	72
Figura 18. Aspecto microscópico do sítio de inoculação 48h após a injeção intradérmica de diferentes toxinas termo-lábeis	73
Figura 19. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com solução fisiológica (NaCl 0,9%).....	74
Figura 20. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com 0,5 µg da toxina LT-I.....	76
Figura 21. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com 0,5 µg da toxina LT-IIb	77
Figura 22. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com 0,5 µg da toxina LT-IIc.....	78
Figura 23. Tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório presente no sítio de inoculação após a injeção intradérmica das toxinas LT-IIb, LT-IIc e LT-I	79
Figura 24. Marcação para a enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele de animais imunizados com diferentes toxinas termo-lábeis por via intradérmica	82
Figura 25. Níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) em macerados de pele de animais inoculados intradermicamente com diferentes toxinas termo-lábeis.....	83
Figura 26. Determinação da quantidade de LT a ser administrada como adjuvante em ensaios de imunização transcutânea empregando adesivos vacinais	86
Figura 27. Resposta humoral sistêmica EIII-específica desencadeada pela administração transcutânea de LT-IIa ou LT-IIb como adjuvantes	88
Figure 28. Ensaio de soroneutralização in vivo.....	90
Figura 29. Curva de sobrevivência de camundongos imunizados por via transcutânea e desafiados com a cepa JHA1 de DENV2	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Adjuvantes vacinais licenciados para uso em seres humanos	24
Tabela 2. Parâmetros dermatohistopatológicos estabelecidos para avaliação de biópsias de pele de animais tratados por via intradérmica com diferentes LTs.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADP – *Adenosine diphosphate* (adenosina difosfato)
- AIDS – *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
- AMPc – *3',5'-cyclic adenosine monophosphate* (3',5'-monofosfato cíclico de adenosina)
- ANOVA – Análise de variância
- APC(s) – *Antigen presenting cell(s)* (célula(s) apresentadora(s) de antígeno)
- BSA – Bovine serum albumin (albumina de soro bovino)
- CD – *Cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)
- CDD – Célula dendrítica dermal
- CFSE – *Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*
- CL – Célula de Langerhans
- CT – *Cholera toxin* (toxina colérica)
- DENV2 – Vírus da dengue do sorotipo 2
- dsRNA – *Double-stranded ribonucleic acid* (ácido ribonucleico dupla fita)
- EDTA – *Ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etileno diamino tetra acético)
- EIII – Domínio III da glicoproteína de envelope viral do vírus da dengue
- ELISA – *Enzyme-linked immunoabsorbent assay* (ensaio imunoenzimático)
- ETEC – *Enterotoxigenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* enterotoxigênica)
- GD1a – *Disialoganglioside 1a* (Disialogangliosídeo 1a)
- GD1b – *Disialoganglioside 1b* (Disialogangliosídeo 1b)
- GM1 – *Monosialotetrahexosylganglioside 1* (monosialotetrahexosilgangliosídeo 1)
- GM2 – *Monosialotetrahexosylganglioside 2* monosialotetrahexosilgangliosídeo 2)
- GSK – GlaxoSmithKline
- G α – α -subunit of stimulatory G protein (subunidade alfa da proteína G estimulatória)
- GTP – *Guanosine triphosphate* (guanosina trifosfato)
- H&E – Hematoxilina e eosina
- HPV – *Human papillomavirus* (vírus do papiloma humano)
- HTAB – Brometo de hexa-1,6-bisdeciltrimetilamonio
- IFN- γ – Interferon gama
- IgG – Imunoglobulina G

IL – Interleucina

IPTG – *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside* (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo)

LPS – Lipopolissacarídeo

LTG33D – Mutante de LT-I com substituição pontual do aminoácido glicina pelo aminoácido aspartato

LT-I – *Type I heat-labile toxin* (toxina termo-lábil do tipo I)

LT-II(s) – *Type II heat-labile toxins* (toxina(s) termo-lábil(eis) do tipo II)

LT-IIb T13I – Mutante de LT-IIb com substituição pontual do aminoácido treonina pelo aminoácido isoleucina na posição 13 da subunidade B

LTK63 – Mutante de LT-I com substituição pontual do aminoácido serina pelo aminoácido lisina na posição 63 da subunidade A

LTR192G – Mutante de LT-I com substituição pontual do aminoácido glicina pelo aminoácido arginina na posição 192 da subunidade A

LTR72 – Mutante de LT-I com substituição pontual do aminoácido alanina pelo aminoácido arginina na posição 72 da subunidade A

MCP-1 – Monocyte chemotactic protein 1 (proteína quimioatrativa para monócitos 1)

MHC – *Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

MPL – *Monophosphoryl lipid A* (Monofosforil lipídeo A)

MPO – Enzima mieloperoxidase

Nalp3 – *NOD-like receptor 3 containing PYD-domains* (receptor do tipo NOD número 3 contendo domínios pirina)

OVA – Ovalbumina

P&D – Pesquisa e Desenvolvimento

PAMPs – *Pathogen-associated molecular patterns* (Padrões moleculares associados à patógenos)

PBS - *Phosphatase buffered saline* (tampão salina fosfato)

PMSF – *Phenylmethanesulfonyl fluoride*

R873 – Imiquimod (agonista do receptor do tipo-Toll 7)

RBC – *Red blood cells*

RRPs – Receptores de reconhecimento de padrões

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (separação eletroforética em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio)

SFB – soro fetal bovino

Th – *T helper* (T auxiliar)

TLR – *Toll-like receptor* (Receptor do tipo Toll)

TMB – *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine* (tetrametilbenzidina)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

Abs_{480nm} – Absorbância lida a 4800 nm

°C – graus Celsius

cm – centímetro(s)

g – força centrífuga relativa (RCF)

KDa – kilodalton(s)

L – litro(s)

m – mili (10^{-3})

M – molar

n – nano (10^{-9})

μ – micro(10^{-6})

pH – potencial hidrogeniônico

psi – pound force per square inch (libra força por polegada quadrada)

rpm – rotações por minuto

% – percentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 VACINAS E ADJUVANTES VACINAIS	23
1.2 TOXINAS TERMO-LÁBEIS (LT) DE <i>Escherichia coli</i> ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC): CLASSIFICAÇÃO E EMPREGO COMO ADJUVANTES VACINAIS EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS	27
1.3 IMUNIZAÇÕES INTRADÉRMICA E TRANSCUTÂNEA: VIAS “NÃO USUAIS” DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS	31
2 OBJETIVOS	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 OBTENÇÃO DOS ADJUVANTES E ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO	36
3.1.1 Obtenção dos adjuvantes	36
3.1.1.1 <i>Toxina termo-lábil do tipo I (LT-I)</i>	36
3.1.1.2 <i>Toxinas termo-lábeis do tipo II (LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc)</i>	36
3.1.2 Obtenção dos antígenos	38
3.1.2.1 <i>Ovalbumina</i>	38
3.1.2.2 <i>Domínio III da glicoproteína de envelope E (EIII) do vírus dengue sorotipo 2 (DENV2)</i>	38
3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO DAS PROTEÍNAS EMPREGADAS COMO ADJUVANTES NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO	39
3.2.1 Ensaio de citotonicidade em cultura de células tumorais Y-1 da glândula adrenal de camundongos	39
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ADJUVANTE E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DAS LT-II _s ADMINISTRADAS POR VIA INTRADÉRMICA	40
3.3.1 Imunização pela via intradérmica	40
3.3.2 Monitoramento da resposta imunológica humoral induzida após a administração intradérmica de LT-IIb e LT-IIc	41
3.3.3 Monitoramento da resposta imunológica celular induzida após a administração intradérmica de LT-IIb e LT-IIc	42
3.3.3.1 <i>Avaliação da frequência de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos nos animais imunizados</i>	42

3.3.3.2 Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ OVA-específicos produtores de IFN- γ (linfócitos T CD8 ⁺ “ativados”) no sangue periférico de animais imunizados	42
3.3.3.3 Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 ⁺ OVA-específicos produtores de IFN- γ expressando a molécula de superfície CD107a (linfócitos T CD8 ⁺ “efetores”) no baço de animais imunizados	43
3.3.3.4 Ensaio de citotoxicidade in vivo	44
3.3.4 Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração intradérmica das toxinas LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes	45
3.3.4.1 Avaliação macroscópica e cinética de edemaciamento do sítio de inoculação	45
3.3.4.2 Avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios [IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ IL-12 (IL12p70) e MCP-1] presentes no sítio de inoculação	45
3.3.4.3 Avaliação microscópica do sítio de inoculação	46
3.3.4.4 Marcação histoquímica para a enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele	47
3.3.4.5 Dosagem dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele	48
3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ADJUVANTE DAS TOXINAS LT-IIa E LT-IIb ADMINISTRADAS POR VIA INTRADÉRMICA	49
3.4.1 Imunização pela via transcutânea	49
3.4.1.1 Ensaio piloto para determinação da quantidade de LT a ser empregada como adjuvante	50
3.4.1.2 Avaliação da atividade adjuvante de LT-IIa e LT-IIb em ensaios de imunização transcutânea empregando como antígeno o domínio III da proteína de envelope E (EIII) do vírus dengue tipo 2 (DENV2)	50
3.4.2 Monitoramento da resposta imunológica humoral induzida após a administração transcutânea das LTs	51
3.4.3 Ensaio de neutralização viral in vivo	52
3.4.4 Desafio dos animais vacinados por meio de infecção com o sorotipo 2 do vírus dengue (DENV-2)	53
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	53
4 RESULTADOS	54
4.1 OBTENÇÃO DOS ADJUVANTES E ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO	54
4.1.1 Obtenção dos adjuvantes	54
4.1.2 Obtenção dos antígenos	55

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO DAS PROTEÍNAS EMPREGADAS COMO ADJUVANTES NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO	56
4.3 EFEITO ADJUVANTE E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DAS TOXINAS LT-IIb E LT-IIc EMPREGADAS EM ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO INTRADÉRMICA.....	58
4.3.1 Resposta imunológica humoral OVA-específica em animais imunizados pela via intradérmica com as toxinas LT-IIb e LT-IIc	58
4.3.2 Resposta imunológica celular OVA-específica em animais imunizados pela via intradérmica com as toxinas LT-IIb e LT-IIc	60
4.3.3 Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração intradérmica das toxinas LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes	68
4.4 EFEITO ADJUVANTE DAS TOXINAS LT-IIa E LT-IIb EMPREGADAS EM ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO TRANSCUTÂNEA	85
4.4.1 Determinação da concentração ótima de LT para uso no ensaio de imunização transcutânea empregando adesivos vacinais.....	85
4.4.2 Atividade adjuvante de LT-IIa e LT-IIb em ensaios de imunização transcutânea empregando como antígeno o domínio III da proteína de envelope E (EIII) do vírus dengue tipo 2 (DENV2)	87
5 DISCUSSÃO.....	93
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE A – Artigo publicado	112
APÊNDICE B – Manuscrito submetido à publicação	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 VACINAS E ADJUVANTES VACINAIS

Os primeiros registros de tentativas de imunização datam do século X, na China, pela inalação ou contato de arranhões na pele com crostas de feridas de varíola. Esses procedimentos, conhecidos como “variolização”, espalharam-se pelos continentes asiático e africano, chegando à Europa no século XVII (GROSS; SEPKOWITZ, 1998). Apesar de popular a variolização encontrava opositores já que 2-3% dos indivíduos submetidos aos procedimentos desenvolviam formas graves da doença ou morriam, o que levou a suspensão da prática em muitos locais no século XIX (FENNER et al., 1988). A partir de 1796 com as observações e intervenções do médico inglês Edward Jenner - que consistiam no contato de indivíduos saudáveis com o vírus da varíola bovina como prevenção à varíola humana - estudos para prevenção de moléstias infecciosas através da vacinação conduzidos por importantes microbiologistas, como os pesquisadores Louis Pasteur e Robert Koch, ganharam força (GROSS; SEPKOWITZ, 1998).

À exceção da disponibilidade de água potável, nenhuma outra medida de controle de microrganismos, nem mesmo o uso de antibióticos, teve maior impacto na redução da mortalidade por doenças infecciosas quanto as vacinas (PLOTKIN; ORENSTEIN; OFFIT, 2008). Atualmente, segundo a Organização Mundial de Saúde, existem vacinas para mais de vinte e seis doenças infecciosas dentre as quais incluem-se: varíola, difteria, tétano, febre amarela, coqueluche, poliomielite, sarampo, caxumba, rubéola, hepatite A, hepatite B e influenza. Apesar desses e de outros avanços já ocorridos no campo da vacinologia, ainda há muito por fazer. Moléstias infecciosas graves como malária, tuberculose e AIDS persistem matando e investimentos contínuos são essenciais para garantir os progressos necessários em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) dessa nova geração de vacinas (MAURICE et al., 2009).

As primeiras vacinas desenvolvidas (vacinas de primeira geração) consistiam em suspensões do agente etiológico de determinada patologia (vírus ou bactérias) atenuados ou inativados (DINIZ; FERREIRA, 2010). Essas formulações apresentam em geral alta imunogenicidade que deve-se à presença de diversos “Padrões Moleculares Associados a Patógenos” (PAMPs) na superfície e no interior do patógeno, capazes de estimular o sistema imunológico inato do hospedeiro (MIYAJI et al., 2011). Dentre as moléculas caracterizadas como PAMPs podemos citar: porções da parede bacteriana (peptidoglicano), o lipopolissacarídeo

(LPS) presente na membrana externa de bactérias gram-negativas, a proteína que compõe o flagelo bacteriano (flagelina) e o RNA dupla fita (dsRNA) que carrega a informação genética de alguns vírus. Com o avanço das técnicas de engenharia genética, o desenvolvimento de vacinas caminhou para o emprego nas formulações vacinais de porções isoladas do patógeno e relevantes para o desencadeamento de respostas imunológicas protetoras, chamadas nesse contexto de vacinas de subunidades ou de segunda geração (DINIZ; FERREIRA, 2010). Embora mais seguras que as vacinas compostas por organismos atenuados (que carregam consigo o risco de reversão da patogenicidade), as vacinas de subunidades são em geral pouco imunogênicas, pois apresentam poucos ou nenhum PAMP em sua composição, o que torna necessária a adição de adjuvantes vacinais à essas formulações (BAZIN, 2003).

A palavra adjuvante deriva do termo em latim “adjuvare” que significa ajudar. No contexto de vacinas os adjuvantes são compostos que aumentam ou modulam a resposta imunológica gerada contra um antígeno qualquer (REED; ORR; FOX, 2013). Essas moléculas apresentam natureza química diversa e dentre as classes de adjuvantes vacinais descritas até o momento encontram-se: sais inorgânicos (como por exemplo sulfato e hidróxido de alumínio), emulsões oleosas (óleo em água e água em óleo) e material genético (grupos CpG), além de moléculas oriundas de microrganismos como por exemplo o LPS e a proteína flagelina citados anteriormente e algumas toxinas bacterianas. Cabe ressaltar que a maioria dos adjuvantes vacinais descritos é empregada em pesquisas pré-clínicas, sendo restrito o número de compostos com potencial adjuvante licenciados para uso em humanos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Adjuvantes vacinais licenciados para uso em seres humanos

Adjuvante	Companhia	Classe	Indicação
Alum	Várias	Sal mineral	Várias
MF59	Novartis	Emulsão óleo em água	Influenza (Fluad®)/ Influenza pandêmica
AS03	GSK	Emulsão óleo em água + α -tocoferol	Influenza pandêmica (Pandemrix®)
AS04	GSK	Monofosforil lipídeo A (MPL) + alum	Vírus da Hepatite B – HBV (Fendrix®) Vírus do Papiloma Humano – HPV (Cervarix™)
Lipossomos/ Virossomos	Crucell	Emulsão óleo em água	Vírus da Hepatite A – HBA (Epaxal®) Influenza (Inflexal® e Invivac®)

Fonte: Modificado de Awate, Babiuk e Mutwiri (2013); Mbow et al. (2010).

Os benefícios da associação de adjuvantes às vacinas são muitos, dentre os quais podemos citar: i – redução da carga de antígeno administrado com consequente diminuição do custo de produção das formulações; ii - indução de resposta imunológica do tipo celular, importante para o controle de infecções ocasionadas pelos agentes etiológicos da AIDS, tuberculose e malária; iii – possibilidade de geração de vacinas com enfoque terapêutico; iv – redução no número de doses necessárias para alcance da proteção profilática e v – estimulação do sistema imunológico de idosos (quebra da senescência imunológica) (REED; ORR; FOX, 2013). Os adjuvantes atualmente licenciados para uso em seres humanos atuam majoritariamente induzindo a produção de anticorpos contra os antígenos co-administrados, sendo pouco efetivos na geração de resposta imunológica celular do tipo efetora (linfócitos T CD8⁺ citotóxicos).

Todas as vacinas comercialmente disponíveis para seres humanos se enquadram em uma das seguintes situações: i) não apresentam adjuvantes em sua composição; ii) apresentam como adjuvante vacinal o alum ou alume (sais de alumínio), empregado desde 1926 para estimulação de respostas imunológicas do tipo humoral e para o qual não há consenso sobre o mecanismo de ação ou iii) apresentam adjuvante específico para indução da resposta protetora desejada, em geral, uma combinação de diferentes classes de adjuvantes - sendo esta última situação relativamente recente com o primeiro representante licenciado para uso em humanos na Europa em 1997 (MF59: emulsão óleo em água como componente de uma vacina para influenza – Flud®) (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008). No Brasil, por exemplo, o atual calendário de vacinação só apresenta vacinas que não contem adjuvantes ou que empregam como adjuvante vacinal o alum (MINISTÉRIO DA SAÚDE; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2001). Diante do exposto fica evidente a importância da descoberta de novos adjuvantes e da pesquisa de novas propriedades adjuvantes de compostos com atividade imunoestimulatória comprovada.

São conhecidos diversos mecanismos de ação para os adjuvantes vacinais e um composto pode exercer sua atividade adjuvante atuando de maneira independente sobre mais de uma cascata de sinalização celular. Para uma grande gama de adjuvantes oriundos de microrganismos o mecanismo de ação decorre do reconhecimento de PAMPs presentes no adjuvante por Receptores de Reconhecimento de Padrões – RRP (como por exemplo, os receptores do tipo Toll presentes na superfície de células eucariotas), o que leva à ativação de cascatas de sinalização cujo resultado final é a secreção de citocinas inflamatórias como, por exemplo, IL-6.

O microambiente gerado pelas citocinas secretadas pode influenciar também a ativação das células apresentadoras de antígeno presentes no meio (REED; ORR; FOX, 2013). Embora a ativação do sistema imunológico descrita acima seja comumente apontada como mecanismo de ação de adjuvantes vacinais é importante salientar que diversos tipos de adjuvantes, derivados ou não de microrganismos, não interagem com esses receptores preservando sua adjuvanticidade mesmo na ausência de componentes importantes das cascatas de sinalização desencadeadas pela ativação de receptores Toll. Um exemplo é o hidróxido de alumínio, que atua como adjuvante em animais deficientes na molécula adaptadora MyD-88 (GAVIN et al., 2006). A **Figura 1** apresenta os mecanismos de ação propostos para alguns adjuvantes vacinais.

Figura 1. Mecanismos de ação propostos para os adjuvantes vacinais. Muitos adjuvantes podem atuar como ligantes de Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRPs) ativando a resposta imunológica inata. A sinalização por meio de receptores ou a montagem do complexo inflamassoma pode também ativar fatores de transcrição induzindo a produção de citocinas e quimiocinas que ajudam diretamente uma resposta imunológica em particular, como por exemplo as respostas mediadas por linfócitos Th1 ou Th2, além de influenciar as células imunológicas que são recrutadas para o sítio de inoculação. Alguns adjuvantes influenciam também a captação e apresentação de antígenos. (TLR: Receptor do tipo Toll; APC: Célula apresentadora de antígeno; TCL: Linfócito T citotóxico; NK: Célula matadora natural; NKT: Linfócito T invariante matador natural; MHC: Complexo principal de histocompatibilidade). Fonte: Modificado de Reed, Orr e Fox (2013).

Embora o número de adjuvantes vacinas atualmente licenciado para uso em humanos seja pequeno, a pesquisa pré-clínica e clínica de moléculas com potencial adjuvante é intensa e inclui diversas classes de compostos. Muitas pesquisas dedicam-se também a avaliar o tipo de resposta imunológica induzida por um determinado adjuvante vacinal, de acordo com a via de administração empregada ou com o tipo de antígeno co-administrado. Dentre os compostos explorados como adjuvantes em estudos pré-clínicos aqueles oriundos de microrganismos ocupam posição de destaque. São exemplos desses adjuvantes: o LPS, os ácidos lipoteicóicos, a flagelina e exotoxinas como, por exemplo, a toxina colérica (CT) de *Vibrio cholerae* e a toxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).

1.2 TOXINAS TERMO-LÁBEIS (LT) DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC): CLASSIFICAÇÃO E EMPREGO COMO ADJUVANTES VACINAIS EM ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS E CLÍNICOS

As enterotoxinas CT e LT figuram entre os principais fatores de virulência de natureza protéica expressos por linhagens de *Vibrio cholerae* e ETEC. Essas moléculas são exotoxinas heterohexaméricas do tipo AB₅ compostas por uma subunidade A enzimaticamente ativa associada de maneira não-covalente a um pentâmero de subunidades B organizadas na forma de um anel e responsável pela ligação à receptores presentes na superfície das células-alvo (**Figura 2**) (MERRITT; HOL, 1995). O mecanismo de ação descrito para ambas as toxinas como mediadoras da diarreia inclui a ligação à superfície da célula alvo, mediada pela subunidade B pentamérica, seguida da internalização da proteína que sofre um transporte retrógrado a partir do complexo de Golgi até o retículo endoplasmático, onde a subunidade A1 dissocia-se do restante da molécula podendo então alcançar o citoplasma e exercer seus efeitos tóxicos (PIZZA et al., 2001). Dentro do citoplasma celular a subunidade A1 atua como uma ADP-ribosilase, transferindo um grupo ADP-ribose a um resíduo de arginina presente na subunidade α da proteína G estimulatória (G_{sa}), que perde com isto sua função de GTPase e torna a enzima adenilato ciclase permanentemente ativa. A ativação permanente da adenilato ciclase ocasiona o aumento intracelular do segundo mensageiro AMP cíclico (AMPc) responsável pela abertura de diversos canais presentes na membrana, incluindo o receptor transmembrana de fibrose cística, resultando na perda de eletrólitos para o lúmen intestinal, seguida da passagem de água para o mesmo

compartimento por osmose, desencadeando o quadro de diarreia aquosa profusa (RAPPUOLI et al., 1999).

Figura 2. Estrutura das toxinas termo-lábeis (LTs) de ETEC. (A) Estrutura cristalográfica de uma LT. (B) Representação esquemática da organização de suas subunidades. A subunidade A divide-se nos domínios A1 e A2 aqui representados pelas cores azul escuro e azul claro, respectivamente. O domínio A1 globular (enzimaticamente ativo) insere-se por meio do domínio A2 helicoidal no anel pentamérico formado pela associação dos monômeros de subunidade B (representados em laranja). Fonte: Modificado de Mudrak e Kuehn (2010); Salmond, Luross e Williams (2002).

As enterotoxinas termo-lábeis são divididas em dois grandes grupos (LTs dos tipos I e II) que foram inicialmente distinguidos com base no reconhecimento por anti-soros e são atualmente reconhecidos pelas diferenças entre as sequências gênicas dos operons que codificam seus integrantes. As LTs do tipo I compreendem a toxina colérica (CT) expressa por linhagens de *V. cholerae* e a enterotoxina termo-lábil (LT-I) expressa por linhagens de ETEC capazes de infectar humanos e animais. O segundo grupo de LTs (LT-II) teve seus dois primeiros integrantes descritos em meados de 1980 (LT-IIa e LT-IIb) e seu último integrante (LT-IIc) descrito em 2010 (GUTH et al., 1986; HOLMES; TWIDDY; PICKETT, 1986; NAWAR et al., 2010). As ETECs produtoras de toxinas do tipo II infectam animais, como búfalos e avestruzes, por exemplo, sendo também isoladas de alimentos e humanos com ou sem diarreia (JOBLING; HOLMES, 2012). Molecularmente a distinção entre os dois grupos de enterotoxinas baseia-se principalmente nas sequências de aminoácidos dos pentâmeros B. Apesar de estruturalmente relacionadas, LT-I e LT-II apresentam subunidades B com identidade de no máximo 16% enquanto suas subunidades A compartilham 51-52% de identidade de aminoácidos, particularmente envolvendo a região de catálise das proteínas (JOBLING; HOLMES, 2012;

PICKETT; WEINSTEIN; HOLMES, 1987). Dentro dos grupos as semelhanças se intensificam, com CT e LT-I apresentando 80% de homologia nas sequências dos operons que as codificam enquanto as LT-II possuem de 70-79% de aminoácidos idênticos na subunidade A e de 51-53% de aminoácidos idênticos nos monômeros de subunidade B (JOBLING; HOLMES, 2012). Embora o mecanismo de ação das LTs como mediadoras da diarreia seja conhecido e bem caracterizado, não existem até o momento trabalhos que comprovem o papel das LT-II_s como mediadoras do quadro clínico sintomático em humanos.

As diferenças de identidade de aminoácidos nas subunidades B das LTs refletem-se em distintos perfis de ligação à receptores presentes na membrana de células alvo. As LTs do tipo I ligam-se com alta afinidade ao gangliosídeo GM1, podendo associar-se ainda com menor afinidade a outros componentes de membrana contendo galactose como GM2, asialo-GM1, GD2, GD1b e paraglobosídeos (FUKUTA et al., 1988; TENEBERG et al., 1994). Dentre as LTs do tipo II, LT-II_a e LT-II_c têm perfis mais promíscuos de ligação a receptores com a primeira associando-se em ordem decrescente de afinidade a GD1b, GM1, GT1b, GQ1b, GM2, GD1a e GM3 enquanto LT-II_c é capaz de ligar-se a GM3, GD1a, GM1b, GT1b e GD1 α (BERENSON et al., 2013; FUKUTA et al., 1988). LT-II_b apresenta o perfil mais restrito de ligação a receptores dentre as LT-II nativas avaliadas até o momento, associando-se com alta afinidade a GD1a e em menor grau com as moléculas GT1b, GM2, GM3, GM1b e GD1 α (BERENSON et al., 2010). A capacidade de associação a diferentes receptores poderia levar a diferenças de estimulação de células-alvo em contato com cada uma dessas toxinas.

Além de importantes fatores de virulência, as LTs são empregadas como adjuvantes vacinais, com alguns derivados de LT-I (recombinantes, mutantes ou não) sendo testados como antígeno/adjuvante vacinal em estudos clínicos (BEHRENS et al., 2014; GÜEREÑA-BURGUEÑO et al., 2002; MCKENZIE et al., 2007; STEPHENSON et al., 2006). O primeiro relato do potencial adjuvante de LT-I ocorreu em 1988 com a demonstração de quebra da tolerância oral em animais sensibilizados com a proteína ovalbumina na presença dessa toxina por via oral em murinos (CLEMENTS; HARTZOG; LYON, 1988) enquanto a atividade adjuvante de uma LT-II foi descrita dez anos depois com a administração subcutânea de LT-II_a na presença de fimbriina em ratos (CONNELL et al., 1998). Desde então muitos estudos laboratoriais foram realizados a fim de comprovar a atividade adjuvante das LTs, nativas e/ou mutantes e pertencentes aos dois grupos conhecidos (I e II), por diversas vias de administração

(oral, nasal, sublingual, subcutânea, intraretal, transcutânea e intradérmica) e contra diferentes antígenos alvo (BARRETTE et al., 2011; BELYAKOV et al., 2001; BRAGA et al., 2014; GREENE et al., 2013; LOSONSKY; KOTLOFF; WALKER, 2003; NEGRI et al., 2010; TIERNEY et al., 2003). A grande maioria dos estudos avalia o potencial de aplicação de LT-I como adjuvante, fato que pode ser atribuído à maior facilidade de obtenção da toxina, que já foi inclusive comercializada por grandes empresas como a Sigma-Aldrich.

Uma importante característica de LT é sua toxicidade *in vivo* e, por isso, muitos grupos buscaram alternativas, que permitissem o emprego dessa molécula em ensaios clínicos, como a construção de mutantes com atividade tóxica reduzida (LTR72, LTR192G) ou mesmo abolida (LTK63, LTG33D) (DOUCE et al., 1997; GIULIANI et al., 1998; GUIDRY et al., 1997; MCCLUSKIE et al., 2001). Apesar dos esforços realizados, que permitiram os primeiros ensaios clínicos empregando uma LT-I (LTK63) como adjuvante por via nasal no ano de 2009, quadros de paralisia facial em sujeitos de pesquisa submetidos aos protocolos de vacinação frustraram as tentativas de emprego de LT-I como adjuvante em vacinas para seres humanos (LEWIS et al., 2009). Atualmente novos ensaios clínicos tem sido conduzidos na tentativa de garantir a segurança de um novo mutante de LT-I conhecido como dmLT e que alberga duas mutações pontuais na subunidade A (LTR192G/L211A) (EL-KAMARY et al., 2013). Em relação as LT-II_s as avaliações de efeito adjuvante descritas na literatura, empregando as holotoxinas nativas ou mutantes dessas moléculas, ou ainda suas subunidades B isoladamente, utilizam majoritariamente a via nasal como via de inoculação, embora LT-II_a e LT-II_b tenham sido avaliadas também pelas vias subcutânea e/ou intradérmica (CONNELL et al., 1998; GREENE et al., 2013; LEE et al., 2011; MARTIN et al., 2000; MATHIAS-SANTOS et al., 2011; NAWAR et al., 2005, 2011). Apesar de um estudo em modelo murino ter apontado maior segurança no emprego de LT-II_s por via nasal em comparação à LT-I, não foram realizados ainda estudos clínicos para avaliação do potencial adjuvante dessa classe de LTs (VAN GINKEL et al., 2005).

Cabe ressaltar ainda que a despeito do grande número de estudos realizados para a avaliação do potencial das LTs dos tipos I e II como adjuvantes, não há um mecanismos de ação principal descrito para o aumento da resposta imunológica contra antígenos co-administrados na presença dessas moléculas. Entre os efeitos mediados por LTs que podem ter relação com a atividade adjuvante das toxinas incluem-se: i) ligação a células do sistema imunológico adaptativo como, por exemplo, células dendríticas, macrófagos e linfócitos T e B (ARCE et al.,

2005); ii) aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície de células apresentadoras de antígenos (BRAGA et al., 2014); iii) ativação do inflamassoma Nalp3 (LI et al., 2014); iv) produção da citocina IL-17 por células monocíticas de sangue periférico mediada pela secreção de IL-1 β e IL-23 por células do sistema imunológico inato (BRERETON et al., 2011); v) aumento da migração de células dendríticas para os linfonodos (ZOETWEIJ et al., 2006).

1.3 IMUNIZAÇÕES INTRADÉRMICA E TRANSCUTÂNEA: VIAS “NÃO USUAIS” DE ADMINISTRAÇÃO DE VACINAS

A administração de todos os adjuvantes atualmente aprovados para uso em seres humanos e da grande maioria daqueles em avaliação pré-clínica é realizada pela via parenteral. A inoculação parenteral requer o treinamento de pessoal para implementação, gera resíduos biológicos de natureza perfuro-cortante e ocasiona em muitos pacientes uma complicação importante e que reduz a adesão aos protocolos vacinais: a aicmofobia (medo de agulhas de injeção ou outros objetos pontudos) (OLVERA-GOMEZ et al., 2012). A administração de vacinas por vias “não-usuais” tem como principal objetivo a ativação do sistema imunológico de maneira semelhante aquela induzida por infecções naturais e inclui o emprego de vias de mucosa (oral, nasal, sublingual, intravaginal e intrarectal) e da pele (imunização intradérmica, transcutânea e biobalística – vacinas de DNA) como sítios de entrega de antígenos.

As vias de administração de mucosa têm sido exploradas em ensaios laboratoriais com as toxinas CT e LT, sendo essas moléculas consideradas adjuvantes vacinais padrão-ouro para tais vias. Entretanto a administração de LT por via de mucosa induz efeitos tóxicos já relatados na literatura e que incluem a migração de antígenos co-administrados para o sistema nervoso central em murinos e paralisia facial em humanos se inoculada por via nasal, além da diarreia em humanos se administrada por via oral, mesmo em pequena quantidade (EL-KAMARY et al., 2013; LEWIS et al., 2009; VAN GINKEL et al., 2005). Outras barreiras para o emprego das vias de mucosa para administração de vacinas incluem: i) a facilidade de indução de tolerância contra os antígenos administrados na ausência de adjuvantes vacinais; ii) a necessidade de proteção do antígeno contra a degradação mediada por enzimas e pelo suco gástrico do trato gastrointestinal; iii) o risco de outros efeitos colaterais mediados por resposta inflamatória local exacerbada relacionada ao antígeno ou aos adjuvantes empregados, como por exemplo coriza e dor de cabeça

e iv) a invasividade do procedimento (especialmente para as vias intravaginal e retal em seres humanos).

A pele é o maior órgão do corpo humano e tem funções fisiológicas importantes como a prevenção da desidratação e o controle de temperatura corporal, além de ser a primeira linha de defesa contra o meio externo. A última característica citada torna-a um atrativo sítio para administração de vacinas já que esta região é rica em células apresentadoras de antígeno, particularmente as células dendríticas (com destaque para as células de Langerhans (CL) na epiderme e as células dendríticas dermais (CDD) em derme), responsáveis pela iniciação das respostas imunológicas adaptativas (NICOLAS; GUY, 2008) . Uma segunda característica que favorece o uso da pele como via de inoculação de vacinas é a facilidade de observação de efeitos adversos locais (MATHIAS-SANTOS et al., 2011).

Existem duas formas principais de administração de vacinas na pele: as chamadas vias intradérmica e transcutânea. As principais diferenças entre as vias de administração intradérmica e transcutânea residem na maneira como o antígeno é depositado na pele e em qual região desta a formulação é entregue (**Figura 3A**). Na imunização transcutânea o antígeno e o adjuvante são depositados na superfície externa da pele, após tratamento prévio com agentes físicos e/ou químicos que provocam a ruptura do estrato córneo, e alcançam a região da epiderme graças principalmente a características específicas dos adjuvantes empregados. Na imunização intradérmica por sua vez a entrega da formulação vacinal é feita com o auxílio de seringa e agulha (via parenteral) diretamente na região da derme. Sabe-se que diferentes populações de células dendríticas povoam as regiões da pele e por isso se acredita que a entrega de formulações vacinais em profundidades distintas desse tecido seria capaz de gerar respostas imunológicas com características específicas (**Figura 3B**) (NICOLAS; GUY, 2008).

