MARIANA DE JESUS CINTRA

**IMPACTO DA IMUNIDADE PRÉVIA NOS EFEITOS
ADJUVANTES DA TOXINA TERMO-LÁBIL (LT) DE *Escherichia*
coli ENTEROTOXIGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2015

MARIANA DE JESUS CINTRA

**IMPACTO DA IMUNIDADE PRÉVIA NOS EFEITOS
ADJUVANTES DA TOXINA TERMO-LÁBIL (LT) DE *Escherichia*
coli ENTEROTOXIGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Luís Carlos de Souza
Ferreira

Versão original

São Paulo
2015

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

Cintra, Mariana de Jesus.

Impacto da imunidade prévia nos efeitos adjuvantes da toxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica / Mariana de Jesus Cintra. -- São Paulo, 2015.

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

Dissertação (Mestrado) – 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: Impact of previous immunity in the adjuvants effects enterotoxigenic *Escherichia coli* heat labile toxin (LT).

1. Adjuvantes imunológicos 2. Anticorpos 3. Inflamação 4. Vacinas
5. Toxina termo-lábil 6. Resposta humoral 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/SBIB0123/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mariana de Jesus Cintra.

Título da Dissertação: Impacto da imunidade prévia nos efeitos adjuvantes da toxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

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 **006** nas fls. **03** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Luís Carlos de Sousa Ferreira**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Impacto da imunidade prévia nos efeitos adjuvantes da toxina termo-lábil (LT) de Escherichia coli enterotoxigênica*" do qual participam o(s) aluno(s), **Mariana de Jesus Cintra** 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 **19.03.2013, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 26 de março de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho

**À minha família,
Por todo o apoio, dedicação e carinho.
Ao Lúcio,
Pelo companheirismo e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

Essa dissertação é resultado de muito esforço e dedicação não só de minha parte, como de diversas pessoas. Meus sinceros agradecimentos:

Ao professor Luís, pela orientação, liderança e ensinamentos no caminho da ciência, possibilitando a realização deste trabalho. A admiração cresceu a cada dia deste mestrado.

À co-orientação da pesquisadora Dra. Juliana Falcão Rodrigues, por incentivar, ensinar e mostrar que a pesquisa vai muito além do que eu imaginava. Ju, muito obrigada!

À Deni, pela amizade, ajuda, colaboração, paciência e milhares de outras qualidades que me trouxeram conforto e me fizeram sentir um carinho imenso por você. À Naomi, pequena grande mulher, pela amizade e companheirismo de sempre. À Camila Santos, por toda a ajuda, ensinamentos e amizade. Vocês são demais!

À professora Rita, por sempre ter uma palavra de apoio.

À professora Bete Sbrogio, pelos conselhos científicos e pessoais, e por sempre alegrar nosso dia com uma boa comida.

Aos amigos do laboratório, Bruna, Marcinha, Cariri, Mari Diniz, Renatinha, Jamile, Milene, Rafael, Wilson, Natiely, Ewerton, Naína, Luana, Rúbens, Carol Bertelli, Amanda, Carina, Laís, Carol Moreno, Vítor, Sérgio, Gisela, Hélic, Dalva, Mariângela e André por todas as sugestões, desabafos e momentos de descontração. Em especial à Mônica, Sara, Lennon, Eduardo e Robert: verdadeiros anjos de jaleco!

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao pessoal dos biotérios dos Departamentos de Parasitologia e Microbiologia: Sandra, Juliane, Daniele, Luís, Anderson e Carlos, pelo zelo e dedicação com os animais.

Aos meus amigos da vida inteira: Jac e Flávia, pela amizade sincera de tantos anos. Day, minha tchuquinha, pelo companheirismo e pelas conversas filosóficas (ou não!). Ao Tiago, à Juliana, Taís e Nathália, amigos e companheiros de todas as horas. Amo vocês!

À querida família Biazzo, pelo apoio, acolhimento e carinho. Vocês são muito especiais para mim.

Aos meus avós, Osvaldo e Maria, por todas as histórias contadas e poesias recitadas; e Madalena, que conseguia resumir tanto carinho palavra “Nona”.

Ao meu irmão, Juninho, a melhor pessoa que eu conheço, meu orgulho e amigo de todas as horas; à minha cunhada, Fabiana, por ser um exemplo de pessoa, pelo amor por mim e pela minha família; e à ambos, por terem me presenteado com o Davi, alegria da minha vida. Amo muito vocês!

Ao Lúcio, a melhor pessoa que eu poderia encontrar para dividir a vida. Sempre presente, carinhoso e compreensivo em todos os momentos. Meu parceiro e melhor amigo, muito obrigada por me fazer feliz, por estar sempre ao meu lado e por me ajudar a alcançar meus objetivos. Amo muito você!

Aos meus pais, Maria e Abson, meus maiores e melhores exemplos, por tudo que sou e tenho. Por sonharem e percorrerem todos os caminhos comigo. Tudo foi, é e sempre será por vocês, os amores da minha vida.

Este trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira, no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Centro de Vacinas e Terapia Gênica (CEVAT – GENE 4), no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“The Creator had a lot of remarkably good ideas when he put the world together, but making it understandable hadn’t been one of them.”