É importante lembrar que embora a imunização intradérmica seja classificada como uma via parenteral de administração, existem dispositivos para inoculação que permitem a entrega de vacinas por essa via, como por exemplo, adesivos contendo micro ou nanoagulhas, e que reduzem drasticamente o desconforto inerente à administração parenteral tradicional. Já existe inclusive uma vacina para seres humanos comercialmente disponível administrada por via intradérmica (Fluzone ID, Sanofi Pasteur), que faz uso de um dispositivo de inoculação desenvolvido pela empresa BD Bioscience (BD Soluvia™ Prefillable Microinjection System) (ICARDI et al., 2012).

Figura 3. Imunização intradérmica e transcutânea. (A) Representação esquemática da entrega do antígeno e do adjuvante pelas vias intradérmica e transcutânea. Na primeira via citada a formulação é depositada na região de derme com auxílio de seringa e agulha enquanto na imunização transcutânea antígeno e adjuvante são depositados na porção externa da pele e alcançam a epiderme. (B) Ilustração da iniciação da resposta imunológica adaptativa pelas células apresentadoras de antígeno presentes na pele [células de Langerhans (CL) na epiderme e células dendríticas dermais na derme (CDD)]. Após a captação do antígeno as células deixam o sítio sofrendo ativação durante a migração para os tecidos linfóides secundários que drenam a região. Uma vez dentro desses tecidos as células dendríticas ativadas interagem com linfócitos T $CD4^+$ (que por sua vez podem estimular linfócitos B) e T $CD8^+$ iniciando assim a geração da resposta imunológica adaptativa celular e humoral.

A avaliação do potencial adjuvante de LTs pelas vias intradérmica e transcutânea já foi descrito na literatura, em especial para a molécula LT-I. Em ensaios de imunização intradérmica essa toxina induz fortes efeitos inflamatórios, com migração leucocitária e edema no sítio de inoculação que podem persistir por até duas semanas (ENIOUTINA; VISIC ; DAYNES, 2000;

ZOETEWELJ et al., 2006). O primeiro relato do emprego de uma LT-II como adjuvante por via intradérmica ocorreu em 2011 quando ficou demonstrado o menor potencial inflamatório de LT-IIa administrada por essa via, apresentando contudo atividade adjuvante humoral e celular similar à induzida por LT-I (MATHIAS-SANTOS et al., 2011). Em relação a imunização transcutânea, o primeiro relato do efeito adjuvante de toxinas bacterianas administradas por essa via ocorreu em 1998 e foi demonstrado em modelo murino. Após essa publicação seguiram-se diversas outras, empregando CT/LT-I nativas e mutantes como adjuvantes vacinais e moléculas de natureza diversa como antígenos (proteínas de origem bacteriana/viral, peptídeos) (BERRY et al., 2004; DELL; KOESTERS; GISSMANN, 2006; LIARD et al., 2011; SCHARTON-KERSTEN et al., 2000). A aplicação transcutânea de LT-I foi avaliada inclusive em estudos clínicos, com aplicação desta molécula como antígeno em vacinas para controle da diarreia dos viajantes induzida por ETEC (BEHRENS et al., 2014; MCKENZIE et al., 2007). Não existem até o momento entretanto relatos do emprego de LT-IIs como adjuvantes vacinais pela via transcutânea, em animais ou seres humanos.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a eficácia e segurança das toxinas termo-lábeis do tipo II (LT-II), a saber: LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc, quando empregadas como adjuvantes em formulações administradas pelas vias intradérmica e transcutânea em modelo murino.

Dentre as etapas experimentais específicas realizadas para a conclusão deste estudo incluíram-se:

- I. A obtenção das toxinas por meio de superexpressão em *Escherichia coli* seguida de purificação e análise da atividade biológica in vitro;
- II. A avaliação do efeito adjuvante (geração de respostas imunológicas humoral e celular) e atividade inflamatória das moléculas LT-IIb e LT-IIc administradas por via intradérmica em associação com o antígeno modelo ovalbumina (OVA);
- III. A avaliação do potencial adjuvante [indução de resposta imunológica humoral e efeito protetor frente a desafio intracerebral com vírus dengue do tipo 2 (DENV-2)] das toxinas LT-IIa e LT-IIb em formulações vacinais administradas por via transcutânea contendo o domínio III da glicoproteína de envelope E (EIII) do DENV-2 como antígeno.

3 METODOLOGIA

3.1 OBTENÇÃO DOS ADJUVANTES E ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

3.1.1 Obtenção dos adjuvantes

3.1.1.1 Toxina termo-lábil do tipo I (LT-I)

A toxina termo-lábil do tipo I empregada como controle positivo nos ensaios de imunização foi produzida pela linhagem laboratorial de *E. coli* BL21DE03pLys albergando um plasmídeo recombinante contendo o operon *etx* da linhagem referência de ETEC H10407, previamente construído em nosso laboratório (LASARO et al., 2009). Inicialmente procedeu-se o cultivo da linhagem bacteriana em meio TB suplementado com ampicilina por período de 16-18 h a 37 °C em agitador orbital (200 rpm). O sedimento bacteriano obtido foi recolhido por centrifugação (10.000 x g, 30 minutos), ressuspensão em tampão TEAN (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM NaN₃, pH 7,4) e submetido à lise mecânica em homogeneizador de alta pressão durante 10 minutos sob pressão de 6.000 psi (APLAB-10, ArtePeças). Após nova etapa de centrifugação sob as mesmas condições o sobrenadante obtido foi filtrado (diâmetro dos poros: 22 µm) e submetido à cromatografia de afinidade em coluna contendo D-galactose imobilizada (Pierce) acoplada ao equipamento AKTA-FPLC (GE Healthcare). O procedimento de purificação foi baseado na metodologia previamente descrita por Uesaka et al. (1994). A proteína obtida foi dialisada e concentrada em filtros Amicon Ultra-15 (30.000 MWCO), quantificada por espectrofotometria com base em metodologia descrita por Edelhoch (1967) e caracterizada em SDS-PAGE (17%) antes da utilização.

3.1.1.2 Toxinas termo-lábeis do tipo II (LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc)

As toxinas termo-lábeis do tipo II, objetivos de estudo desta tese, foram produzidas em linhagens laboratoriais de *E. coli* DH5αF' albergando plasmídeos recombinantes contendo os operons *etx* das linhagens de referência SA53, Ec41 e OS-1 de ETEC que codificam para as toxinas LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc respectivamente (HAJISHENGALLIS et al., 2004; NAWAR et al., 2010). Os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo professor/pesquisador colaborador Dr.

Terry D. Connel da SUNY - The State University of New York. As toxinas foram purificadas de acordo com a metodologia descrita por Hajishengallis et al. (2004). Brevemente, as linhagens foram inoculadas em meio LB suplementado com ampicilina e canamicina e incubadas a 37 °C em agitador orbital (200 rpm) até o início do crescimento exponencial (Absorbância a 600 nm = 0,5-0,6) quando foi acrescentado à cultura o indutor isopropil-beta-D-tiogalactopiranosideo (IPTG) na concentração final de 0,75 mM. As culturas foram mantidas sob as mesmas condições descritas anteriormente por um período de 6-8 horas e, em seguida, foram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Os sedimentos resultantes foram ressuspensos em tampão Tris (100 mM, pH 8,0, 1,5% do volume inicial de cultura) contendo o inibidor de proteases PMSF (0,25 mM) e o quelante EDTA (5 mM). A lise periplasmática foi realizada pela adição de sacarose (20%), polimixina B (0,5 g/L) e lisozima (2 g/L) ao tampão, seguida de incubação em banho de gelo por 30 minutos com homogeneização vigorosa a cada 5-10 minutos. Ao final do período de incubação a amostra foi submetida à nova etapa de centrifugação (14000 rpm, 45 min) e o conteúdo protéico dos extratos periplasmáticos obtidos foi precipitado pela adição de 60 % de sulfato de amônio (390 g/L) ao sobrenadante, seguida de incubação sob agitação por 18 h a 4 °C. O precipitado resultante foi coletado por centrifugação (14000 rpm, 45 min), dissolvido em PBS (pH 7,4) e dialisado a 4 °C no mesmo tampão (com uma troca do tampão após 4 h de incubação seguida de 18 h de diálise). Os materiais obtidos após os procedimentos de diálise foram empregados para a purificação das toxinas com o uso do equipamento AKTA-FPLC (GE Healthcare). As toxinas foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna niquelada seguida de refino por cromatografia de exclusão molecular em coluna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 (GE Healthcare). Antes da utilização nos ensaios funcionais e imunológicos as proteínas obtidas foram dialisadas em tampão PBS conforme descrito anteriormente, quantificadas por espectrofotometria de acordo com a metodologia descrita por Edelhoch (1967) e caracterizadas em SDS-PAGE (17%).

3.1.2 Obtenção dos antígenos

3.1.2.1 Ovalbumina

A proteína ovalbumina (OVA), oriunda da clara de ovos, empregada como antígeno nos ensaios de imunização intradérmica descritos neste trabalho é comercial e foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich (albumin from chicken egg white, grade V, número de catálogo: A5503).

3.1.2.2 Domínio III da glicoproteína de envelope E (EIII) do vírus dengue sorotipo 2 (DENV2)

Para a expressão da proteína EIII recombinante, que corresponde a uma porção do domínio III da glicoproteína de envelope E do vírus dengue sorotipo 2 (DENV2), foi utilizada a cepa laboratorial de *E. coli* BL21DE03 albergando o plasmídeo pET28a EIII DENV-2 previamente construído em nosso laboratório (AMORIM-SANTOS, 2012). Neste vetor a expressão do gene está sob controle do promotor T7 e a produção da proteína de interesse ocorre após a adição de IPTG.

Os procedimentos para a superexpressão de EIII objetivando sua purificação contaram com o inóculo inicial de uma colônia isolada da cepa bacteriana recombinante em meio LB suplementado com canamicina (50 µg/mL) e incubação do caldo sob agitação (200 rpm) por 18 h. Este pré-inóculo foi utilizado como inóculo com diluição 1:100 em 2 L de meio LB estéril acrescido de canamicina (cada litro de meio foi acondicionado em erlenmeyer com capacidade máxima de 2 L) e mantido a 37 °C sob agitação (200 rpm) até início do crescimento exponencial (Absorbância a 600nm: 0,5-06) quando acrescentou-se à cultura IPTG na concentração final de 0,5 mM. A cultura induzida foi incubada nas condições de temperatura e agitação descritas anteriormente por um período de 6 horas.

O sedimento celular obtido após o período de indução e que continha a proteína EIII na forma insolúvel (em corpúsculos de inclusão) foi dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5 contendo 0,5 M de NaCl (tampão A) e lisado em homogeneizador de alta pressão durante 10 minutos sob pressão de 6.000 psi. O lisado foi centrifugado a 4 °C por trinta minutos a 10000 x g e o sedimento recuperado foi solubilizado em 20 mL de tampão desnaturante (tampão A acrescido de 8 M de uréia) por dezoito horas a temperatura ambiente. Ao final do período de

incubação realizou-se novo procedimento de centrifugação (nas mesmas condições descritas para o lisado) e o sobrenadante obtido foi gotejado com fluxo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$ em dois litros de tampão A sob agitação suave e constante para realização do redobramento proteico (redobramento por diluição rápida). Após nova etapa de centrifugação seguida de filtração em membrana filtrante (diâmetro dos poros: 0,45 μm ; Millipore), para remoção do material insolúvel presente, este material foi aplicado à coluna cromatográfica niquelada.

O processo de purificação da proteína EIII foi conduzido de modo automatizado empregando o equipamento AKTA – FPLC (GE Healthcare Life Sciences) para realização de cromatografia de afinidade em coluna contendo resina niquelada (His Trap 1 mL; GE Healthcare Life Sciences) em função da ligação específica da cauda de histidina presente na proteína de interesse a esse metal. Inicialmente a coluna foi equilibrada com 10 volumes de coluna (vc) de tampão A. Os dois litros do mesmo tampão contendo a proteína EIII solúvel (redobrada) foram aplicados à coluna com fluxo de 3 mL/min que foi em seguida lavada com 20 vc de tampão A. A eluição das proteínas adsorvidas à coluna foi realizada por meio de aumento gradual da concentração de imidazol (de 0 mM a 1000 mM em 6 vc). As frações eluídas (3 mL/cada) foram coletadas e a coluna foi regenerada com 5 vc de tampão A acrescido de 1M imidazol; 5 vc de tampão A e 5 vc de água ultrapura. As amostras correspondentes aos picos obtidos foram caracterizadas em SDS-PAGE 17% e o volume de material correspondente ao pico que apresentava a proteína EIII foi dialisado em sacos de diálise, com porosidade para proteínas de até 3 kDa, com duas trocas de dois litros de tampão utilizado para o redobramento a cada 12 horas para remoção do imidazol. Após a diálise a amostra foi quantificada por espectrofotometria, caracterizada novamente em SDS-PAGE 17% e armazenada a - 80 °C até que nova manipulação fosse necessária.

3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO DAS PROTEÍNAS EMPREGADAS COMO ADJUVANTES NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

3.2.1 Ensaio de citotonicidade em cultura de células tumorais Y-1 da glândula adrenal de camundongos

A avaliação da atividade biológica in vitro das LTs empregadas como adjuvantes nos ensaios de imunização foi realizada por meio do ensaio de citotonicidade em cultura de células

tumorais murinas Y-1 (American Type Culture Collection (ATCC) Number: CCL-79). Para esse ensaio as células Y-1 foram inicialmente cultivadas por quatro dias, a 37 °C sob atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas para cultura de células (75 cm²) contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab) e 1% de uma mistura de antibióticos contendo penicilina (1000 U/mL) e estreptomicina (10 mg/mL). Após esse período de cultivo o meio foi removido e a monocamada celular foi desprendida pelo contato durante um minuto com 1,0 mL de solução de Tripsina/EDTA 250 mg% (1:250) (Cultilab) a 37 °C. A solução de Tripsina/EDTA foi neutralizada com 1,5 mL de SFB, o volume em cada garrafa cultivada foi ajustado para 10 mL com meio DMEM e o material foi centrifugado por 5 minutos a 300 x g. Após a centrifugação o meio foi removido, a suspensão celular foi ajustada para a concentração de 5 x 10⁵ células/mL com meio DMEM suplementado com a mistura de antibióticos citada anteriormente e 1% de SFB e adicionada em volumes de 800 µL/poço em placas de 12 poços que permaneceram a 37 °C sob atmosfera contendo 5 % de CO₂ até que a monocamada atingisse a confluência de 90-100%. O ensaio de citotonicidade foi realizado adicionando-se, em duplicata, 1 µg de cada toxina purificada (LT-I - controle positivo, LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc) a poços distintos das placas. As placas foram incubadas nas condições descritas anteriormente por oito horas e o efeito citotônico foi observado em microscópio EVOS fl (AMG, Bothell, USA) com magnificação de 200x e imagens digitalizadas dos resultados foram capturadas.

3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ADJUVANTE E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DAS LT-IIS ADMINISTRADAS POR VIA INTRADÉRMICA

3.3.1 Imunização pela via intradérmica

Os procedimentos de imunização por via intradérmica foram realizados conforme descrito anteriormente (MATHIAS-SANTOS et al., 2011). Fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 (8-10 semanas) foram anestesiadas pela via intraperitoneal com uma mistura de ketamina (75 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e procedeu-se a tricotomia da porção inferior do dorso (área de aproximadamente 3 cm²) com auxílio de máquina de cortar cabelos seguida de aplicação de creme depilatório comercial (Veet, Reckitt Benckiser). Após enxágue abundante da pele com água destilada para remoção do creme depilatório os animais foram injetados por via

intradérmica com auxílio de seringa para insulina 50 unidades acoplada a agulha com 8 mm de comprimento (5/16") e 0,3 mm de calibre (30G) (BD Ultra-Fine™ II).

Grupos de animais (n=3-5) receberam formulações vacinais (volume final de 20 µl/animal) que incluíam: 1) Salina; 2) 50 µg/animal de proteína ovalbumina (OVA); 3) 50 µg de OVA associada a 1 µg de LT-IIb; 4) 50 µg de OVA associada a 1 µg de LT-IIc ou 5) 50 µg de OVA associada a 1 µg de LT-I (controle positivo). As formulações vacinais empregadas como controle negativo (salina e/ou OVA) variaram de acordo com o objetivo final do experimento de imunização conduzido. A formação de uma pápula esbranquiçada imediatamente após a inoculação foi utilizada como critério para confirmação da administração intradérmica das vacinas. O protocolo vacinal consistiu na aplicação de duas doses de cada formulação, com intervalo de 14 dias entre as doses.

3.3.2 Monitoramento da resposta imunológica humoral induzida após a administração intradérmica de LT-IIb e LT-IIc

A indução de resposta imunológica humoral sistêmica OVA-específica em camundongos imunizados pela via intradérmica foi mensurada pela quantificação dos níveis séricos de imunoglobulina G (IgG) capaz de reconhecer a proteína OVA como antígeno de fase sólida, com concentração final de 10 µg/mL, em ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay). Os soros empregados nestes ensaios foram obtidos após o processamento de amostras de sangue coletadas antes de qualquer tratamento (dia -1) e aproximadamente duas semanas após cada dose do protocolo vacinal (dias 14 e 30). As coletas de sangue foram realizadas por punção do plexo submandibular com auxílio de lancetas e os soros foram recolhidos após a coagulação do sangue a 37 °C por 30 minutos seguida de retração dos coágulos a 4 °C por 30 minutos e centrifugação a 4 °C (3000 x g, 15 minutos). As amostras de soro foram estocadas a -20 °C até as dosagens de IgG por ELISA.

As concentrações de IgG OVA-específica presente no soro dos animais imunizados foram calculadas por interpolação dos valores de absorbância obtidos em curvas de calibração geradas com IgG referência de camundongo comercial (Sigma-Aldrich) em ELISA. As dosagens foram realizadas de acordo com o protocolo rotineiramente aplicado no laboratório do professor colaborador Terry D. Connell e descrito por Nawar et al. (2005).

3.3.3 Monitoramento da resposta imunológica celular induzida após a administração intradérmica de LT-IIb e LT-IIc

3.3.3.1 Avaliação da frequência de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos nos animais imunizados

A frequência de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos em animais imunizados por via intradérmica foi determinada por meio de marcação com dextrâmero de MHC classe I carregando o peptídeo SIINFEKL de OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄) conjugado a fluoresceína (FITC) (Immudex). A marcação foi realizada com células mononucleares de sangue periférico (PBMC, do inglês Peripheral Blood Mononuclear Cells) obtidas de animais imunizados sete dias após a primeira dose (dia 7) e quatro dias após a segunda dose (dia 28) do protocolo vacinal. O sangue obtido por punção do plexo submandibular foi tratado por cinco minutos a temperatura ambiente com 1 X RBC Lysis Buffer (eBioscience) para ruptura das hemácias e então centrifugado a 300 x g por 5 minutos. As células obtidas foram ressuspensas em PBS (pH 7,4) contendo 5% de soro fetal bovino e procedeu-se a marcação com o dextrâmero por 10 minutos, seguida de incubação por 20 minutos com anticorpos anti-CD3ε, anti-CD8α e anti-CD44 de camundongo conjugados a fluoróforos distintos de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences). As células foram examinadas por citometria de fluxo utilizando o aparelho FACSCalibur (BD Biosciences). O mínimo de 50.000 eventos CD8⁺ foram adquiridos e analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células CD3ε⁺ CD8α⁺ duplo positivas para a marcação com o dextrâmero e CD44 sobre o total de linfócitos T CD8⁺ (células CD3ε⁺ e CD8α⁺).

3.3.3.2 Avaliação da frequência de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos produtores de IFN-γ (linfócitos T CD8⁺ “ativados”) no sangue periférico de animais imunizados

A frequência de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos produtores de IFN-γ presentes no sangue periférico em animais imunizados por via intradérmica foi determinada por citometria de fluxo após re-estímulo in vitro das células com o peptídeo MHC-I específico SIINFEKL de OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄). O estímulo in vitro e a marcação foram realizadas em PBMCs obtidos de animais imunizados por punção do plexo submandibular uma e duas semanas após cada dose (dias 7, 14, 21 e 28). Para ruptura das hemácias o sangue obtido foi incubado por 5 min na presença de 5 mL de tampão ACK (6,60 g NH₄Cl; 0,80 g KHCO₃; 0,03 g EDTA, água MQ q.s.p. 1 L, solução esterilizada por filtração) e os leucócitos obtidos foram lavados por duas vezes com meio RPMI

suplementado com 2 % SFB (PBS 2 % SFB). As células foram então ressuspensas em volume final de 250 μ L de meio RPMI suplementado com L-glutamina (2,1 mM) e β -mercaptoetanol (50 μ M), plaqueadas (100 μ L/poço) e incubadas por 6 a 12 horas na presença de 100 μ L de meio RPMI completo acrescido de brefeldina A (1 μ g) e IL-2 (2 ng) e ausência ou presença do peptídeo específico de OVA (300 ng), totalizando 200 μ L final da mistura de células e meio ou estímulo/poço. Após esse período as células foram incubadas por 30 minutos a 4 °C com o anticorpo anti-CD8 α conjugado à FITC em PBS 2 % SFB e fixadas em PBS acrescido de paraformaldeído (4%, m/v) por 10 min a 4 °C. Após etapa de permeabilização com tampão contendo saponina (0,2% de albumina bovina sérica; 0,1% de azida sódica, 0,5% de saponina em PBS, pH 7,4-7,6) as células foram incubadas com o anticorpo anti-IFN γ de camundongo conjugado à ficoeritrina (PE) por 30 min a 4 °C no mesmo tampão. As células foram por fim lavadas 2 x com 200 μ L de PBS 2% SFB, ressuspensas no mesmo tampão e examinadas por citometria de fluxo. O mínimo de 100.000 eventos CD8 $^{+}$ foram adquiridos e analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células duplo positivas para a marcação com CD8 α e IFN- γ sobre o total de linfócitos T CD8 (células CD8 α^{+}).

3.3.3.3 *Avaliação da frequência de linfócitos T CD8 $^{+}$ OVA-específicos produtores de IFN- γ expressando a molécula de superfície CD107a (linfócitos T CD8 $^{+}$ “efetores”) no baço de animais imunizados*

A frequência de linfócitos T CD8 $^{+}$ OVA-específicos produtores de IFN- γ expressando a molécula de superfície CD107a presentes no baço de animais imunizados por via intradérmica foi determinada por citometria de fluxo após re-estímulo in vitro das células com o peptídeo MHC-I específico SIINFEKL de OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Os baços dos animais foram recolhidos sete dias após a segunda dose do protocolo vacinal (dia 21) e processados para a obtenção dos esplenócitos. Inicialmente os baços foram macerados em 5 mL de meio RPMI contendo 1% de SFB e as células obtidas submetidas à centrifugação por 5 min a 300 x g. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento celular foi tratado com 1 mL de ACK por 2 minutos para lise dos eritrócitos e centrifugado a 300 x g por 5 minutos. As células foram então lavadas com 5 mL de RPMI 2% SFB por duas vezes e ressuspensas em 1 mL de RPMI suplementado (ver seção 3.3.3.2). Após contagem do número de esplenócitos obtidos/animal em câmara de Neubauer, 1 x 10 6 células foram plaqueadas em volume final de 100 μ L/poço e incubadas por 6 horas na

presença de 100 μ L/poço de RPMI completo acrescido de brefeldina A (1 μ g), monensina (BD Golgi Stop, de acordo com as instruções do fabricante), IL-2 (2 ng), anti-CD107a de camundongo conjugado à PE e ausência ou presença do peptídeo específico de OVA (300 ng), totalizando um volume final de 200 μ L da mistura de células e meio ou estímulo/poço. As demais etapas do protocolo seguiram essencialmente como descrito na seção anterior. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do programa FlowJo para a determinação das porcentagens de células duplo positivas para a marcação CD8 α e IFN- γ e de células triplo positivas para a marcação CD8 α , IFN- γ e CD107a, ambas sobre o total de linfócitos T CD8 (células CD8 α ⁺).

3.3.3.4 Ensaio de citotoxicidade *in vivo*

O ensaio de citotoxicidade *in vivo* foi realizado para verificar a presença de células T CD8⁺ citotóxicas, específicas para o peptídeo sintético H-2K^b-restrito OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) em animais imunizados pela vias intradérmica, de acordo com a metodologia descrita por Barber, Wherry e Ahmed (2003). Seis dias após a última dose do protocolo de imunização intradérmica um grupo de animais não imunizado foi submetido à eutanásia, seus baços foram retirados e os esplenócitos utilizados para o ensaio. Cerca de 2×10^8 células foram incubadas com 0,5 μ M ou 5 μ M de CFSE em PBS, por 15 minutos a 37 °C. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em meio RPMI acrescido de 1% de soro fetal bovino (RPMI -1%). Ao tubo contendo a população de células marcadas com 5 μ M de CFSE foram adicionados 25 μ M do peptídeo OVA₂₅₇₋₂₆₄, e o tubo foi incubado por 40 minutos a 37 °C. Após esse período as células foram lavadas com meio RPMI-1% para remoção do peptídeo e contadas. Quantidades iguais das duas populações de células marcadas foram misturadas e centrifugadas a 300 x g. O precipitado de células foi ressuspenso em RPMI (sem soro fetal bovino) de modo a conter $2 - 4 \times 10^7$ células/100 μ L e injetado em todos os grupos experimentais por via endovenosa no plexo retro-orbital (100 μ L/animal). No dia seguinte todos os animais foram submetidos à eutanásia e as células dos baços coletadas, tratadas, ressuspensas em PBS 2% SFB e examinadas por citometria de fluxo para detecção de fluorescência emitida pelas duas populações celulares, utilizando o aparelho FACScalibur™ (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Foram contados 10.000 eventos da população marcada com 0,5 μ M de CFSE. Os dados foram analisados pelo programa “FlowJo” para determinação das porcentagens de células marcadas com 0,5 μ M e 5 μ M de CFSE.

3.3.4 Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração intradérmica das toxinas LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes

3.3.4.1 Avaliação macroscópica e cinética de edemaciamento do sítio de inoculação

Para os ensaios de avaliação macroscópica e cinética de edemaciamento no sítio de inoculação grupos de fêmeas de camundongos C57BL/6 foram inoculados pela via intradérmica conforme descrito na seção 3.3.1 com 50 µg de OVA na ausência ou presença de 0,5µg ou 1,0 µg das LTs testadas (LT-IIb, LT-IIc ou LT-I), respectivamente.

No ensaio de avaliação macroscópica do sítio de inoculação a pápula gerada imediatamente após a injeção das formulações foi demarcada com caneta marcador permanente na cor preta a fim de facilitar a identificação da região após 24 horas, momento no qual fotos representativas dos efeitos adversos induzidos pela administração intradérmica das diferentes LTs (edema e/ou eritema) no dorso dos animais tratados foram obtidas com auxílio de máquina digital.

A cinética de edemaciamento do sítio de inoculação foi realizada pela mensuração diária do sítio de inoculação das proteínas, com início imediatamente após a injeção (dia 0) e término no 13º dia, com auxílio de paquímetro digital. O volume de edema (mm³) foi calculado a partir da fórmula: $M_1 \times M_2 \times M_3$, com $M_1 \geq M_2$ - onde M_1 e M_2 representam medidas transversais e longitudinais do diâmetro da região edemaciada. O cálculo empregado baseia-se em método previamente descrito para estimativa do volume de massas tumorais induzidas em camundongos (ATTIA; WEISS, 1966).

3.3.4.2 Avaliação dos níveis de mediadores inflamatórios [IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ IL-12 (IL12p70) e MCP-1] presentes no sítio de inoculação

Para a avaliação dos níveis dos mediadores inflamatórios IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-12 (IL12p70) e MCP-1 presentes no sítio de inoculação após a administração das diferentes LTs, grupos (n=5) de camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram inoculados conforme descrito na seção 3.3.1. Vinte e quatro horas após o tratamento, biópsias de pele com área aproximada de 1,5 cm² foram retiradas dos sítios de inoculação e colocadas com a derme voltada para baixo sobre telas de nylon (BD Cell strainer, 40 µM) acopladas a tubos cônicos de prolipropileno (50

mL). Os tubos foram selados com “Parafilm” e centrifugados a 300 x g por 30 minutos a 4 °C. Os fluidos obtidos, oriundos das regiões de edemaciamento, foram então centrifugados novamente por 10 minutos (para sedimentação de células contaminantes possivelmente presentes) e a fração superior do sobrenadante (~80% do volume obtido) foi recolhida para as análises. Os níveis das citocinas IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-12 (IL-12p70) e da quimiocina MCP-1 presentes nos fluidos oriundos das regiões de edemaciamento foram mensurados empregando o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation (BD Biosciences) e citometria de fluxo de acordo com as instruções do fabricante. A coleta do fluido intersticial da pele por centrifugação foi realizada com base em metodologia descrita anteriormente para coleta de fluido intersticial de tumores mamários de ratos (WIIG; AUKLAND; TENSTAD, 2003).

3.3.4.3 Avaliação microscópica do sítio de inoculação

Para avaliação microscópica do sítio de inoculação animais tratados com 50 μ g de OVA na ausência ou presença de 0,5 μ g das toxinas testadas foram eutanasiados 48 h após a injeção das formulações e biópsias de pele da região inoculada foram obtidas após assepsia com etanol 70%. As biópsias foram fixadas em formalina neutra tamponada 10% por no mínimo 24 h e enviadas ao núcleo de histologia da SUNY - University at Buffalo para confecção de lâminas contendo microcortes de pele com espessura de 7 μ m e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas foram observadas em microscópio invertido (Axiovert 200, Zeiss) e campos representativos foram fotografados em magnificação de 100 x.

As análises histopatológicas, bem como a contagem diferencial de células do sistema imunológico presentes nas lâminas confeccionadas, foram realizadas por um patologista veterinário contratado, em clínica especializada (Canis Felis Diagnóstico Veterinário, São Paulo, Brasil). Os cortes histológicos foram avaliados utilizando-se aumentos totais de 40, 100, 400 e 1000x em microscopia de luz (microscópio Nikon, modelo eclipse E100). Campos representativos dos achados histopatológicos observados foram fotografados com auxílio de microscópio EVOS fl (AMG, Bothell, USA) nas magnificações de 100 x, 200 x e 400 x. Os parâmetros dermatohistopatológicos estabelecidos para avaliação e comparação entre as amostras estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Parâmetros dermatohistopatológicos estabelecidos para avaliação de biópsias de pele de animais tratados por via intradérmica com diferentes LTs.

REGIÃO ANALISADA	PARÂMETROS DERMATOHISTOPATOLÓGICOS AVALIADOS
Epiderme	Acantose (irregular, regular, papilomatosa ou pseudocarcinomatosa); atrofia; hiper e hipogranulocitose; hiperkeratose (ortoceratótica ou paraceratótica); hipoceratose; necrose, diskeratose, apoptose, espongiose, edema intracelular, degeneração reticular; vesículas ou bolhas epidérmicas; acantólise; exocitose; pústulas e microabscessos; hiperpigmentação; crostas.
Derme	Alterações de colágeno, degeneração fibrinóide; atrofia; displasia; calcificação; tecido de granulação; fibroplasia; desmoplasia; fibrose; incontinência pigmentar; edema; mucinose; dermatite (perivascular, intersticial, de interface, vasculite, vesicular, vesicular-pustular subepidérmica, nodular, difusa).
Panículo adiposo	Paniculite (lobular, septal, difusa, supurativa, piogranulomatosa, granulomatosa, linfocítica).
Folículo e epitélio folicular	Ceratose; ceratinização tricolemal; perifoliculite; foliculite; furunculose; displasia; melanose; fibrose; atrofia.
Anexos glandulares	Atrofia; hiperplasia; adenite (supurativa, granulomatosa); hidradenite ou perihidradenite; dilatação ou cistos.

Para a contagem diferencial das células do sistema imunológico presentes nos tecidos avaliados foi utilizado o método de “torre de castelo” onde 10 campos foram analisados em sentido horizontal em magnificação final de 400 x. Foi determinado o número total de células inflamatórias, bem como o número total de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos por campo. Os dados foram compilados e apresentados como médias simples das contagens para cada tipo celular acima citado/campo.

3.3.4.4 Marcação histoquímica para a enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele

A marcação histoquímica para a enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, foi realizada em criocortes de pele obtidos 48 h após a inoculação intradérmica de fêmeas de camundongos C57BL/6 com salina, OVA (50 µg) apenas ou OVA associada a 1 µg de cada LT testada (LT-I, LT-IIb ou LT-IIc). As biópsias de pele coletadas foram inicialmente fixadas por 10 minutos em etanol gelado incubado em gelo e então lavadas (3 x) por 5 minutos com tampão PBS gelado incubado em gelo. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a temperatura de - 80 °C até a criosecção. No dia da marcação histoquímica os tecidos foram crioseccionados (espessura de 8 - 10 µm) e dispostos em lâminas histológicas que permaneceram sob temperatura ambiente por aproximadamente uma hora para secagem do material biológico. Após a secagem os tecidos foram cobertos por 10 minutos com a solução para marcação da enzima MPO (PBS contendo 0,6 mg/mL de reagente de Hanker-Yates

e 0,003% de peróxido de hidrogênio). Após esse período água de torneira foi gotejada brevemente sobre as lâminas para remoção do excesso do reagente e procedeu-se três lavagens dos materiais com PBS (5 minutos/lavagem). As lâminas foram por fim coradas com solução de contracoloração verde de metileno por 2 minutos e água de torneira foi gotejada sobre as mesmas conforme descrito anteriormente para remoção do excesso do corante. O resultado do ensaio foi observado em microscópio invertido (Axiovert 200, Zeiss) e campos representativos foram fotografados nas magnificações 50 x e 100 x.

3.3.4.5 Dosagem dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele

Os procedimentos para a dosagem dos níveis da enzima MPO foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Ferreira (2006). Brevemente, biópsias de pele de animais imunizados foram obtidas 48 h após a inoculação intradérmica de salina ou das toxinas LT-I, LT-IIb ou LT-IIc (1 µg/animal) e homogeneizadas (2 vezes, 45 s por vez) em tampão fosfato de sódio (0,02 M de fosfato de sódio; 0,015 M de Na₂EDTA; 0,1M de NaCl; pH 4,7; 1,9 mL/100mg de tecido) com auxílio de um homogeneizador de tecidos (IKA Laboratories). Após a etapa de homogeneização as amostras foram centrifugadas por 10 min a 4 °C (10.000 x g) e os sedimentos obtidos tratados por 30 segundos com 1,5 mL de solução de NaCl a 0,2 %, seguida da adição de 1,5 mL de solução contendo NaCl (1,6%) e glicose (5%). Após uma nova etapa de centrifugação os sedimentos obtidos foram ressuspensos em tampão fosfato de sódio (0,05 M) pH 5,4 contendo 0,5% de brometo de hexa-1,6-bisdeciltrimetilamonio (HTAB) e as amostras sofreram três ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido para liberação do conteúdo dos grânulos. As amostras foram então centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente e triplicatas de cada uma delas (50 µL/poço) foram misturadas ao reagente BD OptEIA TMB substrate (150 µL/poço) (BD Biosciences) em microplaca de 96 poços incubadas por 5 minutos a 37 °C. As reações foram paralisadas pela adição de H₂SO₄ 4 M (150 µL/poço) e a absorbância (450 nm) mensurada em espectrofotômetro para microplacas (EPOCH, BIOTEK). Os níveis de proteína total nas amostras testadas foram determinados pelo método do ácido bicinonínico com auxílio de kit comercial (BCA Protein Assay, PIERCE), conforme instruções do fabricante. Os níveis de MPO em biópsias de pele de animais imunizados pela via intradérmica foram expressos como: absorbância a 450 nm (DO_{450nm})/mg de proteína total.

3.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ADJUVANTE DAS TOXINAS LT-IIa E LT-IIb ADMINISTRADAS POR VIA INTRADÉRMICA

3.4.1 Imunização pela via transcutânea

Os ensaios de imunização transcutânea empregaram adesivos vacinais confeccionados em nosso próprio laboratório e compostos por quadrados de filme adesivo transparente impermeável com área de 2 cm² (OPSITE FLEXIGRID, Smith Nephew) contendo em sua porção central um pedaço de compressa extra-absorvente tencyl estéril (1 cm²) na qual a formulação vacinal seria aplicada imediatamente antes da imunização. Os procedimentos para confecção e aplicação dos adesivos vacinais foram realizados de acordo com o protocolo cedido pelo pesquisador colaborador Stephen Savarino da Academia Naval dos Estados Unidos da América (U.S. Navy).

Antes de cada dose dos protocolos vacinais a parte inferior do dorso dos camundongos foi tricotomizada conforme descrito na seção 3.3.1. Para o pré-tratamento da pele a região dorsal dos animais previamente depilada foi levemente esfregada cinco vezes contra o sentido de crescimento dos pelos com gaze umidecida em água milli-Q contendo glicerol 10%, procedeu-se a abrasão do extrato córneo com lixa de papel fina (com pressão leve por dez vezes, contra o sentido de crescimento do pelo) e repetiu-se o procedimento com água contendo glicerol 10%, dessa vez no sentido de crescimento dos pelos. A solução de glicerol foi então removida com auxílio de gaze e os adesivos contendo as formulações aplicados, conforme ilustrado na **Figura 4**. Para evitar a remoção dos adesivos pelos animais a região tratada foi coberta com fita crepe e papel craft (**Figura 4B**). Vinte e quatro horas após cada dose de imunização os adesivos vacinais foram retirados e os animais lavados abundantemente com água destilada estéril aquecida, enxugados e devolvidos às suas caixas.

Figura 4. Imunização transcutânea empregando adesivos vacinais. (A) Representação esquemática da aplicação dos adesivos vacinais nos animais BALB/c; (B) Imagens ilustrativas de animais submetidos ao procedimento. Os adesivos foram removidos 24h após a aplicação e a região de contato dos mesmos com a pele lavada com água em abundância e enxugada.

3.4.1.1 Ensaio piloto para determinação da quantidade de LT a ser empregada como adjuvante

Para este ensaio grupos de 3 camundongos BALB/c machos foram submetidos ao protocolo descrito na seção anterior com adesivos vacinais embebidos nas seguintes formulações vacinais: 1) (1) salina; (2) 20 µg de OVA; (3) 20 µg de OVA acrescida de 5 µg de LT-I; (4) 20 µg de OVA acrescida de 10 µg de LT-I ou (5) 20 µg de OVA acrescida de 15 µg de LT-I. O protocolo de imunização consistiu na aplicação de duas doses das formulações vacinais (dias 0 e 21), com intervalo de 20 dias entre as doses. A coleta de sangue para avaliação da resposta humoral sistêmica OVA-específica gerada nos animais imunizados foi realizada por punção do plexo submandibular, antes de qualquer tratamento (dia -1) e duas semanas após a última dose do protocolo vacinal (dia 35). Os soros dos animais foram processados conforme descrito anteriormente na seção 3.3.2 e armazenados a -20°C até a dosagem dos níveis de anticorpos por ELISA.

3.4.1.2 Avaliação da atividade adjuvante de LT-IIa e LT-IIb em ensaios de imunização transcutânea empregando como antígeno o domínio III da proteína de envelope E (EIII) do vírus dengue tipo 2 (DENV2)

Grupos de camundongos BALB/c machos (n=5) foram submetidos ao protocolo descrito na seção 3.4.1 com adesivos vacinais embebidos nas seguintes formulações vacinais: (1) salina; (2) 10 µg de EIII; (3) 10 µg de EIII acrescida de 10 µg de LT-IIa; (4) 10 µg de EIII acrescida de

10 µg de LT-IIIb ou (5) 10 µg de EIII acrescida de 10 µg de LT-I. O protocolo de imunização consistiu na aplicação de quatro doses das formulações vacinais com intervalo de duas semanas entre as doses (dias 0, 14, 28 e 42) (**Figura 5**). A coleta de sangue para avaliação da resposta humoral sistêmica EIII-específica gerada nos animais imunizados foi realizada por punção do plexo submandibular, antes de qualquer tratamento (dia -1) e duas semanas após cada dose (dias 13, 27, 41 e 55) (**Figura 5**). Os soros dos animais foram processados conforme descrito na seção 3.3.2 e armazenados a -20°C até a dosagem dos níveis de anticorpos por ELISA.

Figura 5. Protocolo de imunização pela via transcutânea. As coletas de amostras (soro), indicadas em azul na parte superior da figura, foram realizadas antes de qualquer tratamento (dia -1) e duas semanas após cada dose (dias 13, 27, 41 e 55). Foram administradas quatro doses das formulações vacinais, indicadas em vermelho na parte inferior da figura, nos dias 0, 14, 28 e 42.

3.4.2 Monitoramento da resposta imunológica humoral induzida após a administração transcutânea das LTs

Para as amostras de soro coletadas no ensaio de imunização transcutânea a determinação dos títulos de anticorpos foi realizada por ELISA em placas de poliestireno (Maxisorp, Nunc) sensibilizadas durante 18 h a 4°C com 100 µl de solução contendo OVA (10 µg/mL) ou EIII (1 µg/mL). As placas foram lavadas três vezes com PBS acrescido de tween 20 (0,05%) (PBS-T) e bloqueadas durante duas horas a 37 °C com 200 µL de solução bloqueadora (ver abaixo). Após novo ciclo de lavagem (3 vezes), 200 µL de soros dos animais imunizados (diluição inicial mínima: 1/25, ver solução para diluição abaixo) foram adicionados aos poços e, em seguida, diluições seriadas (2 vezes) das amostras foram realizadas para volume final de 100µL/poço e a placa foi mantida por 90 minutos a 37 °C. Depois de um novo ciclo de lavagem (3 vezes), foram adicionados 100 µL do segundo anticorpo comercial IgG anti-mouse conjugado a peroxidase (Sigma) aos poços, na diluição 1:3000 e as placas foram incubadas por 90 minutos nas condições

descritas anteriormente. Em seguida as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e a revelação foi feita com 100 µL/poço de solução reveladora [Ortofenilenodiamina (OPD) 0,04% dissolvida em tampão 0,1 M citrato de sódio; 0,2 M fosfato monobásico de sódio, pH 5,5 acrescido de 0,015% de peróxido de hidrogênio] por 15 minutos a temperatura ambiente e interrompida com 50 µL por poço de ácido sulfúrico 1 M. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS-Labsystems).

Nos experimentos para dosagem dos níveis de IgG OVA-específica o bloqueio das placas e a diluição das amostras e dos anticorpos conjugados à peroxidase foram realizados com PBS acrescido de 0,05% de tween 20 e 0,1% de albumina bovina sérica (BSA). Os níveis de anticorpos IgG OVA-específicos foram apresentados na forma de títulos, calculados por meio de análise de regressão linear com $R^2 > 0,90$ no programa Excel.

Nos ensaios para determinação dos níveis de anticorpos sistêmicos (IgG) EIII específicos o bloqueio das placas foi realizado com PBS acrescido de 3% de gelatina e a diluição das amostras e dos anticorpos conjugados a peroxidase foi realizada em PBS acrescido de 1% de gelatina. As concentrações de IgG EIII-específica presente no soro dos animais imunizados foram calculadas por interpolação dos valores de absorbância obtidos em curvas de calibração geradas com IgG referência de camundongo comercial (Sigma-Aldrich).

3.4.3 Ensaio de neutralização viral in vivo

Misturas de soros obtidos duas semanas após a última dose do protocolo de imunização transcutânea foram inicialmente submetidas a aquecimento por 30 minutos a 56 °C para inativação do sistema complemento. Em seguida, diluições 1:10 das misturas de soros correspondentes a cada grupo vacinal foram mantidas na presença de 2500 unidades formadoras de placa (UFP)/mL da cepa JHA1 (AMORIM et al., 2012) do sorotipo 2 do vírus dengue (DENV2) em meio DMEM sem soro por 30 minutos a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂. As misturas vírus-soro foram injetadas pela via intracraniana (i.c.) (40 µL/animal) em camundongos BALB/c machos, previamente anestesiados pela via intramuscular com uma mistura de ketamina e xilazina, e a sobrevivência dos animais foram monitorada por 21 dias.

3.4.4 Desafio dos animais vacinados por meio de infecção com o sorotipo 2 do vírus dengue (DENV-2)

A eficácia do protocolo de imunização transcutânea foi avaliada por meio da infecção dos animais vacinados com a cepa JHA1 do DENV2. Duas semanas após a última dose do protocolo vacinal (dia 56) os camundongos foram desafiados conforme descrito na seção 3.4.3 com 100 UFP da cepa viral JHA1 (que corresponde a duas vezes a DL_{50}) diluída em meio DMEM sem soro. A sobrevivência dos animais após o desafio foi monitorada por 21 dias.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para verificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos foram aplicados o teste t de Student ou a análise de variância (ANOVA) seguida dos testes post-hoc Bonferroni ou Tukey. O teste estatístico aplicado aos dados está indicado nas legendas das figuras apresentadas. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$ e as avaliações foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 5.01.

4 RESULTADOS

4.1 OBTENÇÃO DOS ADJUVANTES E ANTÍGENOS EMPREGADOS NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

4.1.1 Obtenção dos adjuvantes

As toxinas termo-lábeis (LTs) utilizadas nos ensaios de imunização foram purificadas a partir de extratos de *E. coli* recombinantes submetidos à técnicas cromatográficas, com o auxílio do equipamento AKTA-FPLC (Pharmacia). Para obtenção da LT padrão do tipo I (LT-I) foi realizada inicialmente cromatografia de afinidade em coluna contendo galactose, em função da afinidade específica do pentâmero B desta toxina a este monossacarídeo, seguida de cromatografia por exclusão molecular. As toxinas do tipo II empregadas neste trabalho, LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc, foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel, em função da afinidade das caudas contendo 6 aminoácidos histidina geneticamente fusionadas na porção C-terminal de seus monômeros B a este metal, seguida de cromatografia por exclusão molecular. Após os processos cromatográficos e diálise, todas as toxinas foram obtidas em nível de pureza satisfatório e com perfil eletroforético característico das LTs, ilustrado na **Figura 6**.

Os perfis eletroforéticos em SDS-PAGE 17% das LTs purificadas apresentam as subunidades A e B das toxinas com massa molecular dentro dos valores preditos (~28 kDa para a subunidade A e ~11,5 kDa para os monômeros de subunidade B). É possível inferir a partir do resultado obtido que as proteínas encontram-se na conformação nativa pois, além de purificadas em condições não desnaturantes, observam-se bandas correspondentes às subunidades A das moléculas, que apenas poderiam estar presentes nas frações de eluição se ligadas às subunidades B, que medeiam a interação da holotoxina às resinas de afinidade.

Figura 6. Caracterização por migração eletroforética (SDS-PAGE 17%) das toxinas termo-lábeis após o processo de purificação. M – marcador de massa molecular (Pierce); 1 – LT-I; 2 – LT-IIa; 3 – LT-IIb; 4 – LT-IIc. Foram aplicados 3,5 µg de cada proteína purificada por poço.

4.1.2 Obtenção dos antígenos

Para os ensaios de imunização descritos neste trabalho foram empregadas como antígenos vacinais a proteína ovalbumina (OVA) e o domínio III da glicoproteína E do envelope viral do vírus dengue (EIII). A OVA utilizada foi obtida comercialmente da empresa Sigma-Aldrich enquanto a proteína EIII foi purificada em nosso laboratório por cromatografia de afinidade ao níquel automatizada a partir de extrato proteico oriundo de sistema procarioto de expressão (*E. coli*) e submetido a processo de redobramento. A **Figura 7** apresenta o cromatograma do processo de purificação da proteína EIII e o produto final obtido.

Figura 7. Purificação da proteína recombinante EIII. (A) Cromatograma do processo de purificação (cromatografia de afinidade em coluna niquelada); (B) Caracterização em SDS-PAGE (17%) da amostra presente no pico B após diálise. M-Marcador de massa molecular (Fermentas); 1 – Proteína EIII purificada e dialisada (2,5 µg).

No cromatograma é possível observar que durante a eluição foram obtidos dois picos contendo proteínas inicialmente adsorvidas à coluna e liberadas pela competição com concentrações crescentes de imidazol (Figura 7A). O primeiro deles (pico A, 200 mM de imidazol) apresentou proteínas contaminantes (dados não mostrados), enquanto a proteína de interesse estava localizada no segundo pico (pico B, 700 mM de imidazol). As frações obtidas a partir do pico B foram submetidas à diálise para remoção do competidor e a proteína purificada foi por fim caracterizada em corrida eletroforética (Figura 7B). Ao final do processo de purificação foi possível obter a proteína em sua forma solúvel, com tamanho similar ao predito in silico (~15 kDa) e com nível insignificante de proteínas contaminantes evidenciadas por coloração do gel com azul de Coomassie. O rendimento do processo de purificação foi de 6 mg de proteína EIII solúvel/L de cultura induzida.

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA IN VITRO DAS PROTEÍNAS EMPREGADAS COMO ADJUVANTES NOS ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO

Embora até o momento não exista consenso sobre o mecanismo responsável pela atividade adjuvante das LTs e qual o papel de cada uma das subunidades isoladas neste processo, estudos apontam a importância da subunidade A tóxica e do pentâmero B funcional para o desencadeamento de resposta imunológicas contra antígenos co-administrados (GUIDRY et al., 1997; NORTON et al., 2012). Sendo assim, antes de dar início aos ensaios de imunização avaliamos a funcionalidade de ambas as subunidades das quatro toxinas empregadas neste trabalho, a fim de confirmar que a atividade biológica das proteínas estava preservada. Para avaliação da capacidade funcional das toxinas foi utilizado o ensaio de citotonicidade induzida por LT em células murinas imortalizadas (células tumorais murinas Y-1 oriundas de glândula adrenal) (DONTA; MOON; WHIPP, 1974).

A atividade citotônica das LTs sobre linhagens de células eucariotas depende da ligação dessas moléculas à superfície celular, mediada pela interação entre os pentâmeros B e receptores específicos de membrana, bem como da internalização da proteína e liberação da subunidade A tóxica no citossol, o que culmina na ativação da proteína adenilato ciclase (AC) e no acúmulo de AMPc responsável pela alteração na morfologia celular (as células Y-1 tornam-se arredondadas). A capacidade de ligação das LT-II (LT-IIa e LT-IIb) às células Y-1 foi descrita por Donta, Tomicic e Holmes (1992).

Na **Figura 8** são apresentados os resultados do tratamento das células Y-1 por oito horas com 1 μ g de cada uma das toxinas purificadas, sendo possível observar a morfologia das células não tratadas (**Figura 8A**) e tratadas com as toxinas LT-I (**Figura 8B**), LT-IIa (**Figura 8C**), LT-IIb (**Figura 8D**) e LT-IIc (**Figura 8E**). Nota-se que o tratamento com todas as LTs causou alterações morfológicas semelhantes nas células Y-1, tornando-as arredondadas conforme descrito no parágrafo anterior. Com base nos resultados obtidos comprovamos que todas as toxinas purificadas apresentavam suas subunidades constituintes com atividade biológica preservada, o que nos permitiu dar início aos ensaios de imunização propostos.

Figura 8. Avaliação da atividade biológica das LTs purificadas - Ensaio de citotoxicidade em células eucariotas murinas Y-1. As células foram incubadas por aproximadamente 8 horas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂ na ausência (A - controle negativo) ou presença de 1 μ g de uma das toxinas: LT-I (B) - controle positivo, LT-IIa (C), LT-IIb (D) ou LT-IIc (E). Os efeitos induzidos pela ação das proteínas foram observados em microscópio invertido com magnificação de 200 x. As cabeças de seta indicam a morfologia típica de células Y-1 não tratadas enquanto as setas indicam a morfologia arredondada característica da ação de LT.

4.3 EFEITO ADJUVANTE E ATIVIDADE INFLAMATÓRIA DAS TOXINAS LT-IIb E LT-IIc EMPREGADAS EM ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO INTRADÉRMICA

As respostas imunológicas desencadeadas por um adjuvante vacinal podem ser influenciadas pela natureza e dose desta molécula e do antígeno co-administrado, além da via de administração empregada. O potencial adjuvante de LT-I tem sido avaliado desde 1988, para diversas vias parenterais (subcutânea, intramuscular e intradérmica), de mucosa (oral, nasal, sublingual, retal) e transcutânea. Até o momento a avaliação do potencial adjuvante das LT-IIs foi realizada para as vias subcutânea (LT-IIa) e nasal (LT-IIa, LT-IIb e LT-IIc) e pela via intradérmica (LT-IIa, LT-IIb) (CONNELL et al., 1998; GREENE et al., 2013; MATHIAS-SANTOS et al., 2011; MARTIN et al., 2000; NAWAR et al., 2011). No ano de 2011 nosso grupo demonstrou uma menor atividade inflamatória (potencial reatogênico) de LT-IIa quando administrada pela via intradérmica, com efeito adjuvante (respostas imunológicas humoral e celular antígeno-específicas) similar ao observado pela administração de LT-I na mesma via (MATHIAS-SANTOS et al., 2011). Um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar o potencial adjuvante e efeito inflamatório das duas outras toxinas incluídas no grupo de LT-IIs (LT-IIb e LT-IIc) quando administradas pela via intradérmica.

As análises foram realizadas em camundongos C57BL/6, utilizando a proteína OVA como antígeno modelo, e os protocolos de imunização consistiram de duas doses das formulações contendo o antígeno, na ausência ou presença das toxinas LT-IIb, LT-IIc ou LT-I (controle positivo), com intervalo de duas semanas entre as doses. Para a determinação do potencial adjuvante das LT-IIs administradas foram avaliadas as respostas imunológicas humoral e celular antígeno-específicas.

4.3.1 Resposta imunológica humoral OVA-específica em animais imunizados pela via intradérmica com as toxinas LT-IIb e LT-IIc

A resposta imunológica humoral sistêmica antígeno-específica (IgG sérica OVA-reativa), gerada pela administração do antígeno modelo na ausência ou presença das toxinas LT-IIb, LT-IIc e LT-I foi mensurada pela técnica de ELISA. A **Figura 9** apresenta os níveis de anticorpos IgG OVA-específicos nos soros dos camundongos duas semanas após cada uma das doses do protocolo vacinal (dias 14 e 30).

Figura 9. Resposta humoral sistêmica OVA-específica desencadeada pela administração intradérmica de LT-IIb ou LT-IIc como adjuvante. Grupos de camundongos C57BL/6 (n=5) foram imunizados pela via intradérmica com 50 µg de OVA apenas ou a mesma quantidade do antígeno em associação com 1 µg de cada um dos adjuvantes (LT-IIb, LT-IIc ou LT-I). A figura apresenta as médias dos níveis de IgG em soro duas semanas após a administração da primeira dose (dia 14) e da segunda dose (dia 30). **p<0,01, ***p<0,001 (Teste t, bi-caudal). Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Duas semanas após a primeira dose do protocolo vacinal (dia 14, barras cinzas) já foi possível observar um aumento médio de 33 e 20 vezes nos níveis de anticorpos IgG séricos OVA-reativos em animais tratados com as formulações vacinais contendo as toxinas LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes, respectivamente, em comparação ao grupo imunizado apenas com o antígeno. Os níveis de IgG OVA-específico no soro dos animais tratados com as LT-IIs foram ainda semelhantes àquele encontrado no grupo imunizado com LT-I (controle positivo) neste momento do protocolo de imunização. Embora seja possível observar um incremento na resposta humoral direcionada contra a proteína OVA nos animais tratados com as diferentes LTs como adjuvante no dia 14, apenas no grupo imunizado com LT-IIc este aumento médio nos níveis séricos de IgG OVA-reativa foi estatisticamente significativo em comparação ao grupo imunizado apenas com a proteína.

Após duas doses das formulações vacinais (dia 30, barras pretas) todos os grupos que receberam o antígeno em combinação com as LTs como adjuvantes apresentaram aumento médio dos níveis de IgG OVA-específica estatisticamente significativa em relação ao grupo imunizado com OVA apenas, independente do tipo de toxina empregada. Neste caso o aumento médio nos

níveis de anticorpos antígeno-reativos foi de aproximadamente 70 vezes em relação ao grupo que recebeu apenas OVA.

4.3.2 Resposta imunológica celular OVA-específica em animais imunizados pela via intradérmica com as toxinas LT-IIb e LT-IIc

A busca por adjuvantes vacinais capazes de induzir resposta imunológica celular antígeno-específica, especialmente de linfócitos T CD8⁺, ainda é um importante desafio da vacinologia moderna. Esses linfócitos têm papel fundamental na eliminação de células tumorais e na lise de células infectadas por patógenos intracelulares, logo, a indução de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos pela administração de vacinas seria de grande utilidade para o controle de infecções por vírus e outros parasitas intracelulares. Diante do exposto, optamos por avaliar também a presença de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos em animais vacinados pela via intradérmica com o antígeno OVA combinado às toxinas termo-lábeis do tipo II (LT-IIb e LT-IIc) como adjuvantes, empregando para isto a imunodeteção das células com anticorpos conjugados a fluoróforos, associada à técnica de citometria de fluxo.

Inicialmente avaliamos o número de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos por meio da marcação dessas células com um dextrâmero conjugado ao fluoróforo FITC e composto de moléculas de MHC de classe I de camundongos C57BL/6 (alelo H-2 Kb) associadas a um peptídeo CD8 específico desta proteína (OVA₂₅₇₋₂₆₄: SIINFELK). Apenas os linfócitos T CD8⁺ CD44^{hi} (células T CD8⁺ de memória) positivas para o dextrâmetro acima citado foram consideradas em nossa análise. A **Figura 10** apresenta o número de linfócitos T CD8⁺ dextrâmetro positivos presentes no sangue de animais imunizados sete dias após a primeira dose (dia 7) e 4 dias após a segunda dose (dia 18) do protocolo vacinal.

Figura 10. Número de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos presentes no sangue periférico de animais imunizados pela via intradérmica com os adjuvantes LT-IIb e LT-IIc. Fêmeas de C57BL/6 foram tratadas com 50 µg de OVA apenas ou com a mesma quantidade de antígeno na presença de 1 µg de cada um dos adjuvantes (LT-IIb, LT-IIc ou LT-I). O número de células T CD8⁺ CD44^{hi} positivas para marcação com um dextrâmero MHC-I específico de OVA foi determinado em sangue periférico (A) 7 dias após a primeira dose (dia 7) e (B) 4 dias após a segunda dose (dia 18). p*,0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni). Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

A administração de uma dose da formulação vacinal contendo a toxina LT-IIc como adjuvante foi capaz de aumentar de maneira estatisticamente significativa o número de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos nos animais imunizados, sendo a porcentagem média de linfócitos T CD8⁺ dextrâmero positivos encontrada neste grupo similar à desencadeada pela administração da toxina LT-I, utilizada como controle positivo do ensaio (**Fig. 10A**). O emprego de apenas uma dose da toxina LT-IIb como adjuvante levou a um aumento estatisticamente insignificante no número de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos em relação ao grupo imunizado apenas com o antígeno modelo (**Fig. 10A**). No décimo oitavo dia do protocolo vacinal, que corresponde ao quarto dia após a administração da segunda dose, é possível observar que a porcentagem média de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos circulantes foi similar nos grupos tratados com ambas as LT-II e aumentada em relação àquela apresentada por animais imunizados com a proteína OVA na ausência de adjuvante (**Fig. 10B**). Neste mesmo momento do protocolo vacinal o emprego da proteína LT-I como adjuvante não elevou de maneira estatisticamente significativa o número de células T CD8⁺ OVA-específicas. Esses resultados demonstram que as LT-II aplicadas como adjuvantes pela via intradérmica aumentam o número de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos

de memória em camundongos, principalmente após a administração de duas doses das formulações vacinais.

Foram realizados ainda experimentos para a avaliação qualitativa da função efetora dessas células *in vitro* e que incluíram a análise da capacidade de produção da citocina IFN- γ e dos níveis de expressão da molécula CD107a após re-estímulo *in vitro* de células de sangue periférico com o peptídeo CD8 específico OVA₂₅₇₋₂₆₄. A **Figura 11** apresenta a porcentagem média de linfócitos T CD8⁺ antígeno específicos, obtidos do sangue de animais imunizados, capazes de expressar a citocina IFN- γ quando re-estimulados *in vitro*. Vale lembrar que a produção desta citocina após re-estímulo é um indicativo da função efetora dessa população celular. As respostas foram monitoradas após a administração intradérmica de uma dose (dia 7 do protocolo vacinal) ou duas doses (dia 21 do protocolo vacinal) das formulações vacinas contendo as toxinas LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes.

Figura 11. Número de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos produtores de IFN- γ presentes no sangue periférico de animais imunizados pela via intradérmica com os adjuvantes LT-IIb e LT-IIc. Camundongos C57BL/6 foram tratados com 50 μ g de OVA apenas ou com a mesma quantidade de antígeno na presença de 1 μ g de cada um dos adjuvantes (LT-IIb, LT-IIc ou LT-I). O número de linfócitos produtores de IFN- γ foi determinado por ICS (Intracellular Cytokine Staining). (A) Porcentagem de células T CD8⁺ IFN- γ positivas presentes no sangue periférico de animais 7 dias após a primeira dose (dia 7); (B) Porcentagem de células T CD8⁺ IFN- γ positivas presentes no sangue periférico de animais 7 dias após a segunda dose (dia 21) do protocolo vacinal. São apresentados os números de células produtoras de IFN- γ por animal na ausência (○) ou na presença (●) do peptídeo OVA₂₅₇₋₂₆₄ como re-estímulo *in vitro* e a porcentagem média de células CD8⁺ específicas produtoras de IFN- γ por grupo (—) após re-estímulo *in vitro* com o mesmo peptídeo. $p^*, 0,05$, $***p < 0,001$ (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni). Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Os dados obtidos sete dias após a administração da primeira dose do protocolo vacinal (dia 7) indicam que a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos após re-estímulo *in vitro* apresenta comportamento semelhante ao observado no experimento anterior. Os

grupos imunizados com os adjuvantes LT-IIc e LT-I (controle positivo) apresentaram porcentagens similares de linfócitos produtores desta citocina, estatisticamente significantes em relação ao grupo que recebeu o antígeno isoladamente (**Figura 11A**). Neste mesmo ponto do protocolo vacinal é possível observar ainda a presença de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos produtores de IFN-gama nos animais imunizados com a proteína LT-IIb contudo, não foi possível demonstrar significância estatística dos dados em comparação ao grupo tratado apenas com OVA (**Figura 11A**). Animais submetidos ao regime de imunização com uma dose de salina (controle negativo) ou OVA isoladamente não apresentaram linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos produtores de IFN-gama quando re-estimulados in vitro com o peptídeo OVA₂₅₇₋₂₆₄. Na **Figura 11B** é apresentada a porcentagem média de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos produtores de IFN-gama uma semana após a administração da segunda dose do protocolo vacinal (dia 21), sendo possível observar números similares de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos produtores de IFN-gama nos grupos de animais que receberam as LTs como adjuvantes, aumentados em relação ao nível de células T CD8⁺ OVA-específicas secretoras da mesma citocina encontrado em animais imunizados com a proteína OVA apenas. De maneira semelhante ao observado no dia 7 do protocolo vacinal (**Figura 11A**), não foi possível detectar linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos produtores de IFN-gama em níveis estatisticamente relevantes no grupo tratado apenas com OVA quando em comparação ao grupo controle negativo do ensaio (salina) (**Figura 11B**).

A fim de compreender melhor as dinâmicas de geração e manutenção de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos produtores de IFN-gama após a administração de cada uma das LTs testadas foi realizado o monitoramento dos níveis desses linfócitos nos dias 7, 14, 21 e 28 do protocolo vacinal e os resultados obtidos são apresentados na **Figura 12**.

Figura 12. Monitoramento do número de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos secretores de IFN-gama presentes no sangue periférico de animais imunizados pela via intradérmica com os adjuvantes LT-IIb e LT-IIc ao longo do protocolo de imunização. Fêmeas de C57BL/6 foram tratadas com duas doses de formulações vacinais contendo 50 µg de OVA apenas ou a mesma quantidade de antígeno na presença de 1 µg de cada um dos adjuvantes (LT-IIb, LT-IIc ou LT-I). O número de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos produtores de IFN-gama foi determinado, em sangue periférico, uma e duas semanas após a primeira dose (dias 7 e 14) e uma e duas semanas após a segunda dose (dias 21 e 28) do protocolo vacinal. p*,0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni). Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Conforme já demonstrado anteriormente as toxinas LT-IIc e LT-I geram os maiores níveis de linfócitos T CD8⁺ antígeno específicos produtores de IFN-gama sete dias após a primeira dose do protocolo de imunização, seguidas pela toxina LT-IIb, enquanto não é possível observar essa população celular em animais tratados com o antígeno isoladamente (**Fig. 12A**). A discrepância de significância estatística no número de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos produtores de IFN-gama presentes no grupo LT-IIb em relação ao grupo tratado apenas com o antígeno OVA apresentada nas **Figuras 11A e 12** deve-se provavelmente à aplicação de testes estatísticos distintos para as análises, respectivamente one-way e two-way ANOVA com Bonferroni como teste post-hoc. Ainda em relação à resposta obtida após uma dose das vacinas, no décimo quarto dia do protocolo vacinal curiosamente ocorre o inverso do observado no dia sete: os maiores níveis de células T CD8⁺ OVA-específicas secretoras de IFN-gama são observadas no grupo tratado com a toxina LT-IIb, com significância estatística em comparação aos grupos imunizados com o antígeno isoladamente ou na presença dos outros dois adjuvantes testados (LT-IIc e LT-I) (**Figura 12**). Neste momento do protocolo vacinal, entre os grupos de animais tratados com as formulações vacinais empregando adjuvantes, a menor porcentagem média de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos secretores de IFN-gama foi encontrada no grupo de camundongos que

receberam LT-IIc, seguida dos animais imunizados com LT-I. É importante destacar que os níveis de linfócitos secretores de IFN-gama nesses grupos não apresentam diferenças estatísticas em relação ao grupo que recebeu apenas OVA (**Figura 12**). Em relação a geração de células T CD8⁺ OVA-específicas após a administração de apenas uma dose das toxinas testadas podemos afirmar que todas as LTs empregadas induzem linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos contudo a cinética de geração dessa população celular difere de acordo com a toxina empregada.

Os perfis de ativação de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos induzidos pelas formulações vacinais apresentaram comportamento similar 21 e 28 dias após a segunda dose. No dia 21 os níveis de linfócitos T CD8⁺ IFN-gama⁺ antígeno-específicos no grupo tratado com LT-IIb permaneceram estatisticamente relevantes em comparação ao grupo OVA (**Figura 12**). Neste momento do protocolo vacinal ocorre um incremento estatisticamente significativo na resposta de células T CD8⁺ antígeno-específicas produtoras de IFN-gama encontrada nos grupos LT-IIc e LT-I em relação ao grupo tratado com OVA, provavelmente relacionada a uma re-expansão dessa população celular após a administração da segunda dose (**Figura 12**). No dia 28 os grupos de animais imunizados com OVA na presença das LTs como adjuvantes apresentaram porcentagens médias de células T CD8⁺ secretoras de IFN-gama estatisticamente relevantes em relação ao grupo tratado apenas com o antígeno, não sendo possível observar diferenças estatísticas na comparação dessa população celular entre os grupos tratados com os adjuvante (**Figura 12**).

Como último ensaio para avaliação qualitativa da funcionalidade dos linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos *in vitro* realizamos a marcação da molécula de superfície CD107a, relacionada ao processo de degranulação na presença de estímulo, seis dias após a administração da segunda dose do protocolo vacinal (dia 21), em esplenócitos de animais imunizados por via intradérmica. Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 13**.

Figura 13. Expressão de CD107a em esplenócitos de animais imunizados pela via intradérmica com LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes. (A) Percentagem de esplenócitos CD8⁺ produtores de IFN-gama (considerados “ativados”) e (B) Percentagem de esplenócitos CD8⁺ expressando CD107a e produzindo IFN-gama (considerados “efetores”). Os esplenócitos dos animais imunizados foram recolhidos sete dias após a segunda dose do protocolo vacinal (dia 21) e incubados por 12h na presença do peptídeo MHC-I restrito de OVA SIINFEKL (300 ng/poço) e de anticorpo monoclonal anti-CD107a de camundongo. Após o período de incubação as células foram marcadas para as moléculas CD8 e IFN-gama murinas com anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos distintos e então submetidas à citometria de fluxo. p*,0,05, **p<0,01, ***p<0,001 (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni).