Terry Pratchett

RESUMO

CINTRA, M. J. **Impacto da imunidade prévia nos efeitos adjuvantes da toxina termo-lábil (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica.** 2015. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

As toxinas LT são fatores associados à virulência expressos por linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, porém também são amplamente estudadas como adjuvantes vacinais capazes de estimular a indução de respostas imunológicas contra antígenos coadministrados. Apesar do conhecimento sobre o comportamento imunológico de LT, não se sabe se a exposição prévia à toxina afeta sua atividade adjuvante em imunizações subsequentes. Assim, o presente estudo avaliou o impacto da imunidade pré-existente nas propriedades inflamatórias e adjuvantes da LT. Como antígeno modelo para o presente estudo empregamos a proteína não estrutural 1 (NS1) do vírus dengue do tipo 2 (DENV-2) e duas abordagens experimentais. A primeira consistiu na incubação *in vitro* de LT purificada com anticorpos anti-LT ou com o receptor GM1 seguido por administração pela via subcutânea, em conjunto com a proteína NS1, em camundongos não imunizados. A segunda abordagem empregou camundongos previamente expostos à LT e posteriormente imunizados com NS1 coadministrada à LT pela via subcutânea. Foram avaliados os efeitos inflamatórios induzidos localmente após a administração de LT por meio da quantificação do recrutamento de neutrófilos e de citocinas pró-inflamatórias presentes no sítio de injeção. Os efeitos adjuvantes foram medidos pela magnitude e pela modulação da resposta de anticorpos séricos NS1-específicos. Os resultados demonstraram que a exposição de LT a anticorpos específicos não alterou o recrutamento de neutrófilos, mas aumentou a concentração de algumas citocinas pró-inflamatórias. Além disto, o tratamento da toxina com o receptor GM1 levou à redução dos efeitos inflamatórios com redução de edema, recrutamento de neutrófilos e produção de citocinas pró-inflamatórias. Por outro lado, a presença de imunidade prévia contra a toxina, medida tanto em condições *in vitro* como *in vivo*, não afetou a adjuvanticidade de LT, como demonstrado pelos títulos de IgG antígeno-específicos, assim como pela modulação da resposta de subclasses de IgG sérico após administração por via parenteral. No entanto, o tratamento da LT com GM1 causou uma significativa mudança na modulação imunológica com a indução de um padrão menos polarizado para o perfil Th17. Nossos

resultados indicam, portanto, que a imunidade prévia contra a LT não afeta seu potencial inflamatório e atividade adjuvante frente a antígenos coadministrados por via parenteral. Por outro lado, a exposição ao receptor GM1 mostrou ser capaz de reduzir as reações inflamatórias locais induzidas pela LT sem, no entanto, reduzir seus efeitos adjuvantes, fato este que pode ter impactos importantes no emprego clínico de LT como adjuvante vacinal.

Palavras-chave: Adjuvantes. Toxina termo-lábil. Anticorpos. Inflamação. Resposta humoral.

ABSTRACT

CINTRA, M. J. **Impact of previous immunity in the adjuvant effects of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat labile toxin (LT)**. 2015. 83 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

LT toxins are virulence-associated factors expressed by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains but they have been extensively investigated as vaccine adjuvants capable to induce strong immune responses against co-administered antigens. Despite the extensive knowledge of the LT immunological behavior, it is unclear whether previous exposure to LT affects its adjuvant activities during subsequent immunization. Thus, the present study evaluated the impact of preexisting immunity in the inflammatory and adjuvant properties of LT. As a model antigen we employed the non-structural protein 1 (NS1) of the type 2 dengue virus (DENV-2) and two experimental strategies. One approach consisted on *in vitro* incubation of LT with LT-specific antibodies or with GM1 receptor before subcutaneously administration, in combination with the NS1 protein, to naïve mice. The second approach employed mice previously exposed to LT and subsequently immunized via the subcutaneous route with NS1 admixed with LT. The inflammatory properties were evaluated by quantification of neutrophil recruitment and proinflammatory cytokines at the injection site. The adjuvant effects were evaluated through the magnitude and modulation of the NS1-specific serum antibody response. The results demonstrated that treatment of LT with specific antibodies did not alter the neutrophils recruitment, but increased the levels of some proinflammatory cytokines. Treatment of LT with GM1 resulted in a marked decrease of the inflammatory effects, with decrease of the edema size, neutrophils recruitment and expression of proinflammatory cytokines. In addition, previously established immunity to LT, either at *in vitro* or *in vivo* conditions, did not affect the adjuvant activity of the toxin, as demonstrated by the antigen-specific IgG titers, as well as modulation of the serum IgG subclass responses after parenteral administration. On the other hand, incubation of LT with GM1 caused a significant shift in the cytokine secretion pattern promoting a less polarized Th17 immune response pattern. Thus, our results indicate that previously established immunity to LT did not affect the inflammatory activities and the magnitude of the induced antibody responses to co-administered antigens after delivery via parenteral administration routes. Furthermore, the previous treatment of LT

with GM1 was capable of reducing the local inflammatory reactions without affecting the toxin adjuvant effects, a fact that may impact the clinical use of LT as a vaccine adjuvant.