Neste experimento mensuramos a porcentagem de linfócitos CD8⁺ capazes de secretar a citocina IFN-gama após re-estímulo in vitro com o peptídeo OVA₂₅₇₋₂₆₄ (**Figura 13A**) e também o percentual de linfócitos T CD8⁺ capazes de expressar simultaneamente o marcador CD107a e a citocina IFN-gama (**Figura 13B**), sendo tais populações celulares consideradas para análise como correspondentes a linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos com perfil “ativado” e a linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos com perfil “efetor”, respectivamente. Os resultados obtidos demonstram que a administração de duas doses das formulações vacinais contendo as LTs testadas como adjuvantes induz níveis similares de linfócitos T CD8⁺ ativados (**Figura 13A**) e que a maioria desses linfócitos (>75%) é capaz de expressar o marcador de degranulação CD107a (**Figura 13B**), indicando o potencial efetor dessas células. É importante destacar ainda a ausência dessas populações de linfócitos em animais tratados apenas com OVA, o que demonstra o papel das LTs como indutoras de respostas de células T CD8⁺ antígeno-específicas possivelmente citotóxicas quando administradas como adjuvantes por via intradérmica.

Com o intuito de confirmar o perfil efetor dos linfócitos T CD8⁺ específicos gerados após a imunização empregando OVA como antígeno e LT-IIb ou LT-IIc como adjuvante realizamos

por fim o ensaio de citotoxicidade *in vivo*. Neste ensaio duas populações de esplenócitos provenientes de animais não imunizados foram marcadas com concentrações distintas do corante vital CFSE. A população marcada com a maior concentração do corante foi então incubada com o peptídeo OVA₂₅₇₋₂₆₄, o que permitiu a alocação do peptídeo nas moléculas de MHC de classe I destes esplenócitos, tornando-os células alvo para lise. Concentrações iguais das duas populações de esplenócitos corados foram então misturadas e injetadas por via endovenosa nos animais imunizados seis dias após a segunda dose do protocolo vacinal (dia 21). O percentual de lise das células alvo (marcadas com o peptídeo SIINFEKL de OVA) foi determinado por citometria de fluxo, 18h após a injeção da mistura de células marcadas, a partir dos esplenócitos dos animais tratados (**Figura 14**).

Figura 14. Citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos desencadeada pela administração de LT-IIb ou LT-IIc como adjuvante por via intradérmica. Uma semana após a última dose do protocolo vacinal (dia 21) cada grupo experimental recebeu pela via endovenosa 2×10^7 células, sendo metade dessa população apenas marcada com CFSE enquanto a outra metade além de marcada com o corante foi recoberta pelo peptídeo T CD8⁺ específico OVA₂₅₇₋₂₆₄. As células injetadas foram recuperadas após 18h, a partir dos baços dos animais imunizados, e contadas com o auxílio de um citômetro de fluxo. (A) Histogramas representativos obtidos de animais de cada um dos grupos experimentais. Os picos à esquerda representam as células controle negativo do ensaio (apenas marcadas com corante), enquanto os picos à direita ilustram a população de células-alvo (marcadas com CFSE e recobertas com peptídeo CD8 específico de OVA) presentes no baço dos animais imunizados. (B) Porcentagem média (—) e individual (●) de lise específica das células alvo injetadas nos diferentes grupos de imunização. ***p<0,001 (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni). Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Os resultados apresentados na **Figura 14** demonstram a geração de linfócitos T efetores em todos os grupos imunizados evidenciada indiretamente pela lise específica das células alvo recobertas com o peptídeo CD8 específico de OVA (SIINFEKL). A geração máxima de linfócitos T efetores ocorreu em animais que receberam as LTs como adjuvantes vacinais, sem diferenças estatisticamente significantes nos números médios de linfócitos T citotóxicos entre esses grupos. Em relação ao grupo imunizado apenas com OVA, a administração de todas as LTs como adjuvantes se mostrou aproximadamente 2,6 x superior na geração de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, com lises específicas médias de 30% no primeiro grupo e de aproximadamente 80% nos grupos que receberam as toxinas.

4.3.3 Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração intradérmica das toxinas LT-IIb e LT-IIc como adjuvantes

O primeiro relato de atividade inflamatória induzida pela administração intradérmica de uma toxina termo-lábil do tipo II foi realizado por nosso grupo no ano de 2011 (MATHIAS-SANTOS et al., 2011). Neste trabalho demonstramos que a toxina LT-IIa apresenta propriedades adjuvantes humoral e celular similares às da toxina LT-I com atividade inflamatória reduzida quando administrada por essa via. A avaliação do potencial adjuvante e inflamatório das outras duas toxinas representantes desse grupo de LTs, a saber LT-IIb e LT-IIc, foi objeto de estudo da presente tese. Os dados relativos à atividade adjuvante foram apresentados nas seções 4.3.1 e 4.3.2 do trabalho e demonstram que, similar ao demonstrado anteriormente para LT-IIa, as moléculas LT-IIb e LT-IIc apresentam propriedades adjuvantes humoral e celular comparáveis às induzidas por LT-I quando administradas por via intradérmica. No que concerne ao comportamento inflamatório, os dados a seguir demonstram o menor potencial reatogênico de LT-IIb e LT-IIc em comparação à LT-I quando administradas por via intradérmica, induzindo menores níveis de edema e menor número de células inflamatórias no sítio de inoculação.

A facilidade de observação de possíveis efeitos adversos/reatogênicos desencadeados após a inoculação é uma das vantagens da aplicação intradérmica de antígenos e/ou adjuvantes. Após a administração intradérmica de LT-I essa reatogenicidade é caracterizada pela indução de uma forte resposta inflamatória com presença de eritema e edema no sítio de inoculação, que se iniciam aproximadamente 18h após a injeção da proteína e podem permanecer por até duas semanas (ZOETEWIJ et al., 2006). A observação macroscópica do sítio de inoculação foi

utilizada como parâmetro inicial de comparação da atividade inflamatória das toxinas LT-IIb e LT-IIc em relação à LT-I quando administradas por via intradérmica. Nesse experimento os animais foram imunizados com uma dose das formulações contendo OVA apenas (50 µg) ou OVA na presença de 0,5 µg de cada LT testada e o sítio de inoculação foi fotografado 24 horas após as injeções (**Figura 15**).

Figura 15. Aspecto macroscópico do sítio de inoculação 24 h após a injeção intradérmica de diferentes toxinas termo-lábeis (vista lateral e superior). Imagens ilustrativas do dorso dos animais que receberam 50 µg de OVA (quadrante superior esquerdo), 50 µg de OVA + 0,5 µg de LT-IIb (quadrante superior direito), 50 µg de OVA + 0,5 µg de LT-IIc (quadrante inferior esquerdo) ou 50 µg de OVA + 0,5 µg de LT-I (quadrante inferior direito) por via intradérmica. A pápula gerada imediatamente após a inoculação intradérmica foi demarcada com caneta marcador permanente na cor preta a fim de facilitar a posterior identificação da região tratada. A área demarcada em vermelho representa a delimitação do edema observado no dorso dos camundongos.

Nossos resultados indicam que a administração intradérmica de OVA isoladamente não induz reações adversas no sítio de inoculação, não sendo possível observar visualmente qualquer reatogenicidade 24h após o inóculo dessa proteína (**Figura 15**, quadrantes superiores esquerdos). A administração intradérmica de OVA associada às LT-IIIs, por sua vez, induz um edema discreto no sítio de inoculação, limitado à região da pápula gerada imediatamente após a administração das formulações vacinais (**Figura 15**, quadrante superior direito e inferior esquerdo). Por fim, 24h após a inoculação de LT-I pela mesma via é possível observar um edemaciamento intenso da região de inoculação (comparar a delimitação da área de edema – linha vermelha – apresentada nas fotos de animais tratados com LT-IIb, LT-IIc e LT-I), acompanhado de eritema, isto é, coloração avermelhada da pele provocada por vasodilatação capilar, que leva a maior aporte de sangue para a região afetada. Nesse grupo de animais foi possível observar ainda o surgimento de petéquias (pequenos pontos vermelhos causados por uma pequena hemorragia dos vasos sanguíneos) na região de inoculação (**Figura 15**, vista superior do dorso do animal inoculado com LT-I).

O edema, um dos sinais clássicos do processo inflamatório, induzido pela administração das diferentes LTs por via intradérmica foi acompanhado ao longo de duas semanas e os resultados obtidos são apresentados na **Figura 16**.

Figura 16. Cinética de edemaciamento após a inoculação intradérmica de diferentes toxinas termo-lábeis. Fêmeas de camundongos da linhagem C57BL/6 foram tratadas por via intradérmica com 50 µg OVA (○) ou OVA na presença de 1 µg de LT-IIb (□), LT-IIc (▼) ou LT-I (◆). O surgimento e persistência de edema na região de inoculação (dorso) foi monitorado com auxílio de paquímetro digital por um período de 13 dias. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA, teste post-hoc: Bonferroni). Os símbolos indicam relevância significativa em relação ao grupo imunizado com LT-IIc. Os resultados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

Os maiores valores médios de edema foram encontrados no grupo inoculado com a toxina LT-I, com nível máximo de edema sendo observado 48h após a administração dessa proteína. Os níveis médios de edema neste grupo apresentaram relevância estatística em relação aos animais tratados com a toxina LT-IIc até o décimo primeiro dia de acompanhamento. Os níveis de edema em camundongos tratados com LT-IIc foram os menores observados ao longo do período de observação em comparação com as demais toxinas, indicando um menor potencial reatogênico desse adjuvante quando administrado por via intradérmica. No grupo que recebeu a toxina LT-IIb foram observados níveis de edema similares aos encontrados no grupo tratado com LT-IIc durante os primeiros cinco dias de acompanhamento, contudo nota-se um edemaciamento tardio do sítio de inoculação no sexto dia de monitoramento, que, em seguida diminui progressivamente equiparando-se ao nível de edema observado no grupo imunizado com LT-IIc no décimo terceiro dia de avaliação (**Figura 16**).

O microambiente gerado no sítio de inoculação após a administração de uma formulação vacinal é de extrema importância na indução de respostas imunológicas inata e também adaptativa. Para avaliação do microambiente gerado após a administração intradérmica das diferentes LTs testadas foi realizada a mensuração dos níveis dos mediadores solúveis IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12 (IL-12p70) e da quimiocina MCP-1 presentes no fluido retirado do sítio de inoculação vinte e quatro horas após a injeção das proteínas, por citometria de fluxo empregando a técnica de CBA com kit comercial (BD Biosciences). Os fluídos intercelulares foram obtidos após a centrifugação das regiões edemaciadas, conforme descrito por Wigg, Aukland e Tenstad (2003). A **figura 17** apresenta os resultados obtidos. Dentre as citocinas avaliadas foi possível observar aumento dos níveis de IL-6, uma molécula amplamente conhecida por seu potencial inflamatório, nos fluidos intercelulares oriundos de animais inoculados com as LTs. Animais tratados com OVA isoladamente apresentaram os maiores níveis dos demais mediadores testados [IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12 (IL-12p70)]. A inoculação intradérmica das toxinas LT-IIc e LT-I como adjuvante causou decréscimo estatisticamente significativo nos níveis das citocinas IL-10, IFN- γ , IL-12 (IL-12p70) e TNF α quando em comparação ao grupo OVA enquanto a administração de LT-IIb como adjuvante pela mesma via modulou negativamente apenas a produção da citocina TNF α . Por fim, a administração intradérmica das LTs testadas não interfere nos níveis da quimiocina MCP-1 presente na pele (**Figura 17**).

Figura 17. Análise dos níveis de mediadores inflamatórios presentes no líquido intercelular das regiões edemaciadas. Grupos de camundongos C57BL/6 foram inoculados por via intradérmica com OVA (50 µg) apenas ou a mesma quantidade da proteína na presença de 1 µg de uma das LTs (LT-IIb, LT-IIc ou LT-I) como adjuvantes. O líquido intersticial presente nos sítios de inoculação 24h após as injeções foi obtido por filtração do tecido conforme descrito na seção 3.3.4.2 e os níveis dos mediadores solúveis IL-6, IL-10, MCP-1, IFN-γ, TNF-α e IL-12 (IL-12p70) foram mensurados por citometria com auxílio do kit BD Mouse Inflammatory Multiplex CBA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Teste t, bicaudal). Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes.

As citocinas e quimiocinas são importantes fatores solúveis secretados por células residentes e transientes do tecido após contato com os componentes de uma formulação vacinal e medeiam a migração, maturação e ativação de populações celulares das linhagens granulocítica (neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas) e linfocítica (linfócitos T e B). A fim de avaliar a migração de células inflamatórias para o sítio de inoculação após a administração intradérmica das diferentes LTs testadas, biópsias de pele dos animais tratados foram obtidas dois dias após a injeção das toxinas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Fotomicrografias representativas do aspecto microscópico das regiões de inoculação das vacinas contendo diferentes LTs como adjuvantes são apresentadas na **Figura 18**. É possível observar infiltração moderada de células polimorfonucleares na derme e tecido subcutâneo dos animais tratados com LT-IIb e LT-IIc, enquanto a fotomicrografia oriunda de animal tratado com LT-I apresenta intensa infiltração celular nas regiões acima citadas. Não foram encontradas alterações histológicas significantes em biópsia de pele de camundongo inoculado com OVA isoladamente, conforme esperado (**Figura 18**).

Figura 18. Aspecto microscópico do sítio de inoculação 48 h após a injeção intradérmica de diferentes toxinas termo-lábeis. Fêmeas de camundongos C57BL/6 tiveram uma porção da região dorsal tricotomizada (área de aproximadamente 2 cm²) e então receberam por via intradérmica 20 µl de formulações vacinais contendo 50 µg de OVA, 50 µg de OVA + 0,5 µg LT-IIb, 50 µg de OVA + 0,5 LT-IIc ou 50 µg de OVA + 0,5 µg LT-I. Os títulos na região superior das fotomicrografias indicam o tratamento administrado ao animal. Coloração H&E e aumento de 100 x.

A fim de melhor caracterizar os efeitos inflamatórios microscópicos induzidos pela administração intradérmica das diferentes LTs foi realizada uma análise histopatológica nas lâminas oriundas das biópsias tomadas conforme descrito anteriormente. Os parâmetros dermohistopatológicos avaliados estão descritos na **Tabela 2** (seção 3.3.4.3.). A título de comparação são apresentados inicialmente os achados histológicos normais, encontrados na pele de animal inoculado com 20 µl de solução fisiológica a 0,9% (NaCl 0,9%) (**Figura 19**).

Figura 19. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com solução fisiológica (NaCl 0,9%). (A) Magnificação 100 x, (B) Magnificação 200 x, (C) Magnificação 400 x. O material foi coletado 48 h após a inoculação, processado e corado com H&E. A seta branca em (C) indica a estrutura padrão da epiderme (estratigrafia dupla composta por células cúbicas altas), enquanto a cabeça de seta preta apresenta a camada de células mortas (queratinizadas) depositadas na superfície mais externa do tecido.

Os quadros A e B da **Figura 19** apresentam respectivamente: o aspecto geral do tecido cutâneo neste animal (aumento de 100 x) e suas regiões a fim de facilitar a compreensão dos achados histopatológicos encontrados nas demais biópsias. No quadro C da figura nota-se epiderme padrão com duas camadas (estratigrafia dupla), formada por células cúbicas altas em sua maioria (**Figura 19C**, seta branca) e por uma fina camada de queratina superficial anucleada (**Figura 19C**, cabeça de seta preta). A derme (superficial e profunda) apresenta hipocelularidade, representada por fibrócitos típicos, fibroblastos e raros linfócitos. Estão presentes feixes e fibras de colágeno maduro típicos, orientados em disposição padrão (**Figura 19**, quadros B e C) e anexos foliculares e glandulares (sebáceos) sem alterações (**Figura 19**, quadros A e B) com escassa quantidade de capilares dérmicos. Nos quadros A e B da mesma figura podemos observar ainda espessura de derme semelhante a do panículo adiposo (íntegro e com lipócitos maduros e

coesos), além de musculatura esquelética (músculo cutâneo do tronco) em condições normais. Conclui-se portanto que a injeção intradérmica de salina não causa, conforme esperado, quaisquer alterações histológicas no tecido cutâneo.

A **Figura 20** apresenta o aspecto histológico do sítio de inoculação quarenta e oito horas após a injeção intradérmica da toxina LT-I, empregada como controle positivo neste ensaio por induzir um processo inflamatório pronunciado se inoculada por esta via, conforme descrito anteriormente (ZOETWEIJ et al., 2006). Nos animais inoculados com LT-I pela via intradérmica pode-se notar na epiderme alto grau de acantose regular (hiperplasia epidérmica) com estratigrafia epidérmica constituída de 4 camadas de queratinócitos em média (**Figura 20B**, seta branca; **Figura 20C**), comprometimento da relação intercelular com espongiose (edema entre os queratinócitos) de grau moderado, principalmente entre as camadas basais e espinhosas (**Figura 20C**, cabeças de seta), e discreta exocitose linfocítica. Ainda na epiderme nota-se espessamento do estrato córneo e queratinização com presença de núcleos celulares (hiperceratose paraqueratótica discreta a moderada, **Figura 20C**, asteriscos), sem microrganismos. Na derme encontramos edema difuso de moderado a severo grau com dermatite difusa (presença de infiltrado inflamatório), disposta principalmente no terço superior da derme (derme superficial e derme média) com discreta a moderada invasão inflamatória em panículo adiposo e tecido muscular (**Figura 20A**, a região de panículo adiposo encontra-se sob a linha tracejada), não sendo encontradas alterações em unidades folículo-sebáceas (**Figura 20B** e **Figura 20D**). Os achados indicam que, quando administrada por via intradérmica, a toxina LT-I atua como agente agressor, causando uma dermatite de contato aguda com tentativa de remoção do agente causador pelo organismo, evidenciada pela presença de acantose e hiperkeratose da epiderme, além da presença das células inflamatórias em derme.

Figura 20. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com 0,5 µg da toxina LT-I. (A) Magnificação 100 x, a linha tracejada delimita as regiões de derme (porção superior) e panículo adiposo (porção inferior), (B) Magnificação 200 x, (C) Magnificação 400 x, (D) Magnificação 400 x, glândula sebácea em destaque. O material foi coletado 48 h após a inoculação, processado e corado com H&E. A seta branca e as cabeças de seta pretas indicam as alterações dermohistopatológicas denominadas acantose e espongiose, respectivamente enquanto os asteriscos evidenciam o espessamento do estrato córneo.

A **Figura 21** apresenta os achados dermohistopatológicos presentes em biópsia de pele de camundongo obtida 48h após a injeção de 0,5 µg da toxina LT-IIb. Semelhante aos achados dermohistopatológicos encontrados após a inoculação da toxina LT-I, a administração intradérmica da toxina LT-IIb induz hiperkeratose paraceratótica e acantose em epiderme, sendo encontrados no caso da última alteração citada focos com 3 camadas de queratinócitos (**Figura 21A** e **21B**). O grau de espongiose intercelular neste material entretanto é discretamente mais acentuado em comparação ao observado em animais tratados com LT-I (**Figura 20**), podendo ser claramente observado na magnificação de 200x (**Figura 21B**). Em derme nota-se edema difuso de grau moderado a severo e dermatite difusa (**Figura 21A**). Uma característica claramente distinta na comparação desta lâmina com aquela obtida de animal tratado com a toxina do tipo I (**Figura 20**) é o padrão de distribuição do infiltrado inflamatório. Na amostra de animal tratado com LT-IIb as células inflamatórias predominam no terço final da derme (derme média e profunda) (**Figura 21C**), invadindo também camadas subcutâneas (**Figura 21A**).

Figura 21. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com 0,5 µg da toxina LT-IIb. (A) Magnificação 100x, (B) Magnificação 200x, região de derme superficial e média, (C) Magnificação 400x, região de derme média e profunda. O material foi coletado 48h após a inoculação, processado e corado com H&E.

Na **Figura 22** são apresentadas as alterações dermohistopatológicas encontradas na biópsia de pele do animal tratado com 0,5 µg da toxina LT-IIc. Nessa amostra verificamos epiderme acantótica (**Figura 22A**), muito semelhante ao que foi observado após a inoculação de LT-IIb. Em derme nota-se entretanto padrão de dermatite difuso mais profundo, abrangendo claramente derme profunda e pânículo adiposo (**Figura 22B**) com paniculite variando de difusa a septal (paniculite septal: notar a presença de células inflamatórias circundando os adipócitos, cabeças de seta) (**Figura 22C**). O grau de edema nessa lâmina foi compatível com o encontrado em animais tratados com LT-I e LT-IIb. Por fim foram observados ainda nesse material focos de angiogênese em abundância, particularmente em derme profunda (dados não mostrados).

Figura 22. Achados dermohistológicos em biópsia de animal inoculado por via intradérmica com 0,5 µg da toxina LT-IIc. (A) Magnificação 100 x, (B) Magnificação 200 x, região de derme profunda e pânículo adiposo, (C) Magnificação 400x, paniculite septal indicada pelas cabeças de seta. O material foi coletado 48h após a inoculação, processado e corado com H&E.

A avaliação histopatológica de biópsias de pele oriundas de camundongos inoculados por via intradérmica com diferentes toxinas termo-lábeis indica que todos os adjuvantes em teste atuam como agentes agressores, induzindo hiperplasia (acantose) da epiderme em maior ou menor grau, bem como hiperkeratose (espessamento) em estrato córneo. Em todas as biópsias de pele avaliadas foram encontrados infiltrados inflamatórios que divergiram contudo em seu padrão de distribuição de acordo com a toxina empregada como estímulo, localizando-se nas camadas mais superficiais (derme superficial e média) da pele em animais inoculados com LT-I e nas regiões mais profundas da pele (derme média e profunda e pânículo adiposo) em camundongos tratados com as proteínas LT-IIb e LT-IIc.

Como etapa seguinte da avaliação dos efeitos inflamatórios induzidos pela administração intradérmica das diferentes LTs como adjuvantes foram analisados os tipos de células constituintes dos infiltrados inflamatórios presentes no tecido cutâneo. O estudo das populações celulares presentes nos infiltrados inflamatórios foi realizado nas mesmas lâminas anteriormente empregadas para a determinação das alterações dermohistopatológicas induzidas após a administração intradérmica de LT-IIb, LT-IIc ou LT-I, ou seja, lâminas coradas pela técnica de coloração H&E. Para essas análises foi realizada inicialmente a contagem do número total de células presentes no infiltrado inflamatório/campo, seguida da contagem de populações celulares específicas/campo, a saber: neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Os resultados obtidos estão ilustrados na **Figura 23**.

Figura 23. Tipos celulares constituintes do infiltrado inflamatório presente no sítio de inoculação após a injeção intradérmica das toxinas LT-IIb, LT-IIc e LT-I. Camundongos C57BL/6 foram tratados com 0,5 µg de cada toxina por via intradérmica. Dois dias após a inoculação procedeu-se a biópsia do local de injeção, fixação do tecido e confecção de lâminas para microscopia coradas por H&E. Os dados são apresentados como médias ± desvio padrão das contagens realizadas em dez campos/lâmina. $p^*, 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ (ANOVA, teste post-hoc: Tukey). Os dados de animais inoculados com salina foram omitidos já que nestes não se observou infiltrado inflamatório.

De acordo com o ilustrado anteriormente nas fotomicrografias dos sítios de inoculação (**Figura 18**), as três toxinas avaliadas induzem infiltrados com número similar de células inflamatórias totais/campo, com médias variando entre 103 e 123. O maior número médio de células inflamatórias/campo foi encontrado no grupo tratado com LT-I (controle positivo do ensaio) com relevância estatística em comparação ao número de células inflamatórias/campo presente em animais tratados com as toxinas termo-lábeis do tipo II (**Figura 23**). Em relação à contagem de tipos celulares específicos, os neutrófilos são as células predominantes nos infiltrados inflamatórios avaliados, correspondendo a mais de 80% das células presentes/campo. O maior número médio de neutrófilos/campo foi encontrado em animais tratados com a toxina LT-I, com diferença estatística significativa entre o número de neutrófilos/campo neste grupo em comparação aos animais injetados com as LT-IIIs (**Figura 23**). Entre os grupos de camundongos tratados com as LT-IIIs, o maior número médio de neutrófilos/campo foi observado no grupo que recebeu a toxina LT-IIb, com diferença estatística em relação ao grupo tratado com LT-IIc (**Figura 23**). Em animais tratados com salina não foram observados infiltrados celulares conforme ilustrado na **Figura 18** e na **Figura 19**.

Em relação às demais células encontradas nos sítios de inoculação das proteínas, foram encontrados poucos macrófagos, linfócitos e plasmócitos nas lâminas avaliadas, com a soma dessas três populações de células imunológicas representado aproximadamente 20% do total de células inflamatórias/campo (**Figura 23**). Os macrófagos foram encontrados em maior quantidade no sítio de inoculação das toxinas LT-I e LT-IIc (médias de 6,5 e 6,0 células/campo, respectivamente), apresentando diferença estatística em relação ao sítio de inoculação da toxina LT-IIb (média de 3,3 células/campo) (**Figura 23**). O número médio de linfócitos variou de 9 a 12 células/campo sem diferenças estatísticas significativas no número dessas células presentes no sítio de inoculação entre os grupos de camundongos tratados com as diferentes LTs (**Figura 23**). Os plasmócitos, oriundos da diferenciação de linfócitos B, foram as células encontradas em menor número (máximo de 6 e mínimo de 3 células/campo) após a inoculação intradérmica das diferentes LTs como adjuvantes. O número máximo de plasmócitos/campo no sítio de inoculação foi encontrado em animais tratados com a toxina LT-I com diferença estatística em relação aos grupos tratados com LT-IIb ou LT-IIc (**Figura 23**).

Já que os neutrófilos foram as células encontradas em maior abundância no infiltrado inflamatório induzido pela inoculação intradérmica das diferentes LTs e que foram observadas diferenças estatísticas no número dessas células presentes no sítio de inoculação de acordo com a toxina termo-lábil empregada como adjuvante, optamos pela realização de duas outras metodologias que confirmassem de maneira qualitativa e semi-quantitativa os resultados obtidos. A primeira metodologia utilizada consistiu na marcação histoquímica da enzima mieloperoxidase (MPO), presente em grande quantidade nos grânulos azurófilos de neutrófilos, em biópsias de pele obtidas 48 horas após a inoculação intradérmica de 1,0 µg de cada LT. A segunda metodologia consistiu na quantificação dos níveis da mesma enzima em macerados de pele oriundos de camundongos inoculados com as diferentes LTs pela mesma via.

Os resultados da marcação histoquímica para MPO, baseada na reação enzimática desta proteína com o reagente de Hanker-Yates, em biópsias de pele crio-seccionadas obtidas 48 horas após a inoculação intradérmica de 50 µg de OVA (controle negativo) ou de 1,0 µg de cada uma das toxinas testadas são apresentados na **Figura 24**. A partir das micrografias apresentadas nota-se apenas um foco de células positivas para a marcação realizada em um animal não inoculado e localizado próximo aos feixes de fibras musculares mais externos (em destaque no aumento de 100x, apresentado na coluna à direita). Esse resultado era esperado visto que a pele é a primeira barreira física contra o meio externo e abriga várias células do sistema imunológico inato responsáveis pela vigilância contra possíveis agressões (**Figura 24**, animal não inoculado). A injeção intradérmica de um imunógeno qualquer - OVA no caso deste ensaio - leva a um aumento no número de células positivas para a marcação com acúmulo dessa população celular nas regiões de derme profunda e pânículo adiposo. Vale destacar que mesmo quando administrada em grande quantidade (50µg), a proteína OVA não é capaz de induzir edemaciamento na região de inoculação, conforme já descrito anteriormente e explicitado pela comparação do arcabouço tecidual nas micrografias apresentadas para os animais não tratados e inoculados com esta molécula (**Figura 24**, comparar os quadros da marcação em pele de animal não inoculado e animal tratado com OVA).

Figura 24. Marcação para a enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele de animais imunizados com diferentes toxinas termo-lábeis por via intradérmica. Camundongos C57BL/6 foram mantidos sem qualquer tratamento (A) ou inoculados por via intradérmica com 50 µg de OVA (B), 1,0 µg de LT-IIb (C), 1,0 µg de LT-IIc (D) ou 1,0 µg de LT-I (E). Biópsias de pele foram obtidas dois dias após a injeção, fixadas em etanol, crio-seccionadas e submetidas à marcação. A enzima MPO está presente nas células que apresentam coloração marrom, enquanto as demais células do tecido, que não contêm MPO, apresentam-se coradas em azul. As fotos na coluna da direita (aumento de 100 x) representam as áreas em destaque (retângulos) nas fotos da coluna da esquerda (aumento de 50 x). Os resultados apresentados são representativos de três experimentos independentes.

Conforme descrito anteriormente, a administração de todas as LTs testadas leva ao edemaciamento do sítio de inoculação (comparar nas micrografias apresentadas na **Figura 24** a distância entre os anexos cutâneos e a camada muscular) com positividade para a marcação contra a enzima mieloperoxidase. Após a inoculação das LT-IIIs (LT-IIb e LT-IIc) contudo nota-se uma menor positividade da marcação em relação à injeção de LT-I (**Figura 24**), o que corrobora de maneira qualitativa os dados obtidos no experimento de contagem diferencial de células presentes no sítio de inoculação (**Figura 23**). Foram realizadas ainda tentativas de marcação das mesmas células em ensaios de imunohistoquímica e imunofluorescência com biópsias de pele, empregando anticorpo monoclonal específico para o reconhecimento dessa população celular (anti-Ly-6C6G de camundongo), sem resultados satisfatórios (dados não mostrados).

Por fim foi realizado um ensaio para detecção semi-quantitativa da enzima mieloperoxidase em macerados de pele obtidos 48 horas após a inoculação das diferentes LTs. A hemoproteína mieloperoxidase (MPO) é o maior constituinte dos grânulos azurófilos de neutrófilos e representa 5% do peso seco dessas células (KLEBANOFF, 2005), estando presente ainda em macrófagos e monócitos. A mensuração dos níveis de MPO em tecido é empregada como medida indireta da presença de células inflamatórias, principalmente de neutrófilos polimorfonucleares, em tecido inflamado. Os resultados obtidos são apresentados na **Figura 25**.

Figura 25. Níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) em macerados de pele de animais inoculados intradermicamente com diferentes toxinas termo-lábeis. Grupos de camundongos C57BL/6 (n=2) foram tratados pela via intradérmica com salina apenas ou com 1,0 µg de cada uma das toxinas (LT-IIb, LT-IIc ou LT-I). Dois dias após o tratamento os níveis da enzima MPO foram determinados em macerados obtidos a partir de biópsias dos sítios de inoculação. $p < 0,05$, $**p < 0,01$ (ANOVA, teste post-hoc: Tukey).

O menor valor médio de absorbância (3,110), que neste experimento é diretamente proporcional ao nível de MPO no tecido macerado, foi encontrado em animais inoculados com salina, indicando que a migração de neutrófilos para a pele após a administração intradérmica das formulações não está relacionada ao trauma ocasionado (**Figura 25**). Animais inoculados com a toxina LT-IIb por via intradérmica apresentaram absorbância média de 34,875, com relevância estatística em comparação ao grupo de camundongos inoculados com salina (controle negativo do ensaio) (**Figura 25**). A inoculação de LT-IIc pela mesma via gerou o menor valor médio de absorbância entre os grupos de animais injetados com as LTs (15683) e não foi encontrada diferença estatística significativa entre os valores de absorbância apresentados por esse grupo e o grupo tratado com salina (**Figura 25**). Conforme esperado, com base nos resultados dos experimentos anteriormente realizados, o grupo de animais tratados com a toxina LT-I apresentou o maior valor médio de absorbância em macerados de pele (77,993), indicando a presença de um elevado número de neutrófilos no tecido após a inoculação desta toxina, com diferença estatística em relação a todos os demais grupos de animais avaliados no ensaio (**Figura 25**).

Diante dos resultados expostos nessa seção do trabalho pode-se afirmar que a administração intradérmica de quantidades equivalentes das toxinas LT-IIb, LT-IIc e LT-I induz graus distintos dos mesmos fenômenos relacionados a processos inflamatórios, sendo eles: edemaciamento da região de inoculação e infiltração leucocitária. Em comparação à toxina LT-I, amplamente empregada como adjuvante vacinal em ensaios pré-clínicos, as toxinas LT-IIb e LT-IIc apresentam os menores níveis de edemaciamento e migração leucocitária já descritos para LTs nativas quando administradas por via parenteral em camundongos.

4.4 EFEITO ADJUVANTE DAS TOXINAS LT-IIa E LT-IIb EMPREGADAS EM ENSAIOS DE IMUNIZAÇÃO TRANSCUTÂNEA

4.4.1 Determinação da concentração ótima de LT para uso no ensaio de imunização transcutânea empregando adesivos vacinais

Os primeiros ensaios de imunização transcutânea descritos na literatura, aqui descritos como “convencionais”, consistiam na aplicação da formulação vacinal líquida na forma de gota sobre a pele intacta dos animais (GLENN et al., 1998, 1999). O protocolo de imunização transcutânea proposto na presente tese de doutoramento faz uso de adesivos vacinais produzidos no laboratório e conta com uma etapa de ruptura do estrato córneo da pele com o auxílio de papel lixa fino. O uso de adesivos vacinais facilita e otimiza o processo de imunização já que o animal permanece por um curto período (aproximadamente 15 minutos) sob efeito de anestésico e por um longo período (aproximadamente 24h) com a formulação vacinal em contato com a pele.

A dose de CT/LT-I rotineiramente empregada em ensaios de imunização transcutânea convencionais é de 100 µg/animal (OLVERA-GOMEZ et al., 2012; SCHARTON-KERSTEN et al., 2000) entretanto, devido a dificuldade de obtenção das proteínas durante o mestrado, a aluna utilizou 25 µg de cada toxina termo-lábil testada como adjuvante vacinal (LT-IIa e LT-I) associada a 300 µg de OVA, o que afetou a magnitude da resposta imunológica obtida (MATHIAS-SANTOS, 2009). Nos ensaios de imunização transcutânea propostos na tese de doutoramento, a quantidade de antígeno e adjuvante aplicados poderia ser reduzida sem comprometimento da resposta imunológica induzida graças à duas importantes modificações do protocolo: (1) a ruptura do estrato córneo com papel lixa fino e (2) a permanência do adesivo no dorso do animal por 24 (vinte e quatro) horas. Essas modificações facilitam a entrada da formulação vacinal no organismo e a abrasão da pele pode ainda promover a indução de resposta imunológica do tipo celular, em geral ausente ou fracamente induzida quando ensaios de imunização transcutânea convencional são executados (DELL; KOESTERS; GISSMANN, 2006; LIU et al., 2010; NAITO et al., 2007)

A fim de determinar a concentração ótima de toxina termo-lábil a ser empregada nos ensaios de imunização transcutânea com adesivos vacinais, grupos de camundongos BALB/c machos foram imunizados com salina, 20 µg de ovalbumina ou 20 µg de ovalbumina associada a três diferentes concentrações de LT-I: 5 µg, 10 µg ou 15 µg. O protocolo vacinal consistiu na aplicação de duas doses das formulações vacinais com intervalo de quatro semanas entre as

doses. A **Figura 26** apresenta as médias de títulos de anticorpos IgG séricos OVA-específicos encontradas nos grupos experimentais duas semanas após a segunda dose do protocolo de imunização.