Keywords: Adjuvants. Heat-labile toxin. Antibodies. Inflammation. Humoral response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da toxina termo-lábil de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica.....	27
Figura 2 - Ilustração esquemática do mecanismo intracelular da toxina termo-lábil tipo 1 (LT1) de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).	27
Figura 3 - Avaliação da integridade estrutural da toxina LT.....	44
Figura 4 - Esquema de imunização com a toxina LT para a determinação da cinética de produção de anticorpos LT-específicos.....	45
Figura 5 - Cinética de produção de anticorpos anti-LT.....	45
Figura 6 - Neutralização <i>in vitro</i> da toxina LT com anticorpos anti-LT gerados nos animais imunizados..	47
Figura 7 - Neutralização <i>in vitro</i> da toxina LT com o receptor GM1 solúvel.....	48
Figura 8 - Cinética de edemaciamento no sítio de inoculação de LT1 (via subcutânea)	49
Figura 9 - Tamanho dos edemas no sítio de injeção de LT.....	50
Figura 10 - Avaliação quantitativa do infiltrado de neutrófilos no sítio de injeção de LT.	51
Figura 11 - Avaliação da concentração de citocinas inflamatórias presentes no sítio de injeção em camundongos da linhagem BALB/c.	53
Figura 12 - Avaliação da concentração de citocinas inflamatórias presentes no sítio de injeção em camundongos da linhagem C57BL/6	54
Figura 13 - Purificação da proteína NS1	55
Figura 14 - Esquema de imunização da estratégia de neutralização <i>in vitro</i> da LT	57
Figura 15 - Avaliação do impacto da incubação prévia da LT com anticorpos específicos ou com o receptor GM1 na imunogenicidade da toxina.....	58
Figura 16 - Avaliação do impacto da imunização prévia na modulação das subclasses de IgG induzidas contra a toxina.	59
Figura 17 - Avaliação do impacto da neutralização prévia na potência da atividade adjuvante humoral da toxina.....	60
Figura 18 - Avaliação do impacto da neutralização prévia da LT na modulação das subclasses de IgG induzida pela toxina	61
Figura 19 - Análise do impacto da incubação prévia de LT com anticorpos específicos e com o receptor GM1 na produção de citocinas após as imunizações	62
Figura 20 - Esquema de imunização referente à estratégia <i>in vivo</i>	63

Figura 21 - Avaliação do impacto dos anticorpos anti-LT na imunogenicidade da toxina.....	64
Figura 22 - Avaliação do impacto dos anticorpos anti-LT na modulação das subclasses de IgG induzida pela toxina.....	65
Figura 23 - Avaliação do impacto dos anticorpos anti-LT na atividade adjuvante da toxina	66
Figura 24 - Avaliação do impacto dos anticorpos anti-LT na modulação das subclasses de IgG induzida pela toxina.....	67
Figura 25 - Análise do impacto da administração prévia de LT na produção de citocinas após as imunizações.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Adjuvantes vacinais aprovados para uso em seres humanos ou já utilizados em testes clínicos.....	24
Tabela 2 - Denominações dos grupos de imunizações, por via subcutânea, da estratégia de neutralização <i>in vivo</i> ..	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> (citotoxicidade celular mediada por anticorpo)
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i> (adenosina difosfato)
AMPc	<i>Cyclic adenosinemonophosphate</i> (monofosfato cíclico de adenosina)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (análise de Variância)
APC	<i>Antigen presenting cells</i> (células apresentadoras de antígeno)
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (grupo de diferenciação)
CD4 ⁺	<i>Cluster of differentiation 4⁺</i> (grupo de diferenciação)
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i> (grupo de diferenciação)
CD8 ⁺	<i>Cluster of differentiation 8⁺</i> (grupo de diferenciação)
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
CT	<i>Cholera toxin</i> (toxina colérica)
DC	<i>Dendritic cells</i> (células dendríticas)
DENV	<i>Dengue virus</i> (vírus da dengue)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i> (Meio eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
ELISA	<i>Enzyme linkedimmunosorbentassay</i> (ensaio imunoabsorvente ligado à enzima)
ETEC	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica)
FA	Adjuvantes de Freund
GD1a	<i>Disialoganglioside 1a</i> (disialogangliosídeo 1a)
GD1b	<i>Disialoganglioside 1b</i> (disialogangliosídeo 1b)
GM1	<i>Monosialotetrahexosylganglioside</i> 1 (monosialotetrahexosilgangliosídeo 1)
GM2	<i>Monosialotetrahexosylganglioside</i> 2 (monosialotetrahexosilgangliosídeo 2)

GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> (guanosina trifosfato)
G α	<i>α-subunit of the stimulatory G protein</i> (subunidade alfa da proteína G estimulatória)
HAV	<i>Hepatitis A Virus</i> (Vírus da Hepatite A)
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> (Vírus da Hepatite B)
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> (molécula de adesão intracelular 1)
IL	Interleucina
IFN γ	<i>Interferon gamma</i> (interferon gama)
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2a de imunoglobulina G
IgG2b	Subclasse tipo 2b de imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1thiogalactopyranoside</i> (isopropil β -D-1 tiogalactopiranosídeo)
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	<i>Heat-labile toxin</i> (toxina termo-lábil)
LAL	<i>Limulus ameocyte lysate</i> (lisado do amebócito de Limulus)
MHC II	<i>Major histocompatibility complex class II</i> (complexo principal de histocompatibilidade classe II)
MPO	Enzima Mieloperoxidase
NAD $^{+}$	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> (nicotinamida adenina dinucleotídeo)
Nlrp3	<i>NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>

NS1	<i>Non-structural protein 1</i> (proteína não-estrutural 1)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato-salino)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SFB	Soro fetal bovino
TB	<i>Terrific Broth</i> (caldo ótimo)
Th1	<i>Helper T cells 1</i> (células T auxiliaadoras 1)
Th2	<i>Helper T cells 2</i> (células T auxiliaadoras 2)
Th17	<i>Helper T cells 17</i> (células T auxiliaadoras 17)
TLR	<i>Toll-like receptor</i> (receptor do tipo toll)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
vc	Volume de coluna

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
cm	Centímetro
DO _{600nm}	Densidade ótica a 600 nanômetros
EU	Unidade endotóxica
G	Força centrífuga relativa (RCF) ou força gravitacional
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramma
mg/mL	Miligramma/mililitro
min	Minuto
mL	Mililitro
nM	Nanomolar
pH	Potencial de hidrogênio
pb	Pares de bases
psi	<i>Pound force per square inch</i> (libra força por polegada quadrada)
rpm	Rotação por minuto
μL	Microlitro
μg/μL	Microgramma/microlitro
μm	Micrometro
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Vacinas e adjuvantes	23
1.2	A toxina termo-lábil 1 (LT) de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC) e sua atividade adjuvante.....	26
1.3	A dengue e a proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue tipo 2 (DENV2).....	30
2	OBJETIVO.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1	Expressão e purificação da proteína LT1.....	33
3.1.1	<i>Expressão da proteína LT1</i>	33
3.1.2	<i>Purificação da proteína LT1</i>	33
3.2	Determinação da cinética de produção de anticorpos anti-LT.....	34
3.3	Determinação da funcionalidade de anticorpos anti-LT e do receptor GM1 (Citotoxicidade <i>in vitro</i>)	34
3.4	Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração subcutânea da toxina LT	35
3.4.1	<i>Remoção e quantificação de lipolissacarídeo (LPS) presente na toxina utilizada nos ensaios de inflamação</i>	35
3.4.2	<i>Cinética de edemaciamento do sítio de inoculação da toxina</i>	35
3.4.3	<i>Dosagem dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele</i>	36
3.4.4	<i>Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias presentes no sítio de inoculação da toxina</i>	37
3.5	Expressão e purificação da proteína NS1	37
3.5.1	<i>Expressão da proteína NS1</i>	37
3.5.2	<i>Renaturação da proteína NS1 por diluição pulsada</i>	38
3.5.3	<i>Purificação da proteína NS1</i>	38
3.6	Western blot.....	39
3.7	Avaliação do impacto da imunidade prévia na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina LT	39
3.7.1	<i>Avaliação do impacto da incubação in vitro da toxina com anticorpos anti-LT e com o receptor GM1 na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina</i>	39
3.7.2	<i>Avaliação in vivo do impacto de anticorpos anti-LT na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina</i>	40
3.7.3	<i>Titulação de anticorpos anti-NS1 por ELISA</i>	41
3.7.4	<i>Titulação de anticorpos anti-LT por ELISA</i>	41
3.7.5	<i>Análise do perfil de citocinas</i>	42
3.8	Análises estatísticas	42

4	RESULTADOS	44
4.1	Análise da integridade da toxina LT.....	44
4.2	Determinação da cinética de produção de anticorpos anti-LT.....	44
4.3	Determinação da funcionalidade de anticorpos anti-LT e do receptor GM1 (Citotonicidade <i>in vitro</i>)	46
4.4	Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração subcutânea da toxina LT	48
4.4.1	<i>Cinética de edemaciamento do sítio de inoculação da toxina.....</i>	49
4.4.2	<i>Dosagem dos níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) em biópsias de pele .....</i>	50
4.4.3	<i>Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias presentes no sítio de inoculação da toxina .....</i>	51
4.5	Purificação da proteína NS1	54
4.6	Avaliação do impacto da presença de anticorpos anti-LT na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina LT	56
4.6.1	<i>Avaliação do impacto da incubação in vitro da toxina com anticorpos anti-LT ou com o receptor GM1 na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina .....</i>	56
4.6.2	<i>Avaliação in vivo do impacto de anticorpos anti-LT na imunogenicidade e atividade adjuvanteda toxina .....</i>	63
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vacinas e adjuvantes

Vacinas são preparações contendo antígenos de natureza infecciosa ou não, que quando administradas a indivíduos, induzem imunidade protetora contra infecções microbianas ou doenças degenerativas. Os antígenos presentes em formulações vacinais podem ser apresentados ao organismo como: (i) microrganismos vivos, mas não virulentos (atenuados); (ii) microrganismos mortos; (iii) plasmídeos capazes de codificar um antígeno alvo; ou (iv) proteínas ou polissacarídeos purificados (ABBAS; LICHTMAN, 2005). As formulações vacinais que empregam proteínas purificadas, ou vacinas de subunidade, são consideradas mais seguras do que as vacinas baseadas em microrganismos atenuados, já que não há o risco de reversão à virulência. Adicionalmente, com o advento da engenharia genética, a produção de antígenos recombinantes derivados de patógenos virais, fúngicos, bacterianos e parasitários, bem como antígenos de natureza não infecciosa como antígenos tumorais, tornou-se tarefa relativamente simples. Apesar das vantagens acima citadas, vacinas de subunidade frequentemente são pouco imunogênicas e falham na indução de imunidade protetora em testes experimentais. Esse fenômeno se deve principalmente ao fato de que durante o processo de purificação de antígenos são perdidas substâncias que mimetizam, direta ou indiretamente, ao hospedeiro uma situação de perigo, ou seja, um processo inflamatório que leva o sistema imunológico a responder contra o antígeno alvo. Por todos esses aspectos, a incorporação de compostos adjuvantes nestas formulações é essencial para que se alcance uma resposta imunológica satisfatória (MADIGAN et al., 2010; PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