Figura 26. Determinação da quantidade de LT a ser administrada como adjuvante em ensaios de imunização transcutânea empregando adesivos vacinais. Grupos de 3 camundongos machos da linhagem BALB/c foram imunizados com duas doses de salina, 20 µg de OVA ou 20 µg de OVA em combinação com 5 µg, 10 µg ou 15 µg de LT-I como adjuvante vacinal, em intervalo de 20 dias entre as doses. Os dados apresentados ilustram as médias de título de IgG sérico anti-OVA determinadas no 35º dia do protocolo de imunização. Os símbolos (***) e (*) indicam relevância estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos grupos imunizados com OVA e OVA + 5µg de LT-I, respectivamente (Teste t, bi-caudal).

Conforme esperado animais imunizados com salina (controle negativo) não apresentaram títulos séricos de IgG OVA-específicos, enquanto os menores títulos de anticorpos anti-OVA foram obtidos no grupo de camundongos que recebeu 20 µg de ovalbumina sem acréscimo de adjuvante (média de título: 6.054). Os três grupos que receberam LT-I como adjuvante vacinal apresentaram aumento dose-dependente, significativamente estatístico, nos níveis de IgG sérico anti-OVA quinze dias após o término do regime de imunização, sendo os maiores títulos de anticorpos IgG sérico OVA-específicos encontrados em animais imunizados com 15 µg da toxina. A comparação das médias de título de anticorpos IgG sérico anti-OVA nos grupos tratados com 10 µg e 15 µg de LT-I indica que não existe diferença estatística entre os dois grupos (médias de títulos de IgG sérico OVA-específico: 182.521 e 197.645, respectivamente).

Com base nos resultados obtidos os ensaios para avaliação do potencial adjuvante de LT-IIa e LT-IIb administradas por via transcutânea foram realizados com doses de 10µg de toxina/animal.

4.4.2 Atividade adjuvante de LT-IIa e LT-IIb em ensaios de imunização transcutânea empregando como antígeno o domínio III da proteína de envelope E (EIII) do vírus dengue tipo 2 (DENV2)

Os primeiros artigos descrevendo o potencial de aplicação de CT e LT-I como adjuvantes por via transcutânea basearam-se na capacidade dessas proteínas em aumentar os níveis de anticorpos contra moléculas co-administradas pela mesma via, como por exemplo o fator de colonização CS6 de *E. coli* e os toxóides tetânico e diftérico (SCHARTON-KERSTEN et al., 2000; YU et al., 2002). Não existem até o momento relatos da aplicação de LT-IIs como adjuvantes por essa via apesar da capacidade de ligação a receptores distintos daqueles utilizados por CT/LT-I que essas moléculas apresentam (ARCE et al., 2005; FUKUTA et al., 1988). Experimentos de imunização transcutânea empregando mutantes de LT-I com capacidade tóxica reduzida (LTR72) ou abolida (LTK63) demonstram que a atividade tóxica da proteína é essencial para obtenção de respostas imunológicas satisfatórias por essa via (TIERNEY et al., 2003). Por esse motivo optamos por empregar nos ensaios de imunização transcutânea as LT-II que apresentam as maiores atividades tóxicas quando avaliadas in vitro: LT-IIa e LT-IIb (ordem decrescente de efeito citotônico) (NAWAR et al., 2010).

Nos experimentos para avaliação do potencial adjuvante das LT-II administradas pela via transcutânea optamos por empregar como antígeno o domínio III da glicoproteína E de envelope do vírus dengue (EIII). Essa decisão foi baseada na ausência de relatos na literatura do emprego de antígenos do vírus dengue em vacinas administradas por via transcutânea aliada à disponibilidade em nosso laboratório deste antígeno e de um modelo desafio murino empregando uma cepa do vírus dengue isolada de paciente e naturalmente letal para camundongos da linhagem BALB/c (AMORIM et al., 2012).

A análise da atividade adjuvante de LT-IIa e LT-IIb administradas por via transcutânea foi realizada em camundongos BALB/c machos que receberam quatro doses das formulações vacinais contendo a proteína EIII (10 µg/animal) como antígeno isoladamente ou na presença das LT-IIs anteriormente citadas ou de LT-I (controle positivo do ensaio) como adjuvantes (10µg/animal), com intervalo de duas semanas entre as doses. A **Figura 27** apresenta a resposta

humoral sistêmica (IgG sérico) EIII-específica gerada nos animais imunizados e monitorada um dia antes da primeira dose (pré-imune) e duas semanas após cada dose do protocolo vacinal (1^a dose: dia 14; 2^a dose: dia 28; 3^a dose: dia 42 e 4^a dose: dia 56, o protocolo vacinal empregado é ilustrado na seção 3.4.1.2).

Figura 27. Resposta humoral sistêmica EIII-específica desencadeada pela administração transcutânea de LT-IIa ou LT-IIb como adjuvantes. (A) Níveis de resposta humoral sistêmica (IgG sérico) EIII-específica duas semanas após cada dose do protocolo de imunização (dias 13, 27, 41 e 55). Os valores séricos de IgG EIII-específico encontrados antes do início das imunizações (dia -1) e nos dias 13 e 27 do protocolo vacinal são apresentados no inserto presente em (A). (B) Resposta humoral sistêmica EIII específica média (barras pretas) e individual (círculos brancos) encontradas duas semanas após a quarta e última dose do protocolo vacinal (dia 55). Grupos de camundondos BALB/c (n=4-5) foram imunizados pela via transcutânea com 10 µg de EIII apenas ou a mesma quantidade do antígeno em associação com 10 µg de cada um dos adjuvantes (LT-IIa, LT-IIb ou LT-I). *p<0,05 (Teste t, uni-caudal).

O monitoramento da resposta imunológica humoral (IgG sérica EIII-reativa) ao longo do protocolo de imunização apresentado na **Figura 27A** demonstra que a detecção de anticorpos EIII-específicos ocorreu primeiro em animais tratados com LT-I como adjuvante e a partir de uma dose de reforço (dia 28, barras cinzas hachuradas, quadro inserido na **Figura 27A**). Nos animais dos grupos EIII, EIII+LT-IIa e EIII+LT-I foi possível detectar resposta imunológica humoral antígeno-específica (IgG sérica EIII-reativa) de maneira dose dependente, com detecção dos anticorpos nos grupos de camundongos tratados com EIII e EIII+LT-IIa somente após a administração de três doses das vacinas (**Figura 27A**). Foi possível observar efeito adjuvante das toxinas LT-IIa e LT-I administradas por via transcutânea, contudo a toxina LT-I (controle positivo) foi aquela que apresentou efeito adjuvante com menor número de doses e induziu os maiores níveis de anticorpos IgG EIII-específicos ao final do protocolo de imunização (**Figura 27A**). Para nossa surpresa a toxina LT-IIb, que foi capaz de atuar como adjuvante para indução de resposta humoral quando administrada por via intradérmica (**Figura 9**), não apresentou efeito adjuvante quando administrada por via transcutânea.

Uma das limitações da técnica de imunização transcutânea é a grande variação nos níveis de resposta antígeno-específica dentro de um mesmo grupo de animais imunizados (MATHIAS-SANTOS, 2009). Acreditava-se que o emprego dos adesivos vacinais influenciaria de maneira positiva esse fenômeno, tornando as respostas obtidas mais homogêneas dentro de um mesmo grupo tratado. Na **Figura 27B** são apresentadas as médias (barras pretas) e os níveis individuais (círculos brancos) de anticorpos EIII-específicos ao final do protocolo de imunização (dia 56). É possível observar que a resposta antígeno-específica varia bastante dentro dos grupos vacinais apesar do emprego de linhagem isogênica de camundongos (BALB/c). A heterogeneidade da resposta interfere no tratamento estatístico dos dados e para o experimento apresentado só foi possível observar incremento estatisticamente significativo na resposta humoral EIII-específica em animais tratados com LT-I como adjuvante pela via transcutânea em comparação ao grupo tratado apenas com o antígeno.

Preconiza-se que a proteção contra a infecção pelo vírus da dengue (DENV) esteja relacionada à presença de anticorpos neutralizantes EIII-específicos capazes de impedir a entrada da partícula viral nas células hospedeiras já que a entrada do DENV em células permissivas depende da interação entre o receptor de membrana da célula eucariota e o domínio III da proteína E (EIII). De fato, ensaios in vitro demonstram que a incubação do vírus na presença de

anticorpos anti-EIII impede a entrada da partícula viral em culturas de células permissivas, demonstrando a capacidade neutralizante desses anticorpos (CRILL; ROEHRIG, 2001).

A fim de avaliar o potencial neutralizante dos anticorpos EIII-específicos, gerados em animais vacinados pela via transcutânea com formulações contendo EIII como antígeno e diferentes LTs como adjuvantes, realizamos o ensaio de soroneutralização *in vivo*. Neste ensaio o vírus DENV2 foi inicialmente incubado por 30 minutos com soros obtidos dos grupos de animais vacinados duas semanas após a 4ª dose (dia 56). Após o período de incubação as misturas (vírus + soro) foram inoculadas por via intracraniana em animais não imunizados. Esses animais foram mantidos em observação por 21 dias a fim de avaliarmos o possível papel protetor dos soros EIII-específicos gerados pela administração transcutânea das formulações vacinais. O resultado do ensaio de soroneutralização *in vivo* é apresentado na **Figura 28**.

Figure 28. Ensaio de soroneutralização *in vivo*. Curva de sobrevivência de camundongos não imunizados e desafiados com a cepa JHA1 de DENV2 previamente incubada com soro de animais imunizados por via transcutânea. Grupos de camundongos BALB/c (n=4) foram desafiados por via intracraniana com uma mistura contendo vírus DENV2 (100 UFP) previamente incubado na presença de soro obtido de animais imunizados por via transcutânea com diluição 1/10. Para esse ensaio foram utilizadas alíquotas de soro obtidas no dia 55 do protocolo vacinal e que correspondem a resposta imunológica humoral induzida duas semanas após a última dose.

Conforme esperado animais inoculados com as misturas soros+vírus contendo os menores níveis de anticorpos EIII-específicos (grupos Salina, EIII e EIII+LT-IIb) foram os primeiros a morrer. Nesses grupos de animais as mortes iniciaram-se oito dias após o desafio, com os últimos integrantes dos grupos evoluindo a óbito nos dias 11 (grupo EIII+LT-IIb) e 13 (grupos Salina e EIII). O grupo de animais inoculado com o vírus incubado com a mistura de soros do grupo

imunizado com EIII+LT-I apresentou uma maior sobrevida após o desafio, com o último integrante do grupo falecendo no 17º dia de acompanhamento. Para o grupo de animais inoculados com a mistura vírus+soro com soro oriundo de animais que receberam LT-IIa como adjuvante o nível de proteção após desafio foi de 50% ao final do tempo de acompanhamento (dia 21). O aumento de sobrevida observado no grupo imunizado com LT-I como adjuvante e a proteção observada no grupo tratado com EIII+LT-IIa não apresentaram contudo relevância estatística frente as curvas de sobrevivência de animais imunizados com salina ou com a proteína EIII isoladamente. Os resultados desse ensaio indicam uma possível capacidade neutralizante de anticorpos anti-EIII gerados em animais imunizados por via transcutânea com as toxinas LT-I e LT-IIa como adjuvantes vacinais.

Uma vez avaliado, isoladamente por meio do ensaio de soroneutralização in vitro, o possível papel neutralizante dos anticorpos EIII-específicos presentes no soro dos animais imunizados pela via transcutânea, optamos por desafiar com o vírus DENV2 também os animais vacinados, já que outras respostas imunológicas desencadeadas pela vacinação (como por exemplo a resposta imunológica do tipo celular) poderiam auxiliar/aumentar a proteção desencadeada pelos anticorpos. A **Figura 29** apresenta as curvas de sobrevivência dos animais imunizados pela via transcutânea com quatro doses das formulações vacinais contendo EIII como antígeno isoladamente ou a mesma proteína na presença das LTs (LT-IIa, LT-IIb ou LT-I) como adjuvantes e desafiados duas semanas após a última dose do protocolo vacinal (dia 57). Não foi possível observar aumento de sobrevida ou proteção nos animais imunizados por via transcutânea e desafiados com a cepa JHA1 do DENV2. Conforme esperado, o grupo imunizado com salina foi o primeiro a perder todos os seus integrantes (dia 10), contudo não há relevância estatística no tempo de sobrevida em relação aos demais grupos. O tempo máximo de sobrevida foi observado em animais imunizados com EIII na presença da toxina LT-I como adjuvante e correspondeu a 15 dias após o desafio. Os resultados do ensaio desafio demonstram que a administração de uma vacina de subunidade contra dengue contando com a proteína EIII como antígeno e diferentes LTs como adjuvantes e administrada por via transcutânea não é capaz de gerar respostas imunológicas protetoras frente a um desafio com o agente etiológico da doença.

Figura 29. Curva de sobrevivência de camundongos imunizados por via transcutânea e desafiados com a cepa JHA1 de DENV2. Grupos de camundongos BALB/c (n=4-5) submetidos à imunização transcutânea com quatro doses das formulações vacinais previamente descritas foram desafiados por via intracraniana com a cepa JHA1 de DENV2 (100 UFP) no dia 56 do protocolo e acompanhados por 21 dias.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho traz importantes contribuições na área de desenvolvimento de adjuvantes vacinais, especificamente em relação àqueles oriundos de microrganismos, aqui representados pelas LT-IIs produzidas por linhagens de ETEC. Nossos resultados demonstram pela primeira vez na literatura a capacidade de LT-IIb e LT-IIc de atuarem como adjuvantes vacinais quando administradas por via intradérmica, induzindo potentes respostas humorais e celulares antígeno-específicas, além de apresentarem menor reatogenicidade em comparação à LT-I administrada pela mesma via. Apresentamos ainda a primeira descrição de uma estratégia vacinal para o controle da dengue baseada em imunização transcutânea com o uso de LT-IIs como adjuvantes vacinais, especificamente LT-IIa e LT-IIb.

A aplicação das LT-IIs nativas empregando a pele como via de inoculação surge como uma alternativa segura de utilização dessas moléculas apesar de sua toxicidade natural e neurotropismo descritos em ensaios de imunização pelas vias oral e nasal, respectivamente (BANERJEE et al., 2002; VAN GINKEL et al., 2005; LEWIS et al., 2009). Além do trabalho aqui descrito, apenas outros dois artigos científicos dedicaram-se a explorar a via intradérmica para administração de formas nativas de LT-IIs. O potencial adjuvante de LT-IIa na indução de respostas imunológicas do tipo humoral e celular, quando inoculada por via intradérmica, foi demonstrado por nós em 2011 (MATHIAS-SANTOS et al., 2011), enquanto no trabalho realizado por Greene et al. (2013) ficou evidenciado o efeito adjuvante de LT-IIb pela mesma via apenas para a geração de anticorpos contra um antígeno co-administrado (ricina). Os resultados apresentados nessa tese de doutoramento indicam que as toxinas LT-IIb e LT-IIc são capazes de atuar como potentes adjuvantes vacinais para resposta imunológica humoral quando administradas por via intradérmica, sendo capazes de gerar anticorpos sistêmicos (IgG sérico) contra o antígeno co-administrado (OVA) quando comparadas à toxina LT-I, um adjuvante que induz respostas imunológicas robustas quando administrado pela mesma via. Apresentamos neste trabalho ainda a primeira análise de geração de resposta imunológica celular (indução de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos) contra um antígeno co-administrado na presença das toxinas LT-IIb e LT-IIc, já que os demais estudos do potencial adjuvante dessas moléculas têm como foco principal a geração de resposta imunológica do tipo humoral (GREENE et al., 2013; NAWAR et al., 2011).

Respostas imunológicas celulares, com destaque para a indução de linfócitos T citotóxicos antígeno-específicos, são fundamentais para o controle de tumores e de infecções mediadas por patógenos intracelulares (PARKIN; COHEN, 2001). A indução desse braço da resposta imunológica é um desafio da vacinologia atual e tem sido difícil encontrar adjuvantes que induzam respostas de linfócitos T CD8⁺ contra antígenos co-administrados (SEDER; HILL, 2000). Nossos resultados demonstram que LT-IIb e LT-IIc são adjuvantes capazes de gerar resposta de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específica com número elevado de células, função efetora preservada e memória. Ficou demonstrado ainda que células T CD8⁺ antígeno-específicas circulantes no sangue periféricos dos animais imunizados são capazes de produzir, e provavelmente secretar, a citocina IFN-gama após re-estímulo *in vitro*. Essa citocina pertence à família dos interferons do tipo II e é um mediador solúvel com atividade antiviral e antiparasítica, além de influenciar mecanismos de toxicidade mediada por células. Detectamos também a presença de CD107a, um importante marcador de degranulação, na superfície dos linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos gerados pela administração de LTs como adjuvantes por via intradérmica. Esses dados são inéditos na literatura e colocam as LTII em um grupo seleto de adjuvantes capazes de estimular respostas citotóxicas após imunização com antígenos solúveis.

Nossos dados indicam ainda uma diferença na cinética de geração de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos de acordo com a LT empregada. A geração dessas células induzida por LT-IIb parece ser mais lenta do que aquela mediada por LT-IIc, que apresenta perfil de indução de linfócitos T CD8⁺ OVA-específicos semelhante ao encontrado após inoculação de uma dose única da toxina LT-I. As diferenças na cinética de geração dessa população celular podem estar relacionadas à ativação e à maturação de células apresentadoras de antígeno mediadas pelas LTs. Por fim a função efetora final dessas células (potencial citotóxico) sobre células-alvo recobertas com um peptídeo MHC-I restrito de OVA foi demonstrada, com todas as toxinas induzindo lise em 80% das células-alvo inoculadas em animais imunizados, independente das diferenças de cinética de geração de linfócitos T CD8⁺ citada acima. A produção de IFN-gama e lise específica por linfócitos T CD8⁺ demonstrados em nosso trabalho são semelhantes às respostas adjuvantes celulares induzidas por LT-I e condizentes com os encontrados anteriormente para LT-IIa empregada como adjuvante por via intradérmica e (MATHIAS-SANTOS et al, 2011).

Uma importante característica que diferencia os dois grupos de LTs é a baixa identidade de aminoácidos de suas subunidades B (<14%) que se reflete na capacidade de interação das toxinas a distintos receptores na superfície das células alvo (JOBLING; HOLMES, 2012). A capacidade de interação com receptores diferentes daqueles reconhecidos por LT-I alavancou as pesquisa pré-clínicas de avaliação do efeito adjuvante de LT-II por via de mucosa (nasal) baseadas em evidências experimentais de direcionamento do antígeno co-administrado na presença de LT-I para o nervo olfatório, dependendo da capacidade de ligação desta toxina ao receptor GM1, e que não ocorria na presença de LT-IIb administrada pela mesma via em camundongos (VAN GINKEL et al., 2005). Avaliações realizadas por nosso grupo contudo demonstram o aumento dos níveis de RNAm de mediadores inflamatórios em tecido nervoso de animais tratados com as diferentes LT-IIs por via nasal, indicando uma possível toxicidade dessas moléculas quando administradas por essa via (RODRIGUES J.F., 2011¹, comunicação pessoal). Diante dessas observações, justifica-se o emprego das LT-IIs como adjuvantes pela via de imunização intradérmica, via de administração pela qual reações locais são facilmente detectáveis, inclusive visualmente.

O forte efeito adjuvante observado após a administração intradérmica de formas nativas das toxinas CT/LT-I é acompanhado de edema pronunciado e migração de células imunológicas para o sítio de inoculação conforme demonstrado em trabalhos realizados anteriormente e endossado por nossos resultados (ENIOUTINA; VISIC; DAYNES, 2000; MCGOWEN et al., 2009; ZOETEWIJ et al., 2006). Em relação à reatogenicidade das LT-IIs, assim como demonstrado anteriormente para LT-IIa (MATHIAS-SANTOS et al., 2011), nossos experimentos indicam que as toxinas nativas LT-IIb e LT-IIc induzem os menores níveis de edema e infiltração leucocitária em comparação à LT-I administrada pela mesma via. A capacidade de LT-IIb de causar edema quando administrada por via intradérmica foi descrita por Greene et al. (2013) e mostrou-se superior àquela induzida por alum administrado pela mesma via. De fato, fotos de animais inoculados com LT-IIb apresentadas no referido trabalho assemelham-se às fotografias obtidas de animais tratados com LT-I nesta tese. As diferenças nos níveis de edema encontradas na comparação entre nossos resultados e os dados obtidos por Greene et al. (2013) podem estar relacionadas às linhagens de camundongos utilizadas já que os resultados foram obtidos em linhagens distintas. Além disso, o trabalho de Greene et al. (2013) não compara os níveis de

¹ RODRIGUES, J. F. Buffalo, 2011.

edema em animais inoculados com LTs dos tipos I e II e sim entre LT-IIb e um mutante pontual dessa toxina (LT-IIb T13I). Em relação à migração leucocitária para o sítio de inoculação as micrografias de pele apresentadas no trabalho de Greene et al. (2013) apresentam características morfológicas semelhantes às aquelas obtidas em nossos experimentos e indicam que, em comparação ao adjuvante alum, a migração leucocitária induzida por LT-IIb é diminuída.

O trabalho de Chen et al. (2012) descreve o potencial reatogênico e o efeito adjuvante após a inoculação intradérmica de agonistas de TLR (moléculas: MPL, CpG 1668, R837), alum (50%), Montanide ISA 720 (70%), e das combinações MPL/CpG, MPL/R837 e MPL/alum ou ainda de MPL e CpG combinados à estimulação com laser após injeção de uma formulação anti-tabagismo. A administração de R837 e das combinações MPL/CpG, MPL/alum e MPL/R837 causaram reações cutâneas severas com ulceração e intensa migração leucocitária para o sítio de inoculação. No trabalho, os melhores resultados em termos de magnitude da atividade adjuvante, foram alcançados no grupo de camundongos tratados com MPL/CpG que apresentou também uma alta reatogenicidade por via intradérmica. Em nosso trabalho a magnitude da resposta imunológica contra o antígeno co-administrado não é diretamente proporcional ao nível de reatogenicidade apresentado pelos adjuvantes já que a toxina com menor potencial inflamatório (LT-IIc) apresenta níveis de resposta humoral e celular antígeno-específicas similares às aquelas desencadeadas pela toxina mais reatogênica (LT-I). A análise dos nossos dados somada aos resultados descritos após o emprego de outros adjuvantes pela via intradérmica indicam que é vantajoso usar LT-IIs nativas como adjuvantes por essa via, já que tais moléculas apresentam menor reatogenicidade com atividade adjuvante preservada em modelo murino.

Os resultados aqui apresentados indicam ser possível dissociar atividade adjuvante e potencial inflamatório de LTs. Trabalhos anteriores demonstram menor reatogenicidade de mutantes de LT-I (LT-I G33D) e LT-II (LT-IIb T13I), defectivos de ligação aos gangliosídeos de membrana utilizados como receptores pelas toxinas, e com atividade enzimática e adjuvante preservadas (GREENE et al., 2013; ZOETEWIJ et al., 2006). Todas as LTs empregadas em nossos ensaios apresentavam atividade enzimática preservada, conforme demonstrado pelas alterações de morfologia induzidas em células Y-1, o que nos leva a inferir que as diferenças de reatogenicidade encontradas podem estar relacionadas à capacidade de interação a receptores distintos reconhecidos por essas moléculas. A ativação de diferentes receptores poderia levar à geração de microambientes de citocinas e células imunológicas com características específicas de

acordo com a LT utilizada. Ensaio empregando mutantes das toxinas LT-I, LT-IIb e LT-IIc ajudariam a elucidar a relação entre perfil de ligação a receptores, efeito adjuvante e potencial inflamatório.

O microambiente gerado no sítio de inoculação após a administração de uma formulação vacinal é de extrema importância na indução de respostas imunológicas inata e também adaptativa. As citocinas e quimiocinas são importantes fatores solúveis secretados por células residentes e transientes do tecido após contato com a vacina e medeiam a migração, maturação e ativação de populações celulares das linhagens granulocítica (neutrófilos, macrófagos, monócitos, células dendríticas) e linfocítica (linfócitos T e B). A avaliação do microambiente gerado após a administração intradérmica das diferentes LTs testadas foi realizada pela mensuração dos níveis dos mediadores solúveis IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , IL-12 (IL-12p70) e da quimiocina MCP-1 presentes no fluido retirado do sítio de inoculação após 24 h. As toxinas administradas por via intradérmica regularam de maneira negativa as citocinas IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-12 (IL-12p), com destaque para LT-IIc e LT-I. Os dados obtidos corroboram a capacidade de regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-8) na presença de LPS *in vitro*, descrita anteriormente na literatura para as LT-IIc e CT (Hajishengallis *et al.*, 2004). Novos estudos fazem-se necessários contudo para demonstrar que a capacidade de regulação negativa de citocinas por LTs se estende às citocinas IL-10, IFN- γ e IL-12. Dentre as citocinas testadas foi possível observar regulação positiva apenas de IL-6, com os maiores níveis da molécula sendo encontrados na pele de animais inoculados com a toxina LT-I. É paradoxal que as LTs, moléculas com potencial inflamatório por via intradérmica aqui demonstrado, tenham efeito distinto sobre mediadores pró-inflamatórios, com regulação negativa de TNF- α e regulação positiva de IL-6, no sítio de inoculação. Com base nos dados obtidos em nosso trabalho não é possível explicar esse fenômeno porém novos estudos realizados em tempos distintos após a inoculação (cinética) ou ainda avaliando outros mediadores solúveis, como por exemplo a citocina IL-17, podem ajudar a elucidar o comportamento observado. Cabe ressaltar que as LTs são reconhecidas por seu potencial para indução da citocina IL-17 quando administradas como adjuvantes por via parenteral ou de mucosa (BRERETON *et al.*, 2011; GOPAL *et al.*, 2014).

Em relação à migração leucocítica para o sítio de inoculação nossos dados demonstram que os neutrófilos representam a maioria das células presentes nos infiltrados. Trabalhos de outros autores dedicados a avaliar as populações de células imunológicas presentes no sítio de

inoculação de adjuvantes vacinais (como por exemplo alum e MF59) encontraram resultados similares aos nossos e demonstram que imunodepleção dessa população celular, capaz de capturar antígenos e migrar para os linfonodos drenantes não tem impacto negativo na atividade adjuvante desses compostos (CALABRO et al., 2011; LU; HOGENESCH, 2013). No entanto, dados da literatura indicam que presença de neutrófilos no sítio de inoculação está relacionada ao sequestro de antígenos diminuindo a oferta destes as APCs e apontam ainda para um efeito direto dessa população celular sobre a capacidade de apresentação de antígenos das células apresentadoras (YANG et al., 2010). Neutrófilos são conhecidos ainda por seu papel no controle de infecções através da liberação de seu conteúdo citoplasmático conhecido como NETs (do inglês Neutrophil Extracellular Traps), que parece ter papel no controle das reações inflamatórias promovendo a degradação de quimiocinas e citocinas (SCHAUER et al., 2014). Diante das inúmeras funções já descritas para essa população celular ensaios de imunodepleção de neutrófilos em animais tratados por via intradérmica com as diferentes LTs seriam de grande valia para determinar qual o real papel dessas células no efeito adjuvante e potencial inflamatório das toxinas termo-lábeis de ETEC. Por hora, os dados obtidos neste trabalho permitem inferir que o menor potencial inflamatório das LT-II_s está relacionado a uma menor migração de neutrófilos para o sítio de inoculação e não tem efeito direto sobre a atividade adjuvante por via intradérmica.

Quanto à severidade, os efeitos adversos relacionados às vacinas podem ser classificados em dois tipos: 1) não severos, divididos em: (i) locais (dor, inchaço no sítio de inoculação, vermelhidão > 5 cm ou outros eventos locais como prurido ou hematoma) que persistam por pelo menos 48 h; (ii) regionais (úlceras, sensibilidade e/ou aumento dos linfonodos, adenite, abscesso no local da injeção) e (iii) sistêmicos (febre ≥ 38 °C ou qualquer evento possivelmente relacionado à vacinação, persistente por mais de dois dias); e 2) severos ou sérios, definidos pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) como aqueles que apresentem um dos seguintes resultados: morte, condição que ameace a vida, hospitalização ou prolongamento de uma hospitalização preexistente, deficiência/incapacidade persistente ou significativa ou ainda anomalia congênita/defeito de nascença (BATISTA-DUHARTE et al., 2014). De acordo com a classificação acima, os efeitos adversos observados por nosso grupo até o momento após a administração intradérmica das LTs testadas são: não severos, locais e regionais e de intensidade variável, relacionada ao tipo de toxina empregada com LT-I induzindo os efeitos mais

proeminentes. O emprego de adjuvantes eficazes com menor potencial reatogênico, representados neste trabalho pelas LT-II_s com destaque para a toxina LT-II_c, aumenta a confiabilidade da população e pode representar maiores níveis de adesão aos protocolos vacinais. Novos estudos contudo fazem-se necessários, inicialmente em outros modelos animais e também em seres humanos (uma vez comprovada a eficácia e segurança em estudos pré-clínicos), a fim de demonstrar a persistência/intensidade dos efeitos adversos aqui descritos em outras espécies animais, além da avaliação de efeitos adversos possivelmente relacionados à administração intradérmica das LTs não contemplados neste trabalho.

A administração de antígenos empregando a pele pode ser realizada ainda pela via transcutânea que baseia-se na simples deposição de antígeno e adjuvante sobre a porção mais externa da pele. Acredita-se que CT/LT-I exercem seus efeitos adjuvantes por essa via graças a sua capacidade de aumentar a permeabilidade tecidual, permitindo assim que moléculas com alto peso molecular alcancem a epiderme, juntamente com sua capacidade de ativação das APCs presentes nesse sítio conhecidas como células de Langerhans (NICOLAS; GUY, 2008). Os trabalhos publicados descrevendo protocolos de imunização transcutânea divergem quanto ao número e intervalo de tempo entre doses, tipo de pré-tratamento da pele antes da aplicação das formulações vacinais e ainda na quantidade de antígeno e adjuvantes administrados, o que dificulta a comparação dos resultados obtidos pelos diferentes grupos de pesquisa e pode explicar a grande variabilidade nos achados. Embora essas variações nos protocolos vacinais possam ser justificadas em muitos casos pela natureza dos antígenos administrados, a maioria dos autores raramente explicita o porquê do delineamento experimental adotado.

A administração transcutânea das proteínas LT-I e LT-II_a foi capaz de induzir a produção sistêmica de anticorpos IgG EIII-específicos dose-dependente. No primeiro grupo citado foi possível detectar anticorpos a partir da segunda dose do protocolo vacinal enquanto animais tratados com EIII na presença de LT-II_a apresentaram incremento nos níveis de anticorpos antígeno-específicos em relação ao grupo tratado com EII apenas (o que configura a atividade adjuvante dessa toxina) apenas após a terceira dose do protocolo. Os dados obtidos neste trabalho corroboram observações anteriores que mostraram os efeitos adjuvantes da LT-II_a por via transcutânea, contudo com menor magnitude em relação à LT-I (MATHIAS-SANTOS, 2009). Vale destacar ainda que os experimentos anteriores basearam-se em outro antígeno (ovalbumina), uma linhagem distinta de camundongo (C57BL/6) e uma maior dose das LTs (25µg/animal).

Os resultados encontrados com a proteína LT-I estão de acordo com resultados recentemente publicados por Davtyan et al. (2014). No trabalho desses autores, que também realizam abrasão do extrato córneo com lixa de papel final, a indução de resposta imunológica antígeno-específica na presença de 10 µg de LT-I (mesma dose empregada em nosso experimento) ocorreu a partir da segunda dose do protocolo vacinal. Neste trabalho fica evidenciada ainda a heterogeneidade das respostas imunológicas desencadeadas pela administração transcutânea, já que 3 de 8 animais (~38% dos indivíduos) foram maus respondedores à administração de LT como adjuvante. Vale lembrar que no trabalho acima citado os adesivos vacinais continham apenas LT-I (adesivos imunoestimulatórios) e foram aplicados após a inoculação de vacinas de DNA por meio da técnica de biobalística. Os resultados já existentes na literatura, bem como os obtidos pelo nosso grupo demonstram as limitações do emprego da imunização transcutânea com destaque para a alta heterogeneidade das respostas obtidas mesmo empregando linhagens isogênicas de camundongos além da alta concentração de antígeno necessária para a indução de respostas imunológicas satisfatórias, especialmente quando se utilizam proteínas purificadas.

Não foi possível demonstrar em nossos experimentos efeito adjuvante da toxina LT-IIb empregada por via transcutânea embora esta proteína apresente atividade adjuvante preservada quando inoculada por via parenteral (via intradérmica) ou nasal (GREENE et al., 2013; MARTIN et al., 2000). Curiosamente, dentre as LTs testadas em nosso trabalho, LT-IIb é aquela com perfil de ligação a receptores mais restrito, ligando-se com alta afinidade ao receptor GD1a e baixa afinidade a GT1b, GM2, GM3, GM1b e GD1α (BERENSON et al., 2010; FUKUTA et al., 1988). As toxinas LT-I e LT-IIa ligam-se com maior afinidade respectivamente aos gangliosídeos GM1 e GD1b, enquanto LT-IIa pode associar-se com menor afinidade ao gangliosídeo GM1 (FUKUTA et al., 1988). A análise dessas informações nos leva a crer que a atividade adjuvante de LTs administradas por via transcutânea está diretamente relacionada à capacidade de interação dessas proteínas com o gangliosídeo GM1 já que dentre as toxinas testadas apenas aquelas que se associam em algum grau a esse receptor demonstraram atividade adjuvante, sendo a toxina com maior afinidade ao receptor (LT-I) capaz de induzir os maiores níveis sistêmicos de anticorpos IgG EIII-específicos. A interação toxina-receptor deve levar a cascatas de ativação de resposta dependentes de outras características da molécula uma vez que em experimentos de imunização transcutânea empregando CT ou peptídeos capazes de se ligar a GM1 os maiores títulos de

anticorpos contra o antígeno empregado (lisozima de ovo de galinha) foram encontrados no grupo de animais tratados com CT como adjuvante (PEACHMAN et al., 2009). O menor potencial adjuvante de LT-IIa poderia estar então relacionado a uma menor afinidade de ligação ao receptor GM1 com consequente menor ativação de vias de sinalização importantes para a magnitude da resposta adjuvante induzida, enquanto a total ineficácia de LT-IIb como adjuvante por essa via estaria relacionada à ausência de afinidade a este gangliosídeo.