Adjuvantes são substâncias que quando coadministradas, conjugadas quimicamente ou fusionadas a antígenos alvos, são capazes de estimular o sistema imunológico e de amplificar, modular ou prolongar a imunogenicidade intrínseca dos mesmos, melhorando a eficácia das vacinas (DA HORA et al., 2011; MOTA; LIMA; MELO, 2006; RESENDE et al., 2004). Os adjuvantes podem atuar no sistema imunológico do hospedeiro por diferentes formas, como: (i) indução da resposta inflamatória no local da inoculação levando à ativação de células do sistema imunológico inato; (ii) aumento da exposição das células imunológicas ao antígeno como, por exemplo, pela formação de um depósito no local da inoculação, promovendo sua liberação gradual e aumento do tempo de permanência do antígeno no sítio de inoculação;

(iii) alteração das respostas imunológicas tornando-as mais rápidas e duradouras pela ativação de células imunológicas de memória; (iv) modulação da qualidade e da especificidade das respostas do sistema imunológico adquirido; e, em alguns casos, (vi) atuação no sistema imunológico de mucosas (RESENDE et al., 2004).

Os adjuvantes são também incluídos em formulações vacinais quando se deseja empregar uma menor quantidade de antígeno, reduzir o impacto da competição antigênica (no caso de formulações multivalentes) e para contornar as dificuldades encontradas na indução de respostas imunológicas em populações específicas, como idosos, crianças, portadores de doenças crônicas e imunocomprometidos. No entanto, para que um adjuvante seja adequado para uso em seres humanos e animais é necessário que: (i) não apresente reações locais severas, bem como causar reações prejudiciais a médio e longo prazo, (ii) não deixe resíduos no sítio de injeção por tempo prolongado, (iii) seja compatível com antígenos vacinais de natureza diversa, e (iv) ser de fácil obtenção/produção (O'HAGAN; GREGORIO, 2009). Apesar da sua evidente importância, poucos adjuvantes estão aprovados para o uso em seres humanos (Tabela 1).

Tabela 1 - Adjuvantes vacinais aprovados para uso em seres humanos ou já utilizados em testes clínicos.

Adjuvante	Classe	Vacina
<i>Adjuvantes licenciados para uso em humanos</i>		
AF03	Emulsão óleo-em-água	Influenza
Alúmen	Sal mineral	Difteria, tétano, pneumococos, etc.
AS03	Emulsão óleo-em-água	Influenza
AS04	Agonista de TLR4 adsorvido em alúmen	HBV, HPV
MF59	Emulsão óleo-em-água	Influenza
RC-529	Agonista de TLR4	HBV
Virossomos	Lipossomos	HAV

Adjuvantes usados em testes clínicos, mas ainda não aprovados para uso em humanos

AS01	Agonista de TLR4	Malária
AS02	Agonista de TLR4	Malária, tuberculose, câncer
AS15	Agonista de TLR4 e TLR9	Câncer
CpG 1018	Agonista de TLR9	HBV, Câncer
CpG 7909	Agonista de TLR9	HBV, Influenza
Flagelina	Agonista de TLR5	Influenza
IC31	Agonista de TLR9	Tuberculose
Imiquimod	Agonista de TLR7	Câncer
LT	Toxina bacteriana	Influenza, ETEC
LTK63	Toxina bacteriana	Influenza, tuberculose, HIV
Montanide ISA51	Emulsão óleo-em-água	Malária, HIV, câncer
Montanide ISA720	Emulsão óleo-em-água	Malária, HIV, câncer

Fonte: DE GREGORIO; CAPRONI; ULMER, 2013.

Em relação aos mecanismos de ação, os adjuvantes podem ser divididos em imunopotencializadores e em sistemas de entrega. Os imunopotencializadores atuam diretamente sobre as células imunológicas, levando à sua ativação, como, por exemplo, produtos bacterianos (que incluem toxinas, porções da parede celular e flagelina, entre outros), citocinas purificadas e ácidos nucleicos. Os sistemas de entrega direcionam os antígenos para reconhecimento e processamento pelas células do sistema imunológico e dentro dessa categoria podemos citar os lipossomas, os agentes surfactantes, as emulsões e as micropartículas sintéticas. Vale ressaltar que determinados compostos possuem ambas as características, funcionando tanto como imunopotencializadores quanto como sistemas de entrega, como, por exemplo, os sais de alumínio (DA HORA et al., 2011; O'HAGAN; GREGORIO, 2009; PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005). Outra classe de moléculas

pode atuar tanto como imunopotencializadores como vetores de entrega, como certas toxinas bacterianas, que embora sejam reconhecidas como potentes imunoestimuladores, podem atuar também como sistemas de entrega quando os antígenos são fusionados a elas (COX et al., 2006).