As respostas imunológicas desencadeadas pela administração transcutânea de EIII como antígeno vacinal e diferentes LTs como adjuvantes não foi capaz de proteger os animais imunizados frente a um desafio intracraniano com a cepa JHA1 do DENV. Nossos dados conflitam com os resultados de um estudo que emprega vacina de DNA contendo o mesmo antígeno e no qual a proteção após desafio foi de 55% (AZEVEDO et al., 2011). É importante lembrar que no caso das vacinas de DNA a expressão do antígeno é realizada pelas células do hospedeiro eucarioto, permitindo o correto dobramento da proteína e ocorrência de modificações pós-traducionais que podem ser importantes na geração de respostas imunológicas protetoras (AZEVEDO et al., 2011). O antígeno empregado em nosso trabalho foi superexpresso em modelo procarioto (*E. coli*) com posterior redobramento da proteína *in vitro*. O dobramento adequado da proteína pode permitir a exposição de epitopos importantes para proteção e provavelmente ausentes no antígeno empregado neste trabalho, fato que poderia explicar a ausência de proteção aqui demonstrada. Uma segunda diferença importante entre o trabalho de Azevedo et al. (2011) e nosso ensaio desafio são as cepas de DENV empregadas. No primeiro foi utilizada a cepa de DEN2 New Guinea C (NGC) adaptada para que cause letalidade em murinos enquanto a cepa JHA1 empregada em nosso trabalho é naturalmente letal para esses animais (AMORIM et al., 2012). A ausência de proteção encontrada em nosso trabalho poderia estar relacionada portanto a uma maior letalidade da cepa JHA1 de DENV2 claramente evidenciada pela dose de vírus JHA1 empregada em nosso modelo desafio (100 UFP) quando em comparação a quantidade de NGC utilizada no trabalho acima citado (~10.000 UFP). A administração transcutânea de LTs como adjuvantes está usualmente relacionada à geração de respostas do tipo humoral contra antígenos proteicos co-administrados enquanto a entrega de antígenos por biobalística (vacinas de DNA) é conhecida por estimular respostas do tipo Th1, relacionadas à proteção contra patógenos virais em geral. Embora Azevedo e colaboradores (2011) não tenham realizado experimentos que determinassem o braço da resposta imunológica responsável pela

proteção nos animais imunizados, é possível que respostas imunológicas do tipo celular, não avaliadas em nosso trabalho, estejam envolvidas.

Por fim cabe destacar, apesar da ausência de proteção nos animais imunizados pela via transcutânea e desafiados com DENV2, o pioneirismo do trabalho aqui apresentado. Nossos dados demonstram a primeira tentativa de geração de uma vacina contra dengue administrada no sítio de infecção (a pele) e empregando LT-IIs como adjuvantes vacinais. A análise dos resultados indica porém que LT-I é, dentre as LTs nativas, o melhor adjuvante vacinal para emprego por essa via.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho realizou significativos avanços na elucidação do potencial das toxinas termo-lábeis do tipo II como adjuvantes por via intradérmica e transcutânea. Com base nos dados gerados, aliados aos resultados já descritos na literatura, podemos afirmar que as formas nativas das LT-II atuam como potentes adjuvantes por via intradérmica induzindo respostas de anticorpos sistêmicos (IgG) e celular citotóxica (linfócitos T CD8⁺) antígeno específicas. Soma-se ao potencial adjuvante demonstrado para as LT-II por essa via a menor reatogenicidade dessas moléculas com reduzido grau de edema e migração de neutrófilos para o sítio de inoculação em comparação a LT-I. Nossos resultados indicam ainda que o potencial adjuvante das holotoxinas aplicadas por via transcutânea pode estar relacionado à capacidade de ligação ao gangliosídeo de membrana GM1 já que LT-IIb, incapaz de interagir com tal molécula, não apresenta qualquer efeito adjuvante por essa via. O conjunto de dados aqui apresentados abre perspectivas para o emprego das LT-IIs nativas como adjuvantes em vacinas para animais e humanos.

Por fim é importante destacar que parte dos resultados gerados durante a execução deste trabalho incluem-se em um artigo publicado no periódico *Clinical and Vaccine Immunology* no ano de 2011 (APÊNDICE A) e em manuscrito recentemente submetido à publicação na revista *Vaccine* (APÊNDICE B).

REFERÊNCIAS*

- AMORIM, J. H. et al. A genetic and pathologic study of a DENV2 clinical isolate capable of inducing encephalitis and hematological disturbances in immunocompetent mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44984, 2012.
- AMORIM-SANTOS, J. H. **Desenvolvimento de vacinas de subunidades contra a dengue baseadas no domínio III da proteína E e na proteína NS1 recombinantes**. 2012. 79 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ARCE, S. et al. Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and of cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2718–2727, 2005.
- ATTIA, M. A. M.; WEISS, D. W. Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice v. acquired tumor resistance and enhancement in strain a mice infected with mammary tumor virus. **Cancer Research**, v. 26, n. 8 Part 1, p. 1787–1800, 1966.
- AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants. **Frontiers in Immunology**, v. 4, article 114 ,p.1-102013.
- AZEVEDO, A. S. et al. DNA vaccines against dengue virus type 2 based on truncate envelope protein or its domain III. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e20528, 2011.
- BANERJEE, S. et al. Safety and efficacy of low dose *Escherichia coli* enterotoxin adjuvant for urease based oral immunisation against *Helicobacter pylori* in healthy volunteers. **Gut**, v. 51, n. 5, p. 634–640, 2002.
- BARBER, D. L.; WHERRY, E. J.; AHMED, R. Cutting edge: rapid in vivo killing by memory CD8 T cells. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 1, p. 27–31, 2003.
- BARRETTE, R. W. et al. Use of inactivated *Escherichia coli* enterotoxins to enhance respiratory mucosal adjuvanticity during vaccination in swine. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 11, p. 1996–1998, 2011.
- BATISTA-DUHARTE, A. et al. Systemic immunotoxicity reactions induced by adjuvanted vaccines. **International Immunopharmacology**, v. 20, n. 1, p. 170–180, 2014.
- BAZIN, H. A brief history of the prevention of infectious diseases by immunisations. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 26, n. 5-6, p. 293–308, 2003.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

-
- BEHRENS, R. H. et al. Efficacy and safety of a patch vaccine containing heat-labile toxin from *Escherichia coli* against travellers' diarrhoea: a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled field trial in travellers from Europe to Mexico and Guatemala. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 197–204, 2014.
- BELYAKOV, I. M. et al. Mucosal AIDS vaccine reduces disease and viral load in gut reservoir and blood after mucosal infection of macaques. **Nature medicine**, v. 7, n. 12, p. 1320–1326, 2001.
- BERENSON, C. S. et al. Mammalian cell ganglioside-binding specificities of *E. coli* enterotoxins LT-IIb and variant LT-IIb(T13I). **Glycobiology**, v. 20, n. 1, p. 41–54, 2010.
- _____. Ganglioside-binding specificities of *E. coli* enterotoxin LT-IIc: Importance of long-chain fatty acyl ceramide. **Glycobiology**, v. 23, n. 1, p. 23–31, 2013.
- BERRY, L. J. et al. Transcutaneous immunization with combined cholera toxin and CpG adjuvant protects against *Chlamydia muridarum* genital tract infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 2, p. 1019–1028, 2004.
- BRAGA, C. J. M. et al. Parenteral adjuvant effects of an enterotoxigenic *Escherichia coli* natural heat-labile toxin variant. **Immunotherapies and Vaccines**, v. 4, p. 487, 2014.
- BRERETON, C. F. et al. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin promotes protective Th17 responses against Infection by driving innate IL-1 and IL-23 production. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 10, p. 5896–5906, 2011.
- CALABRO, S. et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. **Vaccine**, v. 29, n. 9, p. 1812–1823, 2011.
- CHEN, X. et al. High immunogenicity of nicotine vaccines obtained by intradermal delivery with safe adjuvants. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 159–164, 2012.
- CLEMENTS, J. D.; HARTZOG, N. M.; LYON, F. L. Adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and effect on the induction of oral tolerance in mice to unrelated protein antigens. **Vaccine**, v. 6, n. 3, p. 269–277, 1988.
- CONNELL, T. D. et al. Immunostimulatory activity of LT-IIa, a type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Immunology letters**, v. 62, n. 2, p. 117–120, 1998.
- CRILL, W. D.; ROEHRIG, J. T. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. **Journal of Virology**, v. 75, n. 16, p. 7769–7773, 2001.
- DAVTYAN, H. et al. Immunostimulant patches containing *Escherichia coli* LT enhance immune responses to DNA- and recombinant protein-based Alzheimer's disease vaccines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 268, n. 1–2, p. 50–57, 2014.

-
- DELL, K.; KOESTERS, R.; GISSMANN, L. Transcutaneous immunization in mice: induction of T-helper and cytotoxic T lymphocyte responses and protection against human papillomavirus-induced tumors. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 118, n. 2, p. 364–372, 2006.
- DINIZ, M. O.; FERREIRA, L. C. S.. Biotechnology applied to the development of vaccines. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 19-30, 2010.
- DONTA, S. T.; MOON, H. W.; WHIPP, S. C. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. **Science (New York, N.Y.)**, v. 183, n. 4122, p. 334–336, 1974.
- DONTA, S. T.; TOMICIC, T.; HOLMES, R. K. Binding of class II *Escherichia coli* enterotoxins to mouse Y1 and intestinal cells. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2870–2873, 1992.
- DOUCE, G. et al. Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2821–2828, 1997.
- EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, n. 7, p. 1948–1954, 1967.
- EL-KAMARY, S. S. et al. Safety and immunogenicity of a single oral dose of recombinant double mutant heat-labile toxin derived from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 20, n. 11, p. 1764–1770, 2013.
- ENIOUTINA, E. Y.; VISIC, D.; DAYNES, R. A. The induction of systemic and mucosal immune responses to antigen-adjuvant compositions administered into the skin: alterations in the migratory properties of dendritic cells appears to be important for stimulating mucosal immunity. **Vaccine**, v. 18, n. 24, p. 2753–2767, 2000.
- FENNER, F. et al. **Smallpox and its eradication**. Geneva: World Health Organization, 1988. 1460p.
- FERREIRA, M. A. N. D. **Avaliação da angiogênese, inflamação e crescimento tumoral em camundongos com deleção dos receptores para o PAF (PAFR-KO)**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Fisiologia e Farmacologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2006.
- FUKUTA, S. et al. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa, and LT-IIb. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 7, p. 1748–1753, 1988.
- GAVIN, A. L. et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of Toll-like receptor signaling. **Science**, v. 314, n. 5807, p. 1936–1938, 2006.

- GIULIANI, M. M. et al. Mucosal adjuvant activity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 7, p. 1123–1132, 1998.
- GLENN, G. M. et al. Transcutaneous immunization with cholera toxin protects mice against lethal mucosal toxin challenge. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 161, n. 7, p. 3211–3214, 1998.
- _____. Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins as antigens and adjuvants. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1100–1106, 1999.
- GOPAL, R. et al. Mucosal pre-Exposure to Th17-inducing adjuvants exacerbates pathology after influenza infection. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 1, p. 55–63, 2014.
- GREENE, C. J. et al. LT-IIb(T13I), a non-toxic type II heat-labile enterotoxin, augments the capacity of a ricin toxin subunit vaccine to evoke neutralizing antibodies and protective immunity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e69678, 2013.
- GREGORIO, E. DE; TRITTO, E.; RAPPUOLI, R. Alum adjuvant activity: Unraveling a century old mystery. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 8, p. 2068–2071, 2008.
- GROSS, C. P.; SEPKOWITZ, K. A. The myth of the medical breakthrough: Smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 54–60, 1998.
- GÜEREÑA-BURGUEÑO, F. et al. Safety and immunogenicity of a prototype enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine administered transcutaneously. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 4, p. 1874–1880, 2002.
- GUIDRY, J. J. et al. Role of receptor binding in toxicity, immunogenicity, and adjuvant activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 4943–4950, 1997.
- GUTH, B. E. et al. Production of type II heat-labile enterotoxin by *Escherichia coli* isolated from food and human feces. **Infection and Immunity**, v. 54, n. 2, p. 587–589, 1986.
- HAJISHENGALLIS, G. et al. The type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and their respective B pentamers differentially induce and regulate cytokine production in human monocytic cells. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 11, p. 6351–6358, 2004.
- HOLMES, R. K.; TWIDDY, E. M.; PICKETT, C. L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 3, p. 464–473, 1986.
- ICARDI, G. et al. Current evidence on intradermal influenza vaccines administered by SoluviaTM licensed micro injection system. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 1, p. 67–75, 2012.

- JOBLING, M. G.; HOLMES, R. K. Type II heat-labile enterotoxins from 50 diverse *Escherichia coli* isolates belong almost exclusively to the LT-IIc family and may be prophage encoded. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e29898, 2012.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, n. 5, p. 598–625, 2005.
- LASARO, M. A. et al. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 93–99, 2009.
- LEWIS, D. J. M. et al. Transient facial nerve paralysis (Bell's palsy) following intranasal delivery of a genetically detoxified mutant of *Escherichia coli* heat labile toxin. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e6999, 2009.
- LI, W. et al. Molecular mechanism for the effects of *E. coli* heat-labile enterotoxin on mouse embryo survival. **Reproductive Toxicology**, v. 45, p. 31–38, 2014.
- LIARD, C. et al. Targeting of HIV-p24 particle-based vaccine into differential skin layers induces distinct arms of the immune responses. **Vaccine**, v. 29, n. 37, p. 6379–6391, 2011.
- LIU, L. et al. Epidermal injury and infection during poxvirus immunization is crucial for the generation of highly protective T cell-mediated immunity. **Nature Medicine**, v. 16, n. 2, p. 224–227, 2010.
- LOSONSKY, G. A.; KOTLOFF, K. L.; WALKER, R. I. B cell responses in gastric antrum and duodenum following oral inactivated *Helicobacter pylori* whole cell (HWC) vaccine and LTR192G in *H. pylori* seronegative individuals. **Vaccine**, v. 21, n. 5–6, p. 562–565, 2003.
- LU, F.; HOGENESCH, H. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. **Vaccine**, v. 31, n. 37, p. 3979–3986, 2013.
- MARTIN, M. et al. Comparative analysis of the mucosal adjuvanticity of the type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 1, p. 281–287, 2000.
- MATHIAS-SANTOS, C. **Avaliação das propriedades imunomoduladoras de toxinas termolábeis do tipo II produzidas por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) administradas por via transcutânea**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- MATHIAS-SANTOS, C. et al. Distinctive immunomodulatory and inflammatory properties of the *Escherichia coli* type II heat-labile enterotoxin LT-IIa and its B pentamer following intradermal administration. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 8, p. 1243–1251, 2011.
- MAURICE, J. M. et al. **State of the world's vaccines and immunization**. Geneva: World Health Organization, 2009.

-
- MINISTÉRIO DA SAÚDE; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Manual de Normas de Vacinação. 3ª ed. Brasília: Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde - Ascom, 2001. 72p.
- MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 411–416, 2010.
- MCCLUSKIE, M. J. et al. Mucosal immunization of mice using CpG DNA and/or mutants of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* as adjuvants. **Vaccine**, v. 19, n. 27, p. 3759–3768, 2001.
- MCGOWEN, A. L. et al. The mast cell activator compound 48/80 is safe and effective when used as an adjuvant for intradermal immunization with *Bacillus anthracis* protective antigen. **Vaccine**, v. 27, n. 27, p. 3544–3552, 2009.
- MCKENZIE, R. et al. Transcutaneous immunization with the heat-labile toxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): Protective efficacy in a double-blind, placebo-controlled challenge study. **Vaccine**, v. 25, n. 18, p. 3684–3691, 2007.
- MERRITT, E. A.; HOL, W. G. AB5 toxins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, n. 2, p. 165–171, 1995.
- MIYAJI, E. N. et al. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 6, p. 500–513, 2011.
- MUDRAK, B.; KUEHN, M. J. Heat-labile enterotoxin: beyond GM1 binding. **Toxins**, v. 2, n. 6, p. 1445–1470, 2010.
- NAITO, S. et al. Transcutaneous immunization by merely prolonging the duration of antigen presence on the skin of mice induces a potent antigen-specific antibody response even in the absence of an adjuvant. **Vaccine**, v. 25, n. 52, p. 8762–8770, 2007.
- NAWAR, H. F. et al. Mucosal adjuvant properties of mutant LT-IIa and LT-IIb enterotoxins that exhibit altered ganglioside-binding activities. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1330–1342, 2005.
- _____. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian host. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 11, p. 4705–4713, 2010.
- _____. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family, exhibits potent immunomodulatory properties that are different from those induced by LT-IIa or LT-IIb. **Vaccine**, v. 29, n. 4, p. 721–727, 17 2011.
- NEGRI, D. R. M. et al. Persistence of mucosal and systemic immune responses following sublingual immunization. **Vaccine**, v. 28, n. 25, p. 4175–4180, 2010.

- NICOLAS, J.-F.; GUY, B. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 8, p. 1201–1214, 2008.
- NORTON, E. B. et al. The A Subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin functions as a mucosal adjuvant and promotes IgG2a, IgA, and Th17 responses to vaccine antigens. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 7, p. 2426–2435, 2012.
- OLVERA-GOMEZ, I. et al. Cholera toxin activates nonconventional adjuvant pathways that induce protective CD8 T-cell responses after epicutaneous vaccination. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 6, p. 2072–2077, 2012.
- PARKIN, J.; COHEN, B. An overview of the immune system. **Lancet**, v. 357, n. 9270, p. 1777–1789, 2001.
- PEACHMAN, K. K. et al. Ganglioside GM1 binding peptides: a potential adjuvant for transcutaneous immunization. **Open Immunology Journal**, v. 2, p. 94–102, 2009.
- PICKETT, C. L.; WEINSTEIN, D. L.; HOLMES, R. K. Genetics of type IIa heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*: operon fusions, nucleotide sequence, and hybridization studies. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 11, p. 5180–5187, 1987.
- PIZZA, M. et al. Mucosal vaccines: non toxic derivatives of LT and CT as mucosal adjuvants. **Vaccine**, v. 19, n. 17–19, p. 2534–2541, 21 mar. 2001.
- PLOTKIN, S. A.; ORENSTEIN, W. A.; OFFIT, P. A. **Vaccines**. 5th ed. Saunders, 2008. 1748p.
- RAPPUOLI, R. et al. Structure and mucosal adjuvant activity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. **Immunology Today**, v. 20, n. 11, p. 493–500, 1999.
- REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, v. 19, n. 12, p. 1597–1608, 2013.
- SALMOND, R. J.; LUROSS, J. A.; WILLIAMS, N. A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 4, n. 21, p. 1–16, 2002.
- SCHARTON-KERSTEN, T. et al. Transcutaneous immunization with bacterial ADP-ribosylating exotoxins, subunits, and unrelated adjuvants. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 9, p. 5306–5313, 2000.
- SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. **Nature Medicine**, v. 20, n. 5, p. 511–517, 2014.
- SEDER, R. A.; HILL, A. V. Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 793–798, 2000.

-
- STEPHENSON, I. et al. Phase I evaluation of intranasal trivalent inactivated influenza vaccine with nontoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin and novel biovector as mucosal adjuvants, using adult volunteers. **Journal of Virology**, v. 80, n. 10, p. 4962–4970, 2006.
- TENEBERG, S. et al. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. **Glycoconjugate Journal**, v. 11, n. 6, p. 533–540, 1994.
- TIERNEY, R. et al. Transcutaneous immunization with tetanus toxoid and mutants of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin as adjuvants elicits strong protective antibody responses. **Journal of Infectious Diseases**, v. 188, n. 5, p. 753–758, 2003.
- UESAKA, Y. et al. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. **Microbial Pathogenesis**, v. 16, n. 1, p. 71–76, 1994.
- VAN GINKEL, F. W. et al. Enterotoxin-based mucosal adjuvants alter antigen trafficking and induce inflammatory responses in the nasal tract. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6892–6902, 2005.
- WIIG, H.; AUKLAND, K.; TENSTAD, O. Isolation of interstitial fluid from rat mammary tumors by a centrifugation method. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 1, p. H416–H424, 2003.
- YANG, C.-W. et al. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 5, p. 2927–2934, 2010.
- YU, J. et al. Transcutaneous immunization using colonization factor and heat-labile enterotoxin induces correlates of protective immunity for enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 3, p. 1056–1068, 2002.
- ZOETEWELJ, J. P. et al. GM1 binding-deficient exotoxin is a potent noninflammatory broad spectrum intradermal immunoadjuvant. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 2, p. 1197–1207, 2006.

APÊNDICE A – Artigo publicado

CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Aug. 2011, p. 1243–1251
 1556-6811/11/\$12.00 doi:10.1128/CVI.00012-11
 Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 18, No. 8

Distinctive Immunomodulatory and Inflammatory Properties of the *Escherichia coli* Type II Heat-Labile Enterotoxin LT-IIa and Its B Pentamer following Intradermal Administration[†]

Camila Mathias-Santos,¹ Juliana F. Rodrigues,¹ Maria Elisabete Sbrogio-Almeida,²
 Terry D. Connell,³ and Luís C. S. Ferreira^{1*}

Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil¹; Division of Technological Development, Butantan Institute, São Paulo, Brazil²; and Department of Microbiology and Immunology and Witebsky Center for Microbial Pathogenesis and Immunology, the University at Buffalo, Buffalo, New York³

Received 24 December 2010/Returned for modification 22 March 2011/Accepted 3 June 2011

The type I and type II heat-labile enterotoxins (LT-I and LT-II) are strong mucosal adjuvants when they are coadministered with soluble antigens. Nonetheless, data on the parenteral adjuvant activities of LT-II are still limited. Particularly, no previous study has evaluated the adjuvant effects and induced inflammatory reactions of LT-II holotoxins or their B pentameric subunits after delivery via the intradermal (i.d.) route to mice. In the present report, the adjuvant and local skin inflammatory effects of LT-IIa and its B subunit pentamer (LT-IIaB₅) were determined. When coadministered with ovalbumin (OVA), LT-IIa and, to a lesser extent, LT-IIaB₅ exhibited serum IgG adjuvant effects. In addition, LT-IIa but not LT-IIaB₅ induced T cell-specific anti-OVA responses, particularly in respect to induction of antigen-specific cytotoxic CD8⁺ T cell responses. LT-IIa and LT-IIaB₅ induced differential tissue permeability and local inflammatory reactions after i.d. injection. Of particular interest was the reduced or complete lack of local reactions, such as edema and tissue induration, in mice i.d. inoculated with LT-IIa and LT-IIaB₅ respectively, compared with mice immunized with LT-I. In conclusion, the present results show that LT-IIa and, to a lesser extent, LT-IIaB₅ exert adjuvant effects when they are delivered via the i.d. route. In addition, the low inflammatory effects of LT-IIa and LT-IIaB₅ in comparison to those of LT-I support the usefulness of LT-IIa and LT-IIaB₅ as parenterally delivered vaccine adjuvants.

Cholera toxin (CT) and heat-labile enterotoxins (LTs) produced by *Vibrio cholerae* and by some enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains, respectively, belong to the family of AB (A₁B₅)-type bacterial enterotoxins. The A₁B₅ enterotoxins have an enzymatically active A subunit (28 kDa) that is non-covalently associated to a pentamer composed of five B polypeptides (11.5 kDa each). While the A polypeptide confers the catalytic activity, the B pentamer is responsible for binding to gangliosides and/or galactose-containing surface receptors found on the surface of eukaryotic cells (39). In addition to their roles as virulence determinants directly involved with the watery diarrhea caused by these bacterial pathogens, both CT and LT have received considerable interest due to their remarkable immunomodulatory effects in different mammalian species when they are delivered via parenteral, mucosal, or transcutaneous routes (3, 15, 21, 28, 31, 38, 43).

Based on genetic, biochemical, and immunological features, two major groups of heat-labile enterotoxins have been described (17, 20). Type I enterotoxins produced by ETEC strains share high similarity with *V. cholerae* CT and include the reference LT produced by the H10407 strain (here termed LT-I) while type II enterotoxins (LT-IIa, LT-IIb, and LT-IIc)

are usually isolated from ETEC strains derived from nonhuman hosts (16, 33, 37). Although the A peptides of type I and type II enterotoxins are highly homologous, the two toxin groups differ largely in the B subunit amino acid sequences (<14% sequence identity). The different B subunit sequences reflect, at least in part, differential receptor specificity and some distinct immunological features of type I and type II enterotoxins (1, 5, 20). Indeed, previous studies showed that LT-I binds with high affinity to the GM1 ganglioside and, with lower affinity, to a few other galactose-containing surface components such as GM2, asialo-GM1, GD2, GD1b, and paraglobosides while LT-IIa binds most avidly to the GD1b ganglioside and less strongly to other ganglioside receptors (GT1b, GD2, GD1a, GM1, and GM2) (13, 40). Interestingly, the B pentamer of LT-IIa (LT-IIaB₅), but not the holotoxin, interacts with Toll-like receptor 2 (TLR2) to induce secretion of proinflammatory cytokines (19).

Several reports demonstrated that the adjuvant and immunomodulatory properties of LT-IIa correlate with the presence of a functional B subunit (1, 32, 34). Coadministration of LT-IIa and purified antigens via the nasal route promotes enhanced antigen-specific mucosal (IgA) and systemic (IgG) antibody responses and *in vitro* activation of T lymphocytes (31). In contrast, a receptor-binding-deficient mutant of LT-IIa lost most of the immunomodulatory properties (34). Nonetheless, while a plethora of studies have characterized the adjuvant properties of LT-I when it is delivered via parenteral

* Corresponding author. Mailing address: Vaccine Development Laboratory, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo SP 05508-000, Brazil. Phone: 55 11 30917338. Fax: 55 11 30917354. E-mail: lcsf@usp.br.

[†] Published ahead of print on 15 June 2011.

routes, particularly with the transcutaneous (3) and intradermal (i.d.) (44) routes, there are no reports describing the use of type II heat-labile toxins by these routes of administration.

The intradermal immunization route has some advantages over other routes of administration. In comparison with other parenteral routes, considerably smaller amounts of antigen are required to achieve similar immune responses (11, 14). The increased immunogenicity of antigens delivered via the i.d. route may reflect the high density of immune stimulatory cells, such as Langerhans cells and dermal dendritic cells, which are usually resident in the skin (23). In addition, the i.d. immunization route allows easy and prompt assessment of induced local inflammatory effects. However, when delivered via the i.d. route, LT-I induced intense and persistent inflammatory reactions in mice (44). In contrast, no information is available for the inflammatory effects of LT-II enterotoxins, particularly LT-IIa, when they are administered by the i.d. route.

In the present study, using a mouse model, we investigated the adjuvant properties and inflammatory reactions elicited by LT-IIa and LT-IIaB₅ delivered via the i.d. administration route. Our results demonstrated that, in comparison to LT-I, LT-IIa and LT-IIaB₅ administered by the i.d. route exhibit distinctive immunological and inflammatory properties which may be clinically exploitable.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of LT-IIa and LT-IIaB₅ subunit-encoding genes. To engineer a His-tagged version of LT-IIa, a fragment encoding the *elt* operon (including native promoter sequences, corresponding signal sequences, and structural genes) was PCR amplified from the reference LT-IIa-producing ETEC strain SA53 (kindly provided by Beatriz E. C. Guth, Federal University of São Paulo, SP, Brazil) with two specific primers (5'-GGTAGACATGTTGTTGTGAAAAATTAAAT G-3' and 5'-CGATAGATCTTGACTCTCTATCTAATTC-3'; restriction sites are underlined). Similarly, to obtain a recombinant version of LT-IIaB₅, a fragment encoding the B subunit of LT-IIa, including its signal sequence, was PCR amplified with two specific primers (5'-GCATGGAGAAAGACATGCTCT AAG-3' and 5'-CGATAGATCTTGACTCTCTATCTAATTC-3'; restriction sites are underlined). The amplified products were cloned into the *NcoI* and *BglIII* sites of the Qiagen pQE60 vector resulting in the recombinant pQESDLT-IIa or pQELT-IIaB₅ plasmid encoding LT-IIa or LT-IIaB₅, respectively. The resulting recombinant proteins were expressed as B subunit C-terminal His tag fusion proteins.

Purification of the recombinant LTs. LT-I was purified from recombinant *E. coli* DH5 α harboring pML19 (26). Crude protein extracts were resolved by affinity chromatography using immobilized D-galactose-containing resin (Pierce, Rockford, IL), as previously described (41). LT-IIa and LT-IIaB₅ were purified from recombinant *E. coli* XL1 Blue that had been transformed with pQE60SDLT-IIa and pQE60LT-IIaB₅, respectively. Cells were cultivated at 37°C with vigorous shaking (200 rpm) in Luria-Bertani broth supplemented with ampicillin (100 μ g/ml). Expression of the recombinant proteins was achieved by addition of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG; 0.3 mM) to mid-log-phase cells (optical density [OD] of ~0.5 to 0.6). After 4 h of incubation, cells were harvested, suspended in phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4), and disrupted in a high-pressure homogenizer at a pressure of 6,000 lb/in² (Artpeças, Brazil). Insoluble cell debris was removed by centrifugation at 10,000 $\times$ g for 30 min at 4°C. Recombinant LT-IIa and LT-IIaB₅ were purified by means of affinity chromatography using nickel-loaded resin (GE Healthcare, Sweden). In addition, size exclusion chromatography performed in a HiLoad 16/60 Superdex 75 prep-grade column (Amersham Biosciences, United Kingdom) was employed to separate the holotoxin from residual amounts of B subunit pentamers. All purification procedures were performed using an AKTA fast protein liquid chromatography (FPLC) system (GE Healthcare). The purity of the recombinant proteins was confirmed by SDS-PAGE and immunoblotting using rabbit polyclonal antibodies generated against LT-IIa. Protein concentration was determined spectrophotometrically using the Edelhoch method (10) according to the following formula: concentration (mg/ml) = (absorbance at 280

nm/ε280 nm) $\times$ molecular mass (Da), where ε280 nm represents number of tryptophans $\times$ 5,690 + number of tyrosines $\times$ 1,280. The level of contaminating endotoxin was determined in each recombinant protein sample by the *Limulus* amoebocyte lysate method (Lonza, Walkersville, MD). The endotoxin amounts were lower than 3,000 endotoxin units (EU)/mg of purified protein, which correspond to $\leq$ 1.5 endotoxin units per dose.

Intracellular cAMP concentration. Mouse Y-1 adrenal tumor cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Cultiab, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Laboratories, Grand Island, NY). Ninety-six-well round-bottom plates were seeded with 5×10^4 cells/well cultivated to near confluence at 37°C in 5% CO₂-containing atmosphere. One microgram of each toxin was treated with 10 ng of trypsin in TEAN (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 3 mM NaN₃, and 0.2 M NaCl, pH 7.4) at 37°C for 45 min and then added to each well. At 1, 2, and 3 h after toxin addition, cells were submitted to lysis, and the cyclic AMP (cAMP) concentration was measured with an Amersham cAMP enzyme immunoassay (EIA) system (Amersham Life Science, United Kingdom). The cAMP concentrations (pmol/ml) were calculated according to the manufacturer's instructions.

GD1b-binding assay. Binding of LT-IIa and LT-IIaB₅ to the GD1b ganglioside receptor was performed as previously described (36) with some modifications. Briefly, polyvinyl 96-well enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Polisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated overnight at room temperature with 2 μ g/ml GD1b (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) in PBS (100 μ l/well). After washings and a blocking step with 200 μ l/well of 0.1% bovine serum albumin (BSA) in PBS containing 0.05% Tween (PBS-T-0.1% BSA), aliquots (corresponding to 1.12 pM) of native or heat-denatured (100°C for 30 min) LT-IIa and LT-IIaB₅ were added to wells in a final volume of 100 μ l and subsequently serially 2-fold diluted. Plates were incubated for 2 h at room temperature, washed, and added with 100 μ l/well of rabbit anti-LT-IIa hyperimmune serum (diluted 1:500 in PBS-T-0.1% BSA). Plates were incubated for another 1.5 h at room temperature, washed, and reacted with PBS-T-0.1% BSA-diluted (1:3,000) horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma Aldrich) incubated for 90 min at room temperature. After a final washing step, color reactions were developed with *o*-phenylenediamine and H₂O₂. After 20 min at room temperature, the reactions were interrupted by the addition of 2 M H₂SO₄ (50 μ l/well), and the OD at 492 nm (OD₄₉₂) was measured in a microplate reader (Multiskan EX; ThermoLabsystems, Finland).

Mice intradermal immunizations. Female C57BL/6 mice aged 8 to 12 weeks were obtained from the Isogenic Mouse Breeding Facility of the Department of Parasitology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP). All animal experiments were approved by the laboratory's Animal Care and Ethical Use Committee from the Institute of Biomedical Science at USP, in accordance with Brazilian code. Animals were subjected to light anesthesia with a solution containing 75 mg/kg of ketamine and 10 mg/kg of xylazine, shaved on the dorsum, and rested for 48 h before each immunization procedure. Mice were i.d. inoculated with 20- μ l aliquots containing saline (negative control), 100 μ g of ovalbumin (OVA) diluted in saline (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), or OVA diluted in saline containing 0.5 μ g of LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅. The immunization regimen consisted of three doses administered at 2-week intervals. Blood was obtained from the retro-orbital plexus 1 day before each inoculation (days 0, 14, and 28) and 2 weeks after the last dose (day 42). Sera obtained from the blood were stored at -20°C. Two weeks after the last immunization, inguinal draining lymph nodes (DLNs) were excised, processed, and immediately pooled for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISPOT) assays. Spleens were surgically removed and processed, and cells were either immediately pooled for cell culture assays or treated individually for ELISPOT assay and for *in vivo* cytotoxic CD8⁺ T lymphocyte analysis.