1.2 A toxina termo-lábil 1 (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e sua atividade adjuvante

Em estudos relacionados ao uso de toxinas como adjuvantes, destaca-se o interesse pela toxina termo-lábil produzida por linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas. As LTs pertencem à família de enterotoxinas bacterianas do tipo AB5. Essas toxinas são caracterizadas por apresentar uma subunidade A1 enzimaticamente ativa (28 kDa) ligada não-covalentemente pelo domínio A2 (uma α -hélice) a um pentâmero composto por 5 polipeptídeos B (11,5 kDa cada monômero) (SIXMA et al., 1993) (Figura 1). A subunidade B tem como função ligar-se a receptores presentes na superfície das células alvo. No caso da LT, essa ligação ocorre com alta afinidade ao gangliosídeo GM1 e com menor afinidade a outros glicoesfingolipídeos, tais como GD1a, GD1b, GM2 e outros paraglobosídeos e glicoproteínas de superfície (FUKUTA et al., 1988). Após a ligação da subunidade B ao receptor presente nos enterócitos, a holotoxina é internalizada em vesículas e levada até o complexo de Golgi, onde a subunidade A e a subunidade B são dissociadas. A subunidade B será posteriormente degradada, enquanto a subunidade A é transportada para o retículo endoplasmático (RE). A ponte dissulfídica que liga os domínios A1 e A2 é reduzida e o fragmento A1, agora enzimaticamente ativo, é liberado no citoplasma e passa a transferir o radical ADP-ribosil do cofator NAD^+ para a subunidade alfa da proteína estimuladora GTP-ligante ($\text{G}\alpha$), que se localiza na membrana plasmática (BASTIAENS et al., 1996; RAPPUOLI et al., 1999). Uma vez ativada, a proteína G se associa ao complexo enzimático adenilato ciclase, resultando em sua estimulação constitutiva e aumentando, consequentemente, os níveis de AMP cíclico (AMPc) intracelular. Em seguida, a proteína quinase dependente de AMPc (PKA – protein kinase A) é ativada, levando à fosforilação anormal dos canais de cloro e de sódio, o que culmina na liberação de íons de Cl^- e na inibição de absorção de íons Na^+ , bem como no transporte passivo de água para o lúmen intestinal. O acúmulo de íons e água no intestino caracteriza a diarreia aquosa desencadeada pela LT (KNUTTON; LLOYD; McNEISH, 1987; NATARO; KAPER, 1998) (Figura 2).

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da toxina termo-lábil de *ETEC*. Observa-se a subunidade A formada pela porção A1 globular e enzimaticamente ativa ligada covalentemente à porção A2 em alfa hélice, a qual interage com a subunidade B composta por cinco anéis polipeptídicos estruturados em forma de anel pentamérico. Fonte: Modificado de Sixma e colaboradores (1993).

Figura 2 - Ilustração esquemática do mecanismo de ação intracelular da toxina termo-lábil (LT) de *ETEC*. A subunidade B da holotoxina se liga aos receptores das células eucarióticas fazendo com que a subunidade A seja internalizada. A mesma sofre transporte retrógrado e a subunidade A1, enzimaticamente ativa, transfere o radical ADP-ribosil do cofator NAD⁺ para a subunidade alfa da proteína estimuladora GTP-ligante (Gsα) de membrana, resultando em sua permanente estimulação e aumento dos níveis de AMP cíclico (AMPc) intracelular. Este aumento, por sua vez, leva à fosforilação anormal dos canais de cloro e de sódio, o que culmina na liberação de íons de Cl⁻ e na inibição de absorção de íons Na⁺, bem como no transporte passivo de água para o lúmen intestinal, o que caracteriza a diarreia aquosa (SLONCZEWSKI; FOSTER, 2009).

Embora o mecanismo de ação de LT sobre os enterócitos, que culmina na diarreia aquosa, esteja bem esclarecido, as interações moleculares desta toxina sobre outras células alvo, bem como os alvos celulares específicos pelos quais essas moléculas medeiam suas propriedades adjuvantes, não estão definidos. Estudos demonstram que a resposta imunológica desencadeada pela LT é de perfil misto, com padrão Th1, Th2 e Th17 e, embora não haja um mecanismo de ação principal descrito que explique o aumento das respostas imunológicas contra antígenos coadministrados na presença de LT, sabe-se que a administração da toxina induz os seguintes efeitos: (i) aumento da captação de antígenos coadministrados; (ii) promoção da maturação de células dendríticas e aumento da expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86, com consequente aumento da apresentação de antígenos por estas e outras populações de células apresentadoras de antígenos (APCs); (iii) potente resposta imunológica humoral (com indução forte resposta de IgG sérico e IgA secretado na mucosa) e diferenciação dos isotipos de células B antígeno-específicos; e (iv) efeitos inibitórios e/ou estimuladores na proliferação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e na produção de citocinas de perfis Th1 e Th2 (BRAGA et al., 2014; BRERETON et al., 2011; HOLMGREN et al., 2003; RAPPUOLI et al., 1999). Tais efeitos são desencadeados quando a toxina é administrada por vias de imunização parenteral, transcutânea e de mucosa, bem como quando apresentada ao sistema imunológico sob as formas de vacina de subunidades, vacinas de DNA e vetores bacterianos (BRAGA et al., 2014; DA HORA et al., 2011; HAJISHENGALLIS et al., 2005; HU et al., 2014; SIMMONS et al., 1999; TIERNEY et al., 2003).

Além dos efeitos adjuvantes descritos para a holotoxina, a subunidade B isolada também apresenta propriedades adjuvantes em determinadas condições. A ligação da subunidade B ao receptor celular de mamíferos pode induzir alterações na composição dos agrupamentos de lipídios associados a proteínas em microdomínios da membrana externa, resultando em mudanças de transdução de sinais intracelulares que podem culminar em ativação celular, proliferação e diferenciação em vários tipos de células, incluindo células imunológicas (ARCE et al., 2005; HAAN; HIRST, 2004). Essa subunidade exerce diversos efeitos nas populações de APCs, como ativação e consequente aumento na apresentação de antígenos e migração para os linfonodos, após aumento da expressão de MHC II. Além disso, há o aumento das interações entre os linfócitos T e B, por meio da maior expressão de MHC II, da molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e de CD40 nas células B e de CD40-ligante

nas células T CD4⁺ (FREYTAG; CLEMENTS, 2005; FUJIIHASHI et al., 2002; GIULIANI et al., 1998; SIMMONS et al., 2001; WILLIAMS; DOUGAN, 2001).

Embora a holotoxina seja um adjuvante mais potente do que apenas a subunidade A, essa porção da toxina também é capaz de estimular o sistema imunológico (HAAN et al., 1998). Sabe-se que o AMPc acumulado no interior das células pela ação da atividade enzimática da toxina atua como modulador central de várias funções das células imunológicas, tais como migração, adesão, proliferação e diferenciação celular, apoptose e produção de quimiocinas e citocinas (GRANDOCH; ROSCIONI; SCHMIDT, 2010). Além disso, a proteína quinase A (PKA) ativada pelo AMPc promove proliferação e sobrevivência celular, aprendizagem e formação de memória imunológica, além de resultar em inibição ou estimulação das funções das células imunológicas e de processos inflamatórios, dependendo do estágio de diferenciação celular, do tipo de célula e dos estímulos adicionais (KAMMER, 1988; PETERS-GOLDEN, 2009). Logo, embora um quadro específico sobre efeitos imunomoduladores de LT ainda não esteja completo, não existem dúvidas sobre o importante papel da atividade enzimática na adjuvanticidade da toxina.

Além da importância da toxina do ponto de vista biotecnológico, particularmente no desenvolvimento de vacinas, sabe-se também que essa molécula é altamente imunogênica. Tal imunogenicidade é evidente mesmo quando a LT é administrada em baixas doses, sendo capaz de induzir resposta humoral contra si própria, principalmente baseada nos anticorpos IgG (incluindo as subclasses IgG1, IgG2a e IgG2b), IgA e IgM (BEHRENS et al., 2014; LASARO et al., 2009; LEE; PICKING; TZIPORI, 2014). Não há, contudo, estudos publicados que tenham determinado de forma sistematizada se a resposta induzida pela LT contra si própria, gerada em situações específicas, como, por exemplo, durante infecções por linhagens de ETEC produtoras de LT ou administração repetida em formulações vacinais com a toxina, poderia influenciar negativamente seus efeitos adjuvantes. Além disso, não se sabe se a imunidade prévia contra a LT é capaz de induzir alterações em seus efeitos inflamatórios locais, exibidos quando a toxina é inoculada por via parenteral, tais como edemas, vermelhidão, erupções cutâneas e coceiras em camundongos e seres humanos (FRECH et al., 2008; MATHIAS-SANTOS et al., 2011; ZOETEWELJ et al., 2006). Tais efeitos representam restrições para o uso da toxina como adjuvante em humanos e aparentemente estão relacionados à ativação de respostas imunológicas de perfil Th17. A LT é capaz de estimular linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 através da indução de citocinas da família IL-1 e de IL-23, bem como da ativação de caspase-1 e Nlrp-3 (ACOSTA-RODRIGUES et al., 2007; BRERETON et al., 2011; DINARELLO, 2009; IWAKURA; ISHIGAME, 2006).

1.3 A dengue e a proteína não estrutural (NS1) do vírus dengue tipo 2 (DENV2)

A dengue é atualmente a principal arbovirose a provocar doença em humanos e pode ser causada por qualquer um dos quatro sorotipos do vírus dengue, que apresentam aproximadamente 30% de divergência em suas sequências genômicas nucleotídicas. Esses vírus, transmitidos por fêmeas de mosquitos hematófagos da espécie *Aedes aegypti*, pertencem ao gênero Flavivirus da família Flaviviridae e apresentam RNA genômico de fita simples com orientação positiva, estrutura icosaédrica e envelope (FIGUEIREDO, 1999a, 1999b). Dados epidemiológicos evidenciam que a taxa de ocorrência da doença aumentou entre 30 e 50 vezes nos últimos 50 anos, e que 390 milhões de pessoas adquirem dengue por ano e pelo menos 96 milhões dos casos apresentam algum sinal de gravidade, incluindo a febre hemorrágica da dengue e a síndrome de choque da dengue (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Sabe-se que dentro desse grupo, os índices de mortalidade são de 10% entre os hospitalizados e 30% entre os não hospitalizados. Além disso, devem-se levar em consideração os custos envolvidos com hospitalizações, absentismo no trabalho e prejuízos ao turismo (BHATT et al., 2013; WHO, 2015).