Quantification of antibodies by ELISA. Anti-enterotoxin and anti-OVA serum IgG titers were determined by conventional ELISA (12). Serum anti-enterotoxin IgG and anti-OVA IgG titers were measured using polyvinyl 96-well enzyme-linked immunosorbent assay plates (Nunc) that had been coated with LT-I, LT-IIa, LT-IIaB₅ (1 μ g/ml), or OVA (10 μ g/ml) diluted in PBS. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse against total IgG (Sigma Aldrich) was employed at a final dilution of 1:3,000. Assays were performed using duplicate samples, and assays were repeated at least in triplicate. Results are expressed as titers, defined as the highest sample dilution with an OD₄₉₂ of $\geq$ 0.2 above preimmune sera.

Secreted cytokine measurements. For evaluation of cytokine production, spleen cells were harvested from animals euthanized 2 weeks after the immunization protocol (44). Spleen cells from mice of the same immunization group were pooled (1×10^7 viable cells/ml) and cultured in a CO₂-containing atmosphere at 37°C in the presence or absence of OVA (5 μ g/ml), the OVA class I (K^b)-restricted CD8⁺ T cell epitope synthetic peptide (₂₅₇SIINFEKL₂₆₄; here

FIG. 1. Purification and biological activities of LT-IIa and LT-IIaB₅. (A) SDS-PAGE of LT-IIa and LT-IIaB₅ purified by nickel affinity chromatography. Lane 1, LT-IIa (2.5 µg); lane 2, LT-IIaB₅ (1.7 µg); M, PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas). (B) Kinetic of cAMP accumulation in Y-1 cells exposed to trypsin-activated LT-I (□) or LT-IIa (●). One representative of three experiments is shown. Values are indicated as means ± standard errors of the means. (C) GD1b-binding of recombinant LT-IIa and LT-IIaB₅. Equimolar amounts of purified LT-IIa (●) and LT-IIaB₅ (▲) under nondenaturing conditions or LT-IIa (□) and LT-IIaB (△) after incubation at 100°C for 30 min were tested for GD1b-binding by ELISA. One representative of two experiments is shown. Values are indicated as means ± standard deviations.

termed OVA₂₅₇₋₂₆₄), or the OVA class II (I-A^b)-restricted CD4⁺ T cell epitope synthetic peptide (265TEWTSSNVMEERKIKV₂₈₀, denoted OVA₂₆₅₋₂₈₀) (1.2 µg/ml). Cell culture supernatants were recovered after 48 h, and the concentrations of gamma interferon (IFN-γ), interleukin-5 (IL-5), and IL-10 were determined using purified recombinant mouse cytokines (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) for standard curves according to the manufacturer's instructions.

ELISPOT assays. An IFN-γ-secreting ELISPOT assay was performed to detect activated CD8⁺ T lymphocytes responding to the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (7). Two weeks after the immunization regimen, cells from spleens or DLNs of vaccinated mice were plated (5 × 10⁶ cells/well) in quadruplicate on Multi-Screen-HA 96-well membrane plates (Millipore, Bedford, MA) previously coated with 10 µg/ml of rat anti-mouse monoclonal antibody (MAb) specific to IFN-γ (BD Biosciences Pharmingen). Cells were cultured for 24 h at 37°C in an atmosphere containing 5% CO₂ in the presence or absence of the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide (1 µg/ml). After this period, cells and reagents were removed by washing, and the plates were incubated with biotinylated anti-mouse IFN-γ MAb (BD Biosciences Pharmingen) at a final concentration of 2 µg/ml at 4°C. After 16 to 18 h, plates were washed again and incubated with diluted peroxidase-conjugated streptavidin (Sigma Aldrich). The immunoreactive spots were developed using diaminobenzidine (DAB) substrate (Sigma Aldrich) and counted with a stereomicroscope.

In vivo cytotoxic activity of CD8⁺ T lymphocytes. The *in vivo* cytotoxic activity of CD8⁺ T cells in OVA₂₅₇₋₂₆₄-pulsed spleen cells was determined (2). Splenocytes from naive mice were labeled with 0.5 µM or 5 µM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) for 15 min at 37°C. The cell population stained with 5 µM CFSE was incubated with the OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) peptide for 40 min at 37°C. After this period, both cell populations (0.5 µM CFSE-labeled and 5 µM CFSE- and OVA₂₅₇₋₂₆₄-labeled cells) were intravenously (i.v.) injected (2 × 10⁷ cells of each preparation) into immunized mice. On the following day, the inoculated animals were euthanized, and individual spleen cells were collected and homogenized for isolation of single cells. The percentages of specific-cell killing were calculated by the relative reduction of peptide-pulsed cells relative to the nonpulsed cells (7).

Skin permeability test. To evaluate the degree of skin permeability induced by i.d. administered enterotoxins, the rate of diffusion of blue dextran (mass, 2,000,000 Da) (Sigma Aldrich) from the site of inoculation was determined. Briefly, groups of mice (*n* = 4 or 5) were i.d. injected with a saline solution containing 12.5% (mass/vol) of blue dextran in the presence or absence of 6.0 EU (600 pg) of lipopolysaccharide (LPS) from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Sigma Aldrich) or 0.5 µg of LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅ in a final volume of 20 µl. The diameters of the diffused dye areas in the skin were measured using calipers for up to 2 days.

Measurement of swelling area (edema) and skin histology. Groups of mice (*n* = 4 or 5) were i.d. injected with saline or with a saline solution containing 6.0 EU (600 pg) of LPS from *S. enterica* serovar Enteritidis (Sigma Aldrich) or 0.5 µg of LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅. The injection site was inspected regularly for redness and swelling for a period of 7 days after injection. The diameter of local skin swelling (edema) was measured daily. Additionally, groups of mice (*n* = 4) were i.d. inoculated with 0.5 µg of LT-I or LT-IIa either untreated or previously

incubated with specific anti-LT-I or anti-LT-IIa polyclonal antibodies (anti-LT titers of approximately 10⁵ diluted (1/20) in saline or 0.25 µg of the cognate receptors (GM1 or GD1b, respectively) diluted in saline for 1 h at 37°C. Two days following the i.d. administration, the injection site was inspected as described above. Full-thickness skin biopsy specimens of animals treated with saline or each recombinant protein were collected at the site of injection 2 days after inoculation. Biopsy specimens were fixed in 10% formaldehyde and sectioned. Sections placed on glass slides were stained with hematoxylin and eosin. Stained slides were inspected under an inverted microscope (Axiocvert 200; Zeiss, Germany), and representative fields were photographed.

Statistical evaluations. Data were compared using analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test. *P* values of <0.05 were considered to be indicative of statistical significance.

RESULTS

Purification and *in vitro* characterization of the recombinant LT-IIa and LT-IIaB₅. Recombinant LT-IIa and LT-IIaB₅ were engineered with histidine tags at the carboxyl end of the B monomers. The recombinant LT-IIa and LT-IIaB₅ were recovered in apparent homogeneity (Fig. 1A) with preserved antigenicity, as demonstrated by reactivity with rabbit polyclonal antibodies generated with LT-IIa (data not shown). Functional analyses of the recombinant proteins were carried out by cAMP accumulation in Y-1 cells and GD1b-binding experiments. Trypsin-activated LT-IIa and LT-I showed similar cAMP-inducing activity (Fig. 1B). As expected, only residual cAMP-inducing activity was detected in cells incubated with LT-IIaB₅ (data not shown). Similarly, recombinant LT-IIa and LT-IIaB₅ bound to GD1b-coated plates with similar affinities while samples boiled for 30 min did not exhibit detectable GD1b-binding activity (Fig. 1C).

Immunogenicity and humoral adjuvant effects of intradermally delivered LT-IIa and LT-IIaB₅. To evaluate the i.d. adjuvant activity of LT-IIa and LT-IIaB₅, C57BL/6 mice were immunized and boosted twice with 100 µg of OVA in the presence of LT-IIa or LT-IIaB₅ (0.5 µg/dose). Anti-OVA (adjuvant activity) and anti-LT (immunogenicity) serum antibody responses were measured 2 weeks after each immunization dose. As a positive control, a mouse group was immunized with OVA in the presence of LT-I (0.5 µg/dose). After the primary immunization and first boost, anti-LT-I serum IgG titers were significantly higher than the anti-LT-

FIG. 2. Immunogenicity and adjuvant effects of LT-I, LT-IIa, and LT-IIaB₅ after i.d. administration to mice. C57BL/6 mice were immunized with saline (sham), OVA (100 µg), or OVA combined with 0.5 µg of LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅ as vaccine adjuvants on days 0, 14, and 28. Individual serum samples were collected 2 weeks after each immunization dose and tested for anti-LT (A) and anti-OVA (B) serum IgG titers. Each experiment was repeated at least twice, and antibody titer values represent means $\pm$ standard errors of the means of individual serum samples of each immunization group ($n = 5$) in one of two independently performed experiments. Individual anti-LT (C) and anti-OVA (D) serum IgG titers were detected in mice immunized with saline (sham), OVA, or OVA plus LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅ 2 weeks after the third dose (day 42). Data are based on two separate immunization tests ($n = 10$). The bars represent the mean antibody titers detected in sera of animals subjected to the different immunization regimens. Brackets indicate pair comparison of statistically significant differences observed among the tested immunization groups. *, $P < 0.05$.

IIa and anti-LT-IIaB₅ serum IgG titers (Fig. 1A). After the second boost, the serum anti-LT IgG titers in mice immunized with LT-I were elevated in comparison to the titers of mice immunized solely with LT-IIa. Yet both values differed significantly from the anti-LT serum IgG titers detected in mice immunized with LT-IIaB₅ (Fig. 2A and C). Representation of individual serum anti-LT IgG responses detected at day 42 in mice submitted to the complete immunization regimen clearly demonstrated that mice immunized with LT-IIaB₅ developed significantly lower anti-LT titers than mice immunized with either LT-I or LT-IIa (Fig. 2C).

Intradermal administration of OVA and LT-I or LT-IIa revealed clear adjuvant effects on the induced serum anti-OVA IgG responses with regard to mice immunized only with OVA (Fig. 2B). Mice immunized with OVA and LT-IIaB₅ elicited enhanced serum anti-OVA IgG titers after the first and second i.d. doses. The differences, however, did not attain statistical

significance after the third dose. Analysis of individual results and inclusion of a larger number of immunized animals revealed that, after the second boosting dose, mice immunized with LT-IIaB₅ showed variable results, and approximately 70% of the vaccinated mice elicited enhanced anti-OVA IgG responses in comparison to mice immunized with the antigen without adjuvant (Fig. 2D).

T cell adjuvant effects. To determine whether the i.d. administration of LT-IIa or LT-IIaB₅ would enhance T cell responses, spleen cells collected from vaccinated mice and *in vitro* stimulated with purified OVA were evaluated for secretion of specific cytokines. Determination of the IFN- γ /IL-5 ratios suggested that mice immunized with LT-I or LT-IIa elicited a mixed Th1/Th2 response pattern with values of 10.4 and 45.6, respectively, while mice immunized with LT-IIaB₅ showed a lower ratio (2.2) (Fig. 3A). The amounts of IFN- γ secreted by cells from mice immunized with OVA plus LT-I or LT-IIa were higher than the amount detected in mice immunized with OVA alone or with OVA in combination with LT-IIaB₅ (Fig. 3A). A similar secretion pattern was also observed when the IL-10 levels were determined in cells collected from mice submitted to the different immunization regimens (Fig. 3D). On the other hand, the levels of secreted IL-5 were relatively higher in cultures of cells derived from mice immunized with OVA in combination with LT-I or with OVA in combination with LT-IIaB₅ (Fig. 3C).

To determine the T cell populations mainly involved in cytokine secretion following incubation with the target antigen, spleen cells collected from immunized mice were incubated with synthetic peptides corresponding to the dominant major histocompatibility complex class I (MHC-I)-restricted T CD8⁺ epitope (OVA₂₅₇₋₂₆₄) or the MHC-II-restricted T CD4⁺ epitope (OVA₂₆₅₋₂₈₀) recognized by C57BL/6 mice. The data demonstrated that IFN- γ was mainly produced by cells incubated with the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. IL-5, however, was preferentially secreted by cells following stimulation with the OVA₂₆₅₋₂₈₀ peptide (Fig. 3B and C). Finally, smaller amounts of IL-10 were detected in culture supernatants of cells incubated with either OVA₂₆₅₋₂₈₀ or OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide than in culture supernatants of cells incubated with only purified OVA (Fig. 3C and D). These results indicated that LT-I, LT-IIa, and, to a lesser extent, LT-IIaB₅ activate secretion of both Th1- and Th2-associated cytokines produced commonly by CD4⁺ T cells and by CD8⁺ T cells.

Activation of OVA-specific cytotoxic CD8⁺ T cell responses. Activation of antigen-specific cytotoxic CD8⁺ T cell responses was measured in mice that had been i.d. immunized with LT-IIa or LT-IIaB₅. The total numbers of IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells derived from spleens or inguinal draining lymph nodes (DLNs) were determined following *in vitro* stimulation with the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. LT-I and LT-IIa, but not LT-IIaB₅, induced similar activation patterns of splenic and DLN-derived CD8⁺ T cells as measured following stimulation with OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Fig. 4A). As an alternative approach to confirm the T cell adjuvant effects of i.d. delivered LT-IIa or LT-IIaB₅, we determined the *in vivo* cytotoxic activity of activated OVA-specific CD8⁺ T cells. Briefly, mice submitted to the different immunization regimens were i.v. administered with naive spleen cells fluorescently labeled and either untreated or pre-incubated with the OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide. After 18 h, the pres-

FIG. 3. Secretion of IFN- γ , IL-5, and IL-10 produced by spleen cells collected from i.d. immunized mice after stimulation with purified OVA or synthetic peptides corresponding to specific MHC-I- or MHC-II-restricted OVA-derived epitopes. (A) IFN- γ /IL-5 ratios detected in mice submitted to different immunization regimens. Ratios are indicated at the top of the figure. The values indicated by bars represent IFN- γ and IL-5 concentrations in culture supernatants of splenic cells *in vitro* stimulated with whole purified OVA. Amounts of secreted IFN- γ (B), IL-5 (C), and IL-10 (D) in spleen cells of immunized mice following stimulation with the whole OVA protein, OVA₂₆₅₋₂₈₀ CD4⁺ T cell-restricted epitope, or the OVA₂₅₇₋₂₆₄ CD8⁺ T cell-restricted epitope are shown. Cells were stimulated *in vitro* with purified OVA (5 μ g/ml) or 1.2 μ g/ml of each peptide during 48 h; the culture supernatants were harvested, and specific cytokine levels were measured by ELISA. Results are based on one representative data set of two independent experiments.

ence of unpulsed and peptide-pulsed target cells was measured in the spleens of individual mice using cytometer analyses. Clearly, mice that were immunized with LT-I (56% specific cell lysis) or LT-IIa (59% specific cell lysis) mounted statistically significantly elevated CD8⁺ T cell cytotoxic responses in comparison to mice immunized only with OVA or to mice coimmunized with OVA and LT-IIaB₅ (Fig. 4B). These results demonstrated that LT-IIa, but not LT-IIaB₅, exhibited strong CD8⁺ T cell adjuvant effects following i.d. administration in the mouse model.

Skin permeability and edema. Tissue permeability effects induced by CT and LT, particularly at mucosal epithelia, have been reported to have a relevant role in the observed adjuvant properties of these two enterotoxins (22, 30, 42). To determine if the distinct adjuvant effects of LT-IIa and LT-IIaB₅ could be explained, at least in part, by effects on skin permeability, mice were i.d. injected with a fixed amount (0.5 μ g) of either LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅ that had been admixed with dextran blue, a high-molecular-weight glucose polymer-containing dye that

does not commonly diffuse into the dermis. In contrast to mice inoculated only with dextran blue, mice inoculated with LT-I or LT-IIa displayed a clear diffusion of the dye around the injection site. Animals injected with LT-I, however, exhibited a larger amount of diffusion of the dye at time points of 10 h and 30 h. In contrast, no tissue permeability effects were evident in mice inoculated with LT-IIaB₅ (Fig. 5A).

It was deemed feasible that a small amount of LPS in the purified enterotoxins could have elicited the effects on diffusion. Thus, to determine if the presence of residual LPS induced similar effects, the experiments were repeated using purified *Salmonella* Enteritidis LPS at a level that was 4-fold higher in concentration than that measured in the LT preparations containing the largest amount of LPS contamination. No dye diffusion was observed in mice treated with purified LPS (Fig. 5A). Furthermore, mice treated with heat-treated LT-I and LT-IIa failed to induce permeability effects, thus providing more evidence that the effects on permeability by the enterotoxins was not stimulated by residual LPS in the stocks

FIG. 4. Activation of CD8⁺ T cell responses in mice i.d. immunized with OVA and LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅. (A) Cells collected from spleens (SP) and pooled inguinal DLNs from mice i.d. immunized with three doses of OVA alone (white bars) or coadministered with LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅ were *in vitro* stimulated 24 h in the presence of the MHC-I-restricted CD8⁺ T cell-specific peptide (OVA_{257–264}). The numbers of IFN-γ-secreting cells were determined by ELISPOT assay. Values represent means ± standard errors of the means. Data are representative of two independent experiments. (B) *In vivo* cytotoxic activity of OVA-specific activated CD8⁺ T cells generated in mice subjected to the different i.d. immunization regimens. Two weeks after the last dose, immunized mice were i.v. injected with OVA_{257–264}-pulsed and nonpulsed CFSE-stained spleen cells from naïve mice. The *in vivo* cytotoxic activity induced in immunized mice was determined based on the reduction in the number of OVA_{257–264}-pulsed cells with regard to cells not pulsed with the peptide as described in the Materials and Methods section. The results represent the percentage of specific cell lysis observed 24 h after the i.v. administration of the CFSE-stained cells. The experiment was repeated three times, and data represent mean ± standard deviations of each immunization group (*n* = 5). Significantly different values (*P* < 0.05) with regard to mice immunized with OVA alone are indicated (#).

(data not shown). These results indicated that both LT-I and LT-IIa have skin permeability effects when they are i.d. administered in the mouse model.

LT-I or CT induces strong inflammatory reactions when administered via the i.d. route (11, 44). To determine if LT-IIa or LT-IIaB₅ had the capacity to induce similar inflammatory reactions, mice were i.d. administered with the toxins, and the amounts of edema and self-limited induration were evaluated at the site of inoculation (Fig. 5B). Animals injected with LT-IIa developed mild inflammatory effects. In contrast, mice receiving LT-IIaB₅ developed no visible symptoms of inflam-

mation (Fig. 5B). The mild swelling (with no visible erythema and less induration) observed in mice receiving LT-IIa vanished after 4 days (Fig. 5B). Mice i.d. inoculated with LT-I, however, developed a strong inflammatory reaction at the site of inoculation, including development of extensive edema and local induration that persisted for at least 7 days (Fig. 5B). Administration of purified LPS at a concentration at least 4-fold higher than concentrations detected in the LT preparations did not induce detectable inflammatory reactions (Fig. 5B). Similarly, mice treated with boiled LT preparations did not develop inflammation symptoms (data not shown). Incu-

FIG. 5. Skin permeability and swelling reaction observed in mice i.d. inoculated with purified LPS, LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅. (A) Skin permeability was measured after the i.d. injection of dextran blue (12.5% wt/vol) alone or admixed with 6.0 EU of purified LPS or with 0.5 μg of LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅. Dye diffusion was measured every 10 h in the course of 2 days after administration. Significantly different values (*P* < 0.05) between mice i.d. injected with LT-I and LT-IIa are indicated (#). (B) Edematous i.d. reaction after injection of saline (sham), LPS (6.0 EU), or each purified protein (0.5 μg). Swelling of the injection site was measured periodically up to 4 days after injection. Symbols are identified on the figure. (C) Edematous i.d. reaction in mice inoculated with LT-I or LT-IIa previously either untreated or incubated with specific anti-LT sera or the cognate ganglioside receptors (GM1 for LT-I or GD1b for LT-IIa). Edema sizes were measured 48 h after administration. Data represent means ± standard deviations of 4 to 5 mice under each tested condition.

FIG. 6. Cell infiltration in skin biopsy specimens of mice i.d. inoculated with LT-I, LT-IIa, and LT-IIaB₅. Mice were inoculated with saline (A), 0.5 µg of LT-I (B), 0.5 µg of LT-IIa (C), or 0.5 µg of LT-IIaB₅ (D). Sections of 5-mm thickness were prepared and stained with hematoxylin and eosin 2 days after inoculation. Magnification, ×100.

bation of LT-I with purified GM1 ganglioside completely ablated the inflammatory reaction (44). When LT-IIa was preincubated with GD1b, no significant decrease in the local inflammatory reactions was observed (Fig. 5C).

Experiments were also designed to determine if the presence of anti-LT antibodies could neutralize the inflammatory reactions observed in mice inoculated with either LT-I or LT-IIa. Incubation of LT-I or LT-IIa with specific polyclonal antiserum did not reduce the extent of edema noted in the enterotoxin-administered mice (Fig. 5C). Similarly, no reduction in the inflammatory effects was observed in mice that received multiple immunizations with either LT or LT-I (data not shown). To more precisely describe the inflammatory effects induced (or not induced) by i.d. administration of the enterotoxins, skin biopsy specimens were prepared. Samples of skin located proximal to the site of inoculation were obtained at a point 2 days after administration of LT-I, LT-IIa, or LT-IIaB₅ (Fig. 6). Intense local infiltration of polymorphonuclear cells throughout the epidermis, dermis, and subcutaneous tissues was observed in skin samples collected from mice injected with LT-I (Fig. 6B). In contrast, much less cellular infiltration was noted in the skin samples of mice that had received LT-IIa (Fig. 6C). No significant histological alterations were observed in samples collected from mice inoculated with LT-IIaB₅.

DISCUSSION

While a variety of studies demonstrated the potent immunomodulatory properties of the type II enterotoxins used as mucosal adjuvants (31, 34, 35), the capacity of these enterotoxins to enhance immune responses to coadministered antigens following administration via the i.d. route had not been evaluated. Results described here show that LT-IIa displays

humoral and cellular adjuvant effects similar to those of LT-I following i.d. administration to C57BL/6 mice. Yet in contrast to LT-I, LT-IIa induces a significantly lower inflammatory reaction at the injection site, as evidenced by reduced edema formation, less persistent induration, and decreased inflammatory cellular infiltrates. In addition, mice i.d. injected with LT-IIaB₅ exhibited an increased antigen-specific serum IgG response although neither enhancements in T cell responses nor detectable inflammatory reactions at the injection site were observed. Our results demonstrate, therefore, that LT-IIa and LT-IIaB₅ show distinct inflammatory effects with regard to LT-I following i.d. administration to mice.

LT-IIa and LT-IIaB₅ showed differential parenteral adjuvanticity in a mouse model. C57BL/6 mice i.d. immunized with OVA admixed with LT-I or LT-IIa exhibited similar enhancement of antigen-specific serum antibody responses and T cell activation patterns, including induction of cytotoxic CD8⁺ T cells. On the other hand, mice i.d. immunized with LT-IIaB₅ elicited only lower anti-OVA antibody titers, which did not reach statistically significant increments following two boosts with regard to mice immunized with OVA. These results contrast with the *in vitro* results that indicated that LT-IIaB₅ has stronger immunomodulatory activities than those associated with holotoxin (18, 19). Results based on the responses of human monocytic cells indicated that LT-IIaB₅ induces stronger *in vitro* proinflammatory activity, as measured by secretion of cytokines either alone or in combination with LPS, than cells exposed to LT-IIa (18, 19). The differential *in vitro* immunomodulatory activity of LT-IIa and its B subunit pentamer is thought to mainly correlate with the binding of LT-IIaB₅ to the TLR2 innate immune receptor through a domain not exposed at the holotoxin (19, 27). Our results show that activation of innate immunity responses mediated by the B subunit does not contribute to the *in vivo* effects of LT-IIa, whereas the presence of an intact A subunit has a relevant role in the *in vivo* inflammatory and adjuvant effects of the enterotoxin. In fact, it would appear that multiple factors are involved *in vivo* immunological properties of LT-IIa and LT-IIaB₅ that likely include binding and activation of antigen-presenting cells, stimulation of innate immunity signals leading to induction of adaptive immune responses, and/or species-specific genetic features that are still not fully elucidated either for LT-I or LT-IIa. Clearly, additional studies are needed to fully elucidate the mechanisms underlying the immune-modulatory properties of these enterotoxins, particularly those elicited by parenteral administration.

Induction of cellular immune responses is a crucial feature for eradication of intracellular pathogens and the control of certain degenerative diseases. Mice immunized with LT-IIa or LT-I showed similar T-cell activation patterns, as demonstrated by the secreted cytokine profiles and activation of cytotoxic CD8⁺ T cells. In contrast to the antibody-inducing property, in which LT-IIaB₅ retained at least partial inducing activity, mice immunized with the B subunit pentamer showed greatly reduced activation of antigen-specific T cells, which was mainly restricted to IL-5 secretion by T helper cells, with regard to LT-IIa. These results further indicate that the presence of an intact A subunit is important for the T cell adjuvant effects of LT-IIa, particularly for activation of cytotoxic CD8⁺ T cell responses following i.d. administration to mice. In accordance with previous *in vitro* results (1, 18, 19, 28), our data

support the use of LT-IIa as a potent parenteral adjuvant for T cell responses and, therefore, a promising alternative as i.d. adjuvant for vaccines targeting chronic infections by intracellular pathogens as well as tumor cells.

Tissue permeability activity of type I enterotoxins has been reported as a putative feature involved with the adjuvant properties of these toxins (22, 29, 30, 42). Based on a method originally designed to measure the vascular skin permeability effect of CT (9), we tested the skin permeability effects of LT-I and LT-IIa by simply i.d. injecting these toxins with dextran blue, a high-molecular-weight dye that does not diffuse away from the injection site. Using this methodological approach, we observed that both LT-I and LT-IIa induced similar effects on skin permeability while no effects were observed in mice treated with LT-IIaB₅. Notably, administration of neither purified LPS at a higher concentration than that found in the purified LTs nor heat-denatured toxins elicited effects on skin permeability. Compared with LT-IIa, however, LT-I induced much stronger inflammatory reactions at the injection site. As previously reported (44), and as confirmed by our own observations, mice i.d. inoculated with LT-I showed increased redness, local swelling, and induration that persisted for several days. In contrast, symptoms detected in mice treated with LT-IIa were significantly milder and short-lived while no local inflammatory reactions were detected in mice i.d. inoculated with LT-IIaB₅. These results show that the skin permeability effect is related to the adjuvant activities of both LT-I and LT-IIa following i.d. administration to mice. In contrast, the strong local inflammatory reactions caused by LT-I are clearly related to the ability of the GM1-binding activity of the toxin while binding to GD1b seems to play a minor role in the effect exerted by LT-IIa. Interestingly, the presence of anti-LT antibodies did not appear to affect the i.d. reactions observed in mice treated with LT-I or LT-IIa. These results suggest that induction of inflammatory local reactions does not correlate with the adjuvant activities of either LT-I or LT-IIa. Further experiments based on toxin mutants altered either at the catalytic site or at residues affecting the receptor-binding specificity will contribute to the elucidation of the specific roles of the A and B subunits on the induction of the local inflammatory reactions associated with type I and type II LTs.

It is generally accepted that a local acute inflammatory response observed after parenteral vaccination is essential for evoking a strong primary antigen-specific immune response (4, 24), an effect that is likely ascribed to the cross talk of the various immunocompetent cell types that are recruited to the inoculation site. Due to the multiple cellular interactions, activation of internal regulatory circuits, and production of immunomodulatory molecules, local inflammatory reactions are usually induced by vaccines administered via parenteral routes. In extreme cases, acute inflammatory responses evoked by vaccination lead to allergic reactions, autoimmune disease, anaphylactic shock, and other undesirable outcomes (6, 25). In addition, when applied via the nasal mucosal route, LT-I has raised considerable concern regarding translocation of the toxin and coadministered antigens to the central nervous system, increasing the risks of neurotoxicity (8). It is notable, therefore, that when introduced by the parenteral route, LT-IIa, although expressing similar adjuvant properties to LT-I, induced a milder local inflammatory reaction. Even the modest

increase in the antibody responses elicited in mice immunized with LT-IIaB₅ occurred without significant induction of local inflammatory reactions, thus suggesting that development of LT derivatives devoid of any inflammatory activity or development of derivatives unable to elicit undesirable effects is a feasible goal. In this context, the present results shed new light on the use of LT-IIa as an alternative for the development of parenteral adjuvants.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (INCTV program), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and U.S. Public Health Service grant DE13833 (T.D.C.).

We thank L. C. Santos and E. Gimenez for helpful technical assistance.

REFERENCES

- Arce, S., H. F. Nawar, M. W. Russell, and T. D. Connell. 2005. Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells. *Infect. Immun.* 73:2718–2727.
- Barber, D. L., E. J. Wherry, and R. Ahmed. 2003. Cutting Edge: Rapid in vivo killing by memory CD8 T Cells. *J. Immunol.* 171:27–31.
- Beignon, A. S., J. P. Briand, S. Muller, and C. D. Partidos. 2001. Immunization onto bare skin with heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* enhances immune responses to coadministered protein and peptide antigens and protects mice against lethal toxin challenge. *Immunology* 102:344–351.
- Belshe, R. B., et al. 2004. Serum antibody responses after intradermal vaccination against influenza. *N. Engl. J. Med.* 351:2286–2294.
- Berenson, C. S., et al. 2010. Mammalian cell ganglioside-binding specificities of *E. coli* enterotoxins LT-IIb and variant LT-IIb (T131). *Glycobiology* 20: 41–54.
- Bohlke, K., R. L. Davis et al. 2003. Risk of anaphylaxis after vaccination of children and adolescents. *Pediatrics* 112:815–820.
- Braga, C. J. M., et al. 2008. T cell adjuvant effects of three *Salmonella enterica* flagellins. *Braz. J. Microbiol.* 39:44–49.
- Couch, R. 2004. Nasal vaccination: *Escherichia coli* and Bell's palsy. *N. Engl. J. Med.* 350:860–861.
- Craig, J. P. 1965. A permeability factor (toxin) found in cholera stools and culture filtrate and its neutralization by convalescent cholera sera. *Nature* 207:614–616.
- Edelhoc, H. 1967. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6:1948–1954.
- Enioutina, E. Y., D. Visic, and R. A. Daynes. 2000. The induction of systemic and mucosal immune responses to antigen-adjuvant compositions administered into the skin: alterations in the migratory properties of dendritic cells appears to be important for stimulating mucosal immunity. *Vaccine* 18:2753–2767.
- Fraser, S. A., et al. 2003. Mutant *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit that separates toxoid-mediated signaling and immunomodulatory action from trafficking and delivery functions. *Infect. Immun.* 71:1527–1537.
- Fukuta, S., J. L. Magnani, E. M. Twiddy, R. K. Holmes, and V. Ginsburg. 1988. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LT-I, LT-IIa, and LT-IIb. *Infect. Immun.* 56:1748–1753.
- Guebre-Xabier, M., S. A. Hammond, L. R. Ellingsworth, and G. M. Glenn. 2004. Immunostimulant patch enhances immune responses to influenza virus vaccine in aged mice. *J. Virol.* 78:7610–7618.
- Guillobel, H. C., et al. 2000. Adjuvant activity of a nontoxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on systemic and mucosal immune responses elicited against a heterologous antigen carried by a live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain. *Infect. Immun.* 68:4349–4353.
- Guth, B. E., et al. 1986. Production of type II heat-labile enterotoxin by *Escherichia coli* isolated from food and human feces. *Infect. Immun.* 54:587–589.
- Guth, B. E., E. M. Twiddy, L. R. Trabulsi, and R. K. Holmes. 1986. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 54:529–536.
- Hajishengallis, G., H. Nawar, R. I. Tapping, M. W. Russell, and T. D. Connell. 2004. The Type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and their respective B pentamers differentially induce and regulate cytokine production in human monocyte cells. *Infect. Immun.* 72:6351–6358.
- Hajishengallis, G., et al. 2005. Toll-like receptor 2 mediates cellular activation by the B subunits of type II heat-labile enterotoxins. *Infect. Immun.* 73:1343–1349.