A proteína NS1 do vírus dengue é uma glicoproteína de 46-50 kDa essencial na replicação, viabilidade viral e consequentemente, no aumento da carga viral no hospedeiro (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010). Essa proteína é expressa nas células infectadas tanto na forma oligomérica secretada, quanto associada à membrana plasmática. Quanto à NS1 secretada, não se sabe ao certo qual é a sua função, porém, dados da literatura tem tornado evidentes a sua relação com a patogênese da dengue e evasão do sistema imunológico, já que é tida como principal fator desencadeante das disfunções nos sistemas imunológico e circulatório do hospedeiro - provavelmente por mecanismos de autoimunidade, visto que compartilha epitopos com proteínas de superfície das células sanguíneas humanas, integrinas e proteínas da superfície de células endoteliais, além de seu papel na interferência com a cascata de ativação do sistema complemento (FALCONAR, 1997; FLAMAND et al., 1999). Assim, por ser exposta na superfície da célula infectada e apresentar epitopos direcionados às células T, uma vacina capaz de gerar uma resposta imunológica contra a NS1 poderia aumentar a resposta específica do organismo contra as células infectadas, diminuindo a carga viral. Diante do exposto, a proteína em questão se sobressai como um alvo relevante para o desenho de uma vacina bem-sucedida contra a dengue, desde que se leve em conta a

problemática associada aos anticorpos anti-NS1 (GUZMAN; VAZQUEZ, 2010; WHITEHEAD et al., 2007).

Em trabalho anterior conduzido no Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas da USP, a proteína NS1 foi empregada como antígeno em uma formulação vacinal combinada aos adjuvantes de Freund (FA), hidróxido de alumínio (alúmen) e à LT(G33D), um derivado não tóxico de LT, que possui uma mutação na subunidade B. As imunizações não geraram resposta citotóxica eficiente, porém a formulação que utilizou a LT induziu títulos de anticorpos mais altos e anticorpos com maior afinidade ao vírus (AMORIM et al., 2012). Além disso, os camundongos imunizados com formulações vacinais utilizando a LT(G33D) como adjuvante demonstraram proteção parcial contra a encefalite letal após o desafio com a linhagem New Guinea C (NGC) do DENV-2, similar à proteção conferida quando o adjuvante FA foi incorporado à formulação. No entanto, em contraste com camundongos imunizados com FA, os animais imunizados com LT(G33D) não demonstraram nenhum efeito colateral significativo, como evidenciado pelas análises de alterações hepáticas, hematológicas e reações inflamatórias (AMORIM et al., 2012).

2 OBJETIVO

A presente dissertação teve como principal objetivo avaliar se a imunidade prévia poderia comprometer os efeitos adjuvantes de LT em vacinas de subunidade administradas por via parenteral. Além disto, avaliamos também os efeitos da adição do receptor GM1 sobre as atividades adjuvantes e inflamatórias de LT. Neste sentido, foram realizados ensaios experimentais *in vitro*, no qual anticorpos anti-LT foram incorporados à LT antes de sua administração em animais, bem como ensaios *in vivo*, nos quais LT foi empregada como adjuvante em animais previamente imunizados com a toxina. Para esse intuito, foi utilizado como antígeno alvo a proteína NS1 do vírus da dengue tipo 2 (DENV2).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Expressão e purificação da proteína LT1

3.1.1 Expressão da proteína LT1

A toxina LT foi produzida e purificada pela equipe técnica do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, como segue: uma alíquota do estoque congelado da linhagem recombinante contendo o plasmídeo que codifica para proteína LT1 (RODRIGUES et al., 2011) foi inoculada em 50 mL de caldo *Terrific Broth* (TB) contendo ampicilina (200 µg/mL) e o pré-inóculo foi acondicionado em um erlenmeyer de 250 mL e incubado a 37 °C, sob agitação de 200 rpm em agitador orbital, por aproximadamente 18 horas. A cultura foi utilizada como pré-inóculo com diluição inicial de 1:100 para 3 L de meio TB distribuídos em 4 erlenmeyers e o inóculo final foi incubado a 37 °C sob agitação a 230 rpm em agitador orbital por aproximadamente 22 horas. Após esse período de incubação, a cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C.

3.1.2 Purificação da proteína LT1

A proteína LT1 foi purificada por cromatografia de afinidade em resina Galactose-gel (Pierce, Immobilized D-Galactose Gel) empacotada em coluna XK 16/20 da Amersham Biosciences (1,6 cm Ø e 20 cm altura). O processo de purificação automatizado foi realizado em aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia). A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (vc) de tampão TEAN com sal (Tris-HCL 0,5 M, EDTA 0,01 M, NaN₃ 0,03 M, NaCl 2,0 M, pH 7,4). O homogenato clarificado (500 mL) foi aplicado à coluna em um fluxo de 0,4 mL/minuto. A coluna foi lavada novamente com 5 vc de tampão TEAN com sal e foi iniciada a eluição das proteínas adsorvidas à coluna após injeção de 100% de TEAN com sal acrescido de 0,3 M de D-galactose. A coluna foi regenerada com 5 vc de solução contendo uréia 6 M, 5 vc de água ultrapura e 5 vc de água contendo 20% de etanol. A amostra correspondente ao pico obtido foi dialisada e concentrada em filtros Amicon Ultra-15 30.000 MWCO (Millipore) em tampão TEAN com sal para a retirada do eluente D-galactose. A análise de pureza da proteína foi observada em gel de poliacrilamida a 17,5%. A

quantificação da concentração de LT1 foi analisada pela medida de absorbância em espectrofotômetro (Gene Quant spectrophotometer GE Amersham Biosciences) segundo procedimento descrito por Edelhoch (1967).

3.2 Determinação da cinética de produção de anticorpos anti-LT

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade, obtidos junto