20. Hajishengallis, G., S. Arce, C. M. Gockel, T. D. Connell, and M. W. Russell. 2005. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. *J. Dent. Res.* **84**: 1104–1116.
21. Holmgren, J., C. Czerkinsky, K. Eriksson, and A. Mharandi. 2003. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* **21**(Suppl. 2):S89–S95.
22. Holmgren, J., et al. 2005. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol. Lett.* **97**:181–188.
23. Hunsaker, B. D., and L. J. Perino. 2001. Efficacy of intradermal vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **79**:1–13.
24. Kang, S. M., and R. W. Compans. 2009. Host responses from innate to adaptive immunity after vaccination: molecular and cellular events. *Mol. Cells* **27**:5–14.
25. Kaplanski, C., J. Lebron, J. Wolf, and B. Ledwith. 2008. Immunotoxicological concerns for vaccines and adjuvants, p. 229–237. In D. J. Herzyk and J. L. Bussiere (ed.), *Immunotoxicology strategies for pharmaceutical safety assessment*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ.
26. Lasaro, M. A., C. Mathias-Santos, J. F. Rodrigues, and L. C. Ferreira. 2009. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **55**:93–99.
27. Lee, C. H., et al. 2010. Enhanced antigen uptake by dendritic cells induced by the B pentamer of the type II heat-labile enterotoxin LT-IIa requires engagement of TLR2. *Vaccine* **28**:3696–3705.
28. Liang, S., and G. Hajishengallis. 2010. Heat-labile enterotoxins as adjuvants or anti-inflammatory agents. *Immunol. Invest.* **39**:449–467.
29. Magnusson, K.-E., E. Kihlström, and T. Sundqvist. 1986. Effect of cholera toxin on rat intestinal permeability assessed with fluorescent dextran 3000. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**:15–18.
30. Magnusson, K.-E., E. Kihlström, and T. Sundqvist. 1986. Elevation of rat intestinal permeability by enterotoxigenic *Escherichia coli* in comparison to non-toxicogenic *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. Application of fluorescent dextran 3000 as permeability probe. *FEMS Microbiol. Lett.* **34**:199–204.
31. Martin, M., D. J. Metzger, S. M. Michalek, T. D. Connell, and M. W. Russell. 2000. Comparative analysis of the mucosal adjuvanticity of the type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb. *Infect. Immun.* **68**:281–287.
32. Martin, M., D. J. Metzger, S. M. Michalek, T. D. Connell, and M. W. Russell. 2001. Distinct cytokine regulation by cholera toxin and type II heat-labile toxins involves differential regulation of CD40 ligand on CD4⁺ T cells. *Infect. Immun.* **69**:4486–4492.
33. Nawar, H. F., N. D. King-Lyons, J. C. Hu, R. C. Pasek, and T. D. Connell. 2010. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a non-mammalian host. *Infect. Immun.* **78**:4705–4713.
34. Nawar, H. F., S. Arce, M. W. Russell, and T. D. Connell. 2005. Mucosal adjuvant properties of mutant LT-IIa and LT-IIb enterotoxins that exhibit altered ganglioside-binding activities. *Infect. Immun.* **73**:1330–1342.
35. Nawar, H. F., S. Arce, M. W. Russell, and T. D. Connell. 2007. Mutants of type II heat-labile enterotoxin LT-IIa with altered ganglioside-binding activities and diminished toxicity are potent mucosal adjuvants. *Infect. Immun.* **75**:621–633.
36. Sack, D. A., S. Huda, P. K. B. Neogi, R. R. Daniel, W. M. Spira. 1980. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxin. *J. Clin. Microbiol.* **11**:35–40.
37. Seriwatana, J., et al. 1988. Type-II heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from animals and humans. *Infect. Immun.* **56**:1158–1161.
38. Simmons, C. P., et al. 2001. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. *Scand. J. Immunol.* **53**:218–226.
39. Spangler, B. D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* **56**:622–647.
40. Teneberg, S., T. R. Hirst, J. Ångström, and K.-A. Karlsson. 1994. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin: identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. *Glycoconj. J.* **11**:533–540.
41. Uesaka, Y., et al. 1994. Simple method of purification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and cholera toxin using immobilized galactose. *Microb. Pathog.* **16**:71–76.
42. Verma, M., S. Majumdar, N. K. Ganguly, and B. N. Wadia. 1994. Effect of *Escherichia coli* enterotoxins on macromolecular absorption. *Gut* **35**:1613–1616.
43. Walker, R., and J. D. Clements. 1993. Use of heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* to facilitate mucosal immunization. *Vaccine Res.* **2**:1–10.
44. Zoetewij, J. P., et al. 2006. GM1 binding-deficient exotoxin is a potent noninflammatory broad spectrum intradermal immunoadjuvant. *J. Immunol.* **177**:1197–1207.

APÊNDICE B – Manuscrito submetido à publicação**Intradermal administration of type II heat-labile enterotoxins LT-IIb and LT-IIc of enterotoxigenic *Escherichia coli* enhances both humoral and cellular immunity**

John C. Hu^{1,*}, Camila Mathias-Santos^{2,*}, Christopher J. Greene¹, Natalie D. King-Lyons¹,
Juliana F. Rodrigues², Luís C. S. Ferreira^{2,#}, Terry D. Connell^{1, †,#}

¹Department of Microbiology & Immunology and The Witebsky Center for Microbial Pathogenesis and Immunology, The University at Buffalo, Buffalo, New York

²Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Keywords: vaccine, heat-labile enterotoxin, intradermal, adjuvant, CD8 T cell, dendritic cell, inflammation.

Running title: Intradermal Adjuvanticity of LT-IIb and LT-IIc.

†Address of corresponding author: Corresponding author: Terry D. Connell, Department of Microbiology & Immunology, The University at Buffalo, 138 Farber Hall, 3435 Main St., Buffalo, NY 14214. Phone: (716) 829-3364; Fax: (716) 829-2158. Email: connell@buffalo.edu.

*Authors contributed equally

#Co-senior authors

ABSTRACT

Vaccinations are extremely effective at combating infectious diseases. Many conserved antigen targets, however, are poorly immunogenic. Additionally, protein subunit vaccines frequently elicit only humoral immune responses and fail to confer protection against complex intracellular pathogens such as *Mycobacterium tuberculosis* and HIV. These inadequacies in current vaccine development are often overcome by the use of appropriate adjuvants. Heat-labile enterotoxins (HLT) produced by some enterotoxigenic *Escherichia coli* strains exhibit potent adjuvant properties. In this study, LT-IIb and LT-IIc, two type II heat-labile enterotoxins, were evaluated in a murine intradermal (ID) immunization model. Both adjuvants enhanced the levels of antigen-specific antibodies and CD8⁺ T cell responses to ovalbumin, a poorly immunogenic model antigen. While LT-IIb and LT-IIc stimulated similar enhancements to humoral responses, LT-IIc induced a more rapid and sustained expansion of CD8⁺ T cells. Furthermore, both LT-IIb and LT-IIc elevated expression of the costimulatory molecule CD80 on dendritic cells (DC) located in the draining lymph nodes. Only LT-IIc, however, augmented expression of CD80 in the CD8α⁺ DC subpopulation. Finally, both LT-IIb and LT-IIc induced less edema, cellular infiltrates, and general inflammation at the site of injection in comparison to LT-I, a type I HLT adjuvant. Thus, LT-IIb and LT-IIc are attractive comprehensive ID adjuvants with unique characteristics that have the capacity to enhance both humoral and cellular immunity.

INTRODUCTION

Vaccination remains one of the most efficient and cost effective methods of combating infectious diseases (2, 4, 12). Not all archetypical antigens (Ag), however, are immunogenic and induce protection. Additionally, the use of protein subunit vaccines have, in general, replaced the use of whole cell preparations or attenuated strains as immunogens. While protein subunit vaccinations are well-tolerated, these agents frequently elicit only humoral responses and often fail to induce strong protection against complex diseases such as viral infections (10), which usually require induction of CD8⁺ T cell responses or other components of the cellular immune system (24). To enhance immune reactions to poor immunogens and to provide comprehensive immune responses (i.e., both humoral and cellular components) against complex infectious diseases, adjuvants are routinely required in vaccination.

In addition to the use of adjuvants, various routes of vaccine administration have been utilized to enhance immune responses. Traditionally, vaccines are administered by either the intramuscular (IM) or subcutaneous (SC) routes. These sites, however, lack dense populations of Ag presenting cells (APCs) and, therefore, require higher concentrations of Ag to raise significant immune responses. As the skin and draining lymph nodes contain numerous APCs, such as Langerhans cells (LC), dermal dendritic cells (dDC), and lymphoid resident DCs, that can initiate robust immune responses (21), the intradermal (ID) route of administration offers an attractive alternative. For example, only half the normal IM dose was required to induce a protective response when individuals were vaccinated with the first FDA-approved ID influenza vaccine. This Ag-sparing effect was even evident when the ID vaccine was used in poor responder populations (e.g., the elderly) (21).

A major concern, however, is the choice of an appropriate adjuvant for optimizing ID vaccine outcomes. Cholera toxin (CT) of *Vibrio cholerae* and LT-I, LT-IIa, LT-IIb, and LT-IIc of enterotoxigenic *Escherichia coli*, members of the AB₅ heat-labile enterotoxin (HLT) family, are potent adjuvants that enhance both mucosal and systemic immunity (7, 8, 15, 19). CT and LT-I are members of the type I subfamily of HLT; LT-IIa, LT-IIb, and LT-IIc are members of the type II HLT subfamily. In mucosal immunization models, LT-IIa, LT-IIb, and LT-IIc have been

shown to induce distinct immunologic responses in comparison to those induced by CT or LT-I (1, 19). The unique immunomodulatory properties of the type II HLTs have been attributed to their highly divergent B subunits that mediate preferential affinity for various non-GM1 gangliosides that are located on immune cell populations (7).

While LT-IIb and LT-IIc have been described as potent mucosal adjuvants (14, 19), their immunostimulatory properties, when introduced by the ID route, have not been fully evaluated. Results reported herein revealed that LT-IIb and LT-IIc significantly enhanced levels of Ag-specific antibodies and CD8⁺ T cell responses, while inducing minimal inflammation at the injection site in comparison to LT-I when used as an ID adjuvant. While both LT-IIb and LT-IIc improved humoral responses to similar levels, LT-IIc enhanced Ag-specific CD8⁺ T cell expansion at a significantly faster and sustained rate. In contrast to LT-IIb, LT-IIc also augmented expression of costimulatory molecule CD80 on CD8α⁺ DC in the cutaneous draining lymph nodes. These data support a consideration of LT-IIb and LT-IIc as potential clinical adjuvants for use in ID vaccines.

METHODS

Mice and immunizations. Female 8-12 week C57Bl/6J mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) were used. All experiments involving mice were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University at Buffalo and University of São Paulo. Prior to immunizing, mice were anesthetized with ketamine (75mg/kg) and xylazine (10mg/kg). Hair on the lower flank was removed with electric clippers and a commercial depilatory cream for 1 min. The application site was rinsed with water and sterilized with 70% isopropanol. Injections were performed with a 29g needle and 0.5cc insulin syringe (BD, Franklin Lakes, NJ) with the bevel side up. Model Ag chicken egg ovalbumin (OVA) (Sigma, St. Louis, MO) was used at 50µg with or without 0.5 or 1µg of HLT in 20-30µl diluted in phosphate buffered saline (PBS).

Antigen and adjuvant preparations. Recombinant LT-IIb and LT-IIc were purified using standard methods (19). LT-I was prepared using a modification of a previously described method (19). *V. cholerae* JBK70 transformed with plasmid pML19 (11) was cultured in LB broth containing 200µg/ml ampicillin (RPI, Prospect, IL) for 18 hrs in an incubator/shaker (37°C, 300 rpm). Culture supernatant was obtained by centrifugation (17,000g, 20 min, 4°C), followed by filtration using a 0.22µm vacuum filter (Corning, Tewksbury, MA). Recombinant LT-I was precipitated from the supernatant and purified using established methods (20). Protein concentrations were determined using a Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL). Contaminating LPS was removed from all proteins using Detoxi-Gel (Pierce) if needed. LPS contamination was $\leq 0.03\text{ng}/\mu\text{g}$ protein, as determined by a Limulus Amoebocyte Lysate Endochrome (Charles River Endosafe, Charleston, SC), for all proteins.

Skin edema and cytokine analysis. Skin swelling was determined by taking two orthogonal measurements (M_1 and M_2) of the induration diameter. Edema volume was calculated as $M_1 \times M_2 \times M_2$, where $M_1 \geq M_2$. Edema fluid was extracted from 1.5x1.5 cm sections of skin at the injection site. Sections were placed dermal side down onto 40µM nylon screens (BD), placed in 50 mL conical tubes (Corning, Tewksbury, MA), covered with parafilm, and centrifuged (300g, 4°C, 30 min). Edema fluid recovered at the bottom of the tube was re-centrifuged for 10 min to

pellet contaminating cells. The top fraction (~80%) was retrieved for analysis. Cytokine levels in samples were analyzed using a CBA kit (BD Biosciences, San Jose, California).

Histology. Skin sections containing the injection site were obtained from mice euthanized 48 hrs after immunization were fixed in 10% formalin and paraffin sectioned for H&E staining. The number of infiltrating cells at 400x magnification in 10 fields/skin sections were counted by a veterinary pathologist.

Myeloperoxidase assay. The myeloperoxidase (MPO) activity of ID injected skin sections was determined spectrometrically (5). Briefly, 100mg of minced skin containing the injection site were homogenized (2x45 sec, 0°C) in 1.9 ml of sodium phosphate buffer (0.02M NaH₂PO₄, 0.015M Na₂EDTA, 0.1M NaCl, pH 4.7) using a disperser device (IKA, Wilmington, NC) and centrifuged (10,000 x g, 10 min, 4°C). The pellets were resuspended in 1.5 ml of 0.05M sodium phosphate buffer pH 5.4, containing 0.5% HTAB, freeze-thawed (3x), and re-centrifuged. Duplicates of each sample (50µl/well) were mixed with 150µl of BD OptEIA™ TMB substrate reagent and incubated (37°C, 5 min). The reaction was terminated by addition of 150µl/well of 4M H₂SO₄ and the absorbance determined at 450nm. The results of the MPO assay were expressed as OD450nm/mg of total protein.

***In vivo* cytotoxic assay.** The *in vivo* cytotoxic activity of CD8⁺ T cells was determined as described (16). Cells were stained with CFDA-SE (Invitrogen, Grand Island, NY) and pulsed with 50µg/mL SIINFEKL peptide (Genscript, Piscataway, NJ). Cell killing percentages were calculated as $1 - \frac{\text{Target Cells}}{\text{Control Cells}}$.

Ab ELISA. OVA-specific serum Ab levels were quantified using ELISA (8). Anti-mouse IgG capture and conjugated detection Ab were purchased from SouthernBiotech (Birmingham, AL) and murine IgG standard reference serum from MP Biomedicals (Solon, OH).

Flow cytometry and Ab. Cells were stained in FACS buffer (PBS, 0.1% heat-inactivated FCS, 0.01% sodium azide) for extracellular markers or in 0.5% saponin for IFNγ after fixation (4% paraformaldehyde). Ab used were from eBioscience, Biolegend, or BD Biosciences: CD3ε (145-

2C11), CD8 α (53-6.7), CD11c (N418), MHC-II (M5/T14.15.2), H₂Kb (AF6-88.55.3), CD80 (16-10A1), IFN γ (XMG1.7), and CD44 (IM7). OVA-specific dextramer was purchased from Immudex (Copenhagen, Denmark). Data captured using FACSCalibur, LSR-II, or LSR-Fortessa and analyzed using FlowJo (Treestar, Ashland, OR).

Dendritic cell analysis. Inguinal lymph nodes isolated 24 hrs after ID immunization were homogenized through a 40 μ M nylon mesh. Cells were washed in FACS buffer, stained, and analyzed by flow cytometry, as described above.

Statistical analysis. All data were analyzing using Graphpad Prism (La Jolla, CA).

RESULTS

Inflammatory response to type II heat-labile enterotoxins delivered intradermally.

Since patient compliance has a critical impact on the actual success of vaccines, minimal inflammation is an important characteristic of a well-tolerated adjuvant. While ID administration of vaccines has numerous benefits including Ag sparing, the route is highly susceptible to local adverse reactions. Therefore, injection-site inflammatory reactions were analyzed grossly and histologically after a single ID dose of OVA adjuvanted with LT-IIb, LT-IIc, or LT-I.

Overall, LT-IIb and LT-IIc stimulated significantly less edema at the site of immunization in comparison to LT-I. After 24 hrs, LT-IIb and LT-IIc induced a level of swelling that was essentially the same size of the injection induration, while the swelling induced by LT-I greatly exceeded the injection induration margins (Fig. 1A). Kinetically, the increased edema induced by LT-I extended to ~2 weeks after a single dose and greatly exceeded that of LT-IIb and LT-IIc (Fig. 1B). Additionally, LT-I and LT-IIb, but not LT-IIc treated mice, displayed a conspicuous secondary swelling response at day 7 post injection (Fig. 1B). Furthermore, all HLT adjuvanted groups exhibited an increased level of inflammatory cytokine IL-6 at the injection site (Fig. 1C), while a reduced amount of immunosuppressive IL-10 was noted in groups that had been adjuvanted with LT-IIc and LT-I, compared to the amount induced by OVA alone (Fig. 1D).

Histologically, LT-IIb, LT-IIc, and LT-I increased immune cell infiltrates into the injection site at 48 hrs post-vaccination, in comparison to only OVA (Fig. 2A). Mice receiving LT-I, however, had statistically more inflammatory cellular infiltrates, and specifically, neutrophils (Fig. 2B). Moreover, the least numbers of infiltrating neutrophils were observed in mice administered with LT-IIc (Fig. 2B). To confirm the histological quantification of infiltrating neutrophils, the levels of myeloperoxidase (MPO) was determined in tissue homogenates. Both LT-I and LT-IIb induced statistically more MPO enzymatic activity at the injection site tissue 48 hrs post-injection in comparison to the PBS control. Furthermore, LT-I induced significantly more MPO activity in mice when compared to the effects of LT-IIb or LT-IIc (Fig. 2C). Remarkably, LT-IIc-treated mice did not exhibit statistically more MPO enzymatic activity than PBS control. Taken together,

in comparison to LT-I, both LT-IIb and LT-IIc induced significantly less inflammation at the injection site, an effect that would be clinically desirable.

Enhancement of humoral responses after ID immunization with HLT

Generation of a robust Ab response is a core element of an effective adjuvant. Serum IgG responses to the model Ag OVA were analyzed after ID vaccination using a 2-dose regimen at 14 day intervals (Fig. 3A). After two doses, groups receiving LT-IIb, LT-IIc, and LT-I exhibited similar enhancements to OVA-specific serum IgG that were two orders of magnitude greater than levels induced by administration solely with OVA (Fig. 3B). Additionally, only LT-IIc elicited a statically significant increase in OVA-specific serum IgG at day 14 (Fig. 3B). Remarkably and despite the reduced inflammatory profile, both LT-IIb and LT-IIc, when administered ID, still enhanced Ag-specific Ab levels that are equivalent to those induced by the more inflammatory LT-I.

Enhancement of CD8⁺ T cell responses after ID immunization with HLT

CD8⁺ T cell responses are critical for clearing many intracellular pathogens. To examine the quantitative enhancements to the CD8⁺ T cell population induced by the adjuvants, OVA-specific dextramers were utilized to identify Ag-specific CD8⁺ T cells using the same immunization regimen of the prior experiments (Fig. 3A). After a single dose, both LT-IIc and LT-I, but not LT-IIb, induced statistically significant enhancements in OVA-specific CD8⁺ T cell expansion in the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) compartment at 7 days post-vaccination (Fig. 4A, B). By four days after the second dose (day 18), however, only mice treated with LT-IIb and LT-IIc had statistically more OVA-specific CD8⁺ T cells when compared to mice receiving only OVA (Fig. 4C). Administration of LT-I could not sustain elevated OVA-specific CD8⁺ T cell numbers greater than mice that received OVA alone to day 18 (Fig. 4C).

To evaluate the qualitative enhancements to CD8⁺ T cells, levels of IFN γ and antigen-specific *in vivo* cytotoxicity were determined as effector function (Fig. 5). Seven days after the initial immunization, PBMCs were stimulated *ex vivo* with OVA peptide SIINFEKL to measure the production of IFN γ by intracellular staining. Enhanced Ag responsive IFN γ secreting CD8⁺ T cells were observed only in groups adjuvanted with LT-IIc and LT-I at day 7 (Fig. 5A, B), when

compared to OVA alone. To assess the cytotoxic activity of OVA-specific CD8⁺ T cells, SIINFEKL-pulsed syngeneic splenocytes were adoptively transferred to immunized mice. Seven days after the second immunization (day 21), enhanced cell killing was detected in all three HLT-treated groups when compared to mice immunized only with OVA (Fig. 5C, D). In summary, LT-IIb and LT-IIc enhanced both the quantitative and qualitative functions of Ag specific CD8⁺ T cell responses. Additionally, LT-IIc augmented CD8⁺ T cell expansion and IFN γ expression at a more accelerated rate (day 7) in comparison to LT-IIb and sustained better numbers of CD8⁺ T cell at day 18 when compared to LT-I, although this difference ultimately did not impact cytotoxic function after two doses.

Modulation of dendritic cells in the draining lymph node

To identify a possible explanation for the adjuvant effects of LT-IIb and LT-IIc on both humoral and cellular immune responses, DCs in the cutaneous draining lymph node (inguinal) were examined after ID administration of OVA in the presence or absence of the HLT. Twenty-four hours after vaccination, DCs in the draining lymph node upregulated expression of CD80 in mice treated with LT-IIb, LT-IIc or LT-I (Fig. 6A). Additionally, OVA alone increased the expression of MHC-I over the levels observed in sham-immunized animals; neither LT-IIb nor LT-IIc, in comparison to OVA alone, proffered additional enhancements in level of MHC-I (Fig. 6B). Surprisingly, mice adjuvanted with LT-I actually decreased the expression of MHC-I on DC (Fig. 6B).

CD8 α ⁺ DCs are extremely proficient in cross-presentation and critical in the induction of a robust CD8⁺ T cell response (9). To determine the effects of LT-IIb, LT-IIc, and LT-I on this DC population, we examined the expression of co-stimulatory molecule CD80 on CD8 α ⁺ DCs in the DLN of vaccinated mice. Only mice that had been adjuvanted with LT-IIc or LT-I enhanced expression of CD80 on CD8 α ⁺ DCs; LT-IIb had no statistical effect on the expression of CD80 on these cells (Fig. 6C) when compared to OVA alone. Additionally, LT-I induced a similar decrease in MHC-I expression in CD8 α ⁺ DCs, as was observed for the entire DC population (Fig. 6D).

DISCUSSION

Clinically acceptable adjuvants must induce minimal side effects, such as irritation and inflammation, while maintaining sufficient activity in enhancing the immune response. Administration of type I HLT adjuvants, such as CT and LT-I, by cutaneous routes have been reported and, in most cases, induced significant amounts of local inflammation (17, 25). Of the type II HLT family, only LT-IIa had been evaluated for both humoral and cellular enhancements as an ID adjuvant and shown to be less inflammatory than LT-I (16). In the present work, LT-IIb and LT-IIc also displayed less irritation at the injection site, measured both by edema formation and inflammation, while maintaining excellent adjuvant effects for both humoral and CD8⁺ T cell responses.

It is interesting to note that, while LT-IIb appears to stimulate slightly more swelling and neutrophil infiltrates than LT-IIc, the elevated levels of IL-6 and lower IL-10 in LT-IIc induced edema fluid would predict the opposite effect. Rather, it appears that LT-IIb induces an elevated neutrophilic inflammation, whereas LT-IIc enhances a more specific immunogenic cytokine environment. Studies describing the inflammatory behavior of MF59 and alum by IM routes (6, 13) and saponin, incomplete Freund's adjuvant and monophosphoryl lipid A by ID routes (23), have shown that neutrophils are the major infiltrating cell population at the site of injection after few hours post-administration. Despite the rapid response and ability of neutrophils to sequester Ag and migrate to the DLN, Calabro et al. (6) and Lu and Hogenesch (13) showed that immunodepletion of neutrophils had no impact upon the adjuvant activity of MF59 or alum, respectively. In agreement, LT-IIc, in comparison to LT-IIb, induced the lowest neutrophilic infiltrate and generated high levels of humoral and cellular responses, which were equivalent to those engendered by LT-I. This observation suggests that the adjuvant activity of HLTs is dissociable from inflammatory responses. Indeed, modifications of wild type HLTs to reduce unwanted inflammation have not drastically reduced their capacity to enhance the humoral responses (3, 8, 18, 25).

Finally, the difference between LT-IIb and LT-IIc to induce CD8⁺ T cell expansion is especially intriguing. It is feasible that the differences in expansion could be mediated by either the cytokine

environment and/or DC activation. Both LT-IIc and LT-I suppressed IL-10 levels in the skin after administration, while LT-IIb had no effect on IL-10 levels. Disengagement of suppressive IL-10 could be a major factor in the more robust T cell response that was observed with the use of LT-IIc and LT-I. Additionally, both LT-IIc and LT-I, but not LT-IIb, specifically activated CD8 α^+ DCs. Indeed, CD8 α^+ DCs have an exceptional ability to activate and prime CD8 $^+$ T cells due to the endogenous capacity to cross-present soluble Ag on MCH-I (9, 22). The precise cellular and/or molecular mechanism by which LT-IIc induces rapid and sustained CD8 $^+$ T cell responses warrants additional investigation. Overall, the data strongly suggest that LT-IIb and LT-IIc are potent ID adjuvants that have desirable immunomodulatory properties that may be exploitable as clinical adjuvants.

CONCLUSION

The unique characteristics of the ID route, which includes dose sparing, have stimulated recent investigations for vaccine development. Discovery of new ID adjuvants that have the capacity to engage both humoral and cellular immunity is a highly desirable event for vaccine design. Herein, the capacity of LT-IIb and LT-IIc, when used as ID adjuvants, to enhance humoral and cellular immune responses without inducing excessive local inflammation emphasizes their potential clinical importance.

Acknowledgements

The authors would like to thank Lorrie Mandell and Jessica Ono for their excellent technical support. The work presented was funded by grants awarded to T.D.C. by the U.S. Dept. of Health (DE13833, DE017138) and The John R. Oishei Foundation and to L.C.S.F. by FAPESP and CNPq (INCTV).

FIGURES

Figure 1. LT-IIb and LT-IIc induce less swelling than LT-I at the site of injection. (A) Side profile of injection associated swelling 24 hrs after ID administration of OVA +/- HLT adjuvant. Injection induction margins (black) and swelling margins (red) (B) Kinetics of swelling volume measured to day 13 after primary immunization. OVA alone did not induce swelling beyond the initial injection induction and therefore not shown beyond Day 0. (C) IL-6 and (D) IL-10 levels in the edema fluid 24 hrs after ID vaccination. *Statistical Analysis:* (B) Two-way ANOVA with Bonferroni post-test compared to LT-IIc and (C,D) Two-tailed T-test compared to OVA alone. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 2. LT-IIb and LT-IIc induce less inflammatory neutrophil infiltrate than LT-I at the site of injection. (A) H&E stained sections of injection site cutaneous tissue after 48 hrs. (B) Visual quantification of infiltrating cells and neutrophils per high field (400x) at 48 hrs post injection. (C) Myeloperoxidase reaction in skin homogenates obtained after 48 hrs post injection. *Statistical Analysis:* (B, C) One-way ANOVA with Bonferroni post-test. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 3. LT-IIb and LT-IIc enhance humoral responses and are equivalent to LT-I. (A) Immunization and serum sample collection timeline. (B) Total OVA-specific serum IgG levels on day 14 and 30 post vaccination. *Statistical analysis:* (A,B) Two-tailed T-test. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$

Figure 4. Enhancement of CD8⁺ T cell expansion by LT-IIb, LT-IIc, and LT-I after ID immunization. (A) Representative flow analysis of OVA-specific CD8⁺ T cells identified by MHC-dextramers 7 days after HLT adjuvanted immunization. Cells gated on CD3⁺CD8⁺ cells. Only CD44^{hi}Dextramer⁺ cells were gated as OVA-specific to ensure T cells were Ag experienced. (B, C) OVA-specific CD8⁺ T cells from PBMCs after 7 and 18 days post immunization, respectively. *Statistical analysis:* (B,C) One-way ANOVA with Bonferroni post-test compared to OVA unless otherwise noted. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 5. Enhancement of CD8⁺ T cell function by LT-IIb, LT-IIc, and LT-I after ID immunization. (A) Representative IFN γ intracellular staining analysis by flow cytometry 7 days after primary immunization. (B) Percentage of IFN γ ⁺ CD8⁺ T cells at 7 days post vaccination after *ex vivo* stimulation with MHC-I specific OVA peptide SIINFEKL (black) or media alone (white). (C) Representative histograms of CFSE^{low} (0.5 μ M) cells to CFSE^{high} (5 μ M) peptide label cells found in the spleen of immunized mice 20 hrs after transfer. (D) Cell killing after *in vivo* cytotoxic challenge with SIINFEKL pulsed syngeneic splenocytes at 7 days after secondary immunization (day 21). Percent killing as the ratio of CFSE^{low} (control) to CFSE^{high} (target) cells. *Statistical analysis:* (B,D) One-way ANOVA with Bonferroni post-test compared to OVA alone. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

Figure 6. Modulation of dendritic cells in the cutaneous draining lymph node (inguinal) by LT-IIb, LT-IIc, and LT-I after ID vaccination. (A) Expression of CD80 and (B) MHC-I by all CD11c⁺MHC-II⁺ dendritic cells. (C) Expression of CD80 and (D) MHC-I by the CD8α⁺ DC subset. *Statistical Analysis:* (A-D) Two-tailed T-test compared to OVA Alone unless otherwise noted. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$.

CITATIONS

1. Arce, S., H. F. Nawar, M. W. Russell, and T. D. Connell. 2005. Differential binding of *Escherichia coli* enterotoxins LT-IIa and LT-IIb and of cholera toxin elicits differences in apoptosis, proliferation, and activation of lymphoid cells. *Infect Immun* 73:2718-2727.
2. Barnighausen, T., D. E. Bloom, D. Canning, A. Friedman, O. S. Levine, J. O'Brien, L. Privor-Dumm, and D. Walker. 2011. Rethinking the benefits and costs of childhood vaccination: the example of the *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Vaccine* 29:2371-2380.
3. Berenson, C. S., H. F. Nawar, H. C. Yohe, S. A. Castle, D. J. Ashline, V. N. Reinhold, G. Hajishengallis, and T. D. Connell. 2010. Mammalian cell ganglioside-binding specificities of *E. coli* enterotoxins LT-IIb and variant LT-IIb(T13I). *Glycobiology* 20:41-54.
4. Bloom, D. E. 2011. The value of vaccination. *Adv Exp Med Biol* 697:1-8.
5. Bradley, P. P., D. A. Priebat, R. D. Christensen, and G. Rothstein. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* 78:206-209.
6. Calabro, S., M. Tortoli, B. C. Baudner, A. Pacitto, M. Cortese, D. T. O'Hagan, E. De Gregorio, A. Seubert, and A. Wack. 2011. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29:1812-1823.
7. Connell, T. D. 2007. Cholera toxin, LT-I, LT-IIa and LT-IIb: the critical role of ganglioside binding in immunomodulation by type I and type II heat-labile enterotoxins. *Expert Rev Vaccines* 6:821-834.
8. Greene, C. J., C. M. Chadwick, L. M. Mandell, J. C. Hu, J. M. O'Hara, R. N. Brey, 3rd, N. J. Mantis, and T. D. Connell. 2013. LT-IIb(T13I), a Non-Toxic Type II Heat-Labile Enterotoxin, Augments the Capacity of a Ricin Toxin Subunit Vaccine to Evoke Neutralizing Antibodies and Protective Immunity. *PLoS One* 8:e69678.
9. Hildner, K., B. T. Edelson, W. E. Purtha, M. Diamond, H. Matsushita, M. Kohyama, B. Calderon, B. U. Schraml, E. R. Unanue, M. S. Diamond, R. D. Schreiber, T. L. Murphy, and K. M. Murphy. 2008. *Batf3* deficiency reveals a critical role for CD8 α ⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322:1097-1100.
10. Koup, R. A., and D. C. Douek. 2011. Vaccine design for CD8 T lymphocyte responses. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 1:a007252.
11. Lasaro, M. A., C. Mathias-Santos, J. F. Rodrigues, and L. C. Ferreira. 2009. Functional and immunological characterization of a natural polymorphic variant of a heat-labile toxin (LT-I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *FEMS immunology and medical microbiology* 55:93-99.
12. Levine, O. S., D. E. Bloom, T. Cherian, C. de Quadros, S. Sow, J. Wecker, P. Duclos, and B. Greenwood. 2011. The future of immunisation policy, implementation, and financing. *Lancet* 378:439-448.
13. Lu, F., and H. Hogenesch. 2013. Kinetics of the inflammatory response following intramuscular injection of aluminum adjuvant. *Vaccine* 31:3979-3986.
14. Martin, M., D. J. Metzger, S. M. Michalek, T. D. Connell, and M. W. Russell. 2000. Comparative analysis of the mucosal adjuvanticity of the type II heat-labile enterotoxins LT-IIa and LT-IIb. *Infect Immun* 68:281-287.
15. Mathias-Santos, C., J. F. Rodrigues, M. E. Sbrogio-Almeida, T. D. Connell, and L. C. Ferreira. 2011. Distinctive immunomodulatory and inflammatory properties of the *Escherichia coli* type II heat-labile enterotoxin LT-IIa and its B pentamer following intradermal administration. *Clin Vaccine Immunol* 18:1243-1251.

16. Mathias-Santos, C., J. F. Rodrigues, M. E. Sbrogio-Almeida, T. D. Connell, and L. C. Ferreira. 2011. Distinctive immunomodulatory and inflammatory properties of the *Escherichia coli* type II heat-labile enterotoxin LT-IIa and its B pentamer following intradermal administration. *Clin Vaccine Immunol* 18:1243-1251.
17. Meza-Sanchez, D., G. Perez-Montesinos, J. Sanchez-Garcia, J. Moreno, and L. C. Bonifaz. 2011. Intradermal immunization in the ear with cholera toxin and its non-toxic beta subunit promotes efficient Th1 and Th17 differentiation dependent on migrating DCs. *Eur J Immunol* 41:2894-2904.
18. Nawar, H. F., C. S. Berenson, G. Hajishengallis, H. Takematsu, L. Mandell, R. L. Clare, and T. D. Connell. 2010. Binding to gangliosides containing N-acetylneuraminic acid is sufficient to mediate the immunomodulatory properties of the nontoxic mucosal adjuvant LT-IIb(T13D). *Clin Vaccine Immunol* 17:969-978.
19. Nawar, H. F., C. J. Greene, C. H. Lee, L. M. Mandell, G. Hajishengallis, and T. D. Connell. 2011. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family, exhibits potent immunomodulatory properties that are different from those induced by LT-IIa or LT-IIb. *Vaccine* 29:721-727.
20. Nawar, H. F., N. D. King-Lyons, J. C. Hu, R. C. Pasek, and T. D. Connell. 2010. LT-IIc, a new member of the type II heat-labile enterotoxin family encoded by an *Escherichia coli* strain obtained from a nonmammalian host. *Infect Immun* 78:4705-4713.
21. Nicolas, J. F., and B. Guy. 2008. Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Rev Vaccines* 7:1201-1214.
22. Torti, N., S. M. Walton, K. M. Murphy, and A. Oxenius. 2011. Batf3 transcription factor-dependent DC subsets in murine CMV infection: differential impact on T-cell priming and memory inflation. *Eur J Immunol* 41:2612-2618.
23. Vitoriano-Souza, J., N. Moreira, A. Teixeira-Carvalho, C. M. Carneiro, F. A. Siqueira, P. M. Vieira, R. C. Giunchetti, S. A. Moura, R. T. Fujiwara, M. N. Melo, and A. B. Reis. 2012. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One* 7:e40745.
24. Wherry, E. J., and R. Ahmed. 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol* 78:5535-5545.
25. Zoetewij, J. P., D. E. Epperson, J. D. Porter, C. X. Zhang, O. Y. Frolova, A. P. Constantinides, S. R. Fuhrmann, M. El-Amine, J. H. Tian, L. R. Ellingsworth, and G. M. Glenn. 2006. GM1 binding-deficient exotoxin is a potent noninflammatory broad spectrum intradermal immunoadjuvant. *J Immunol* 177:1197-1207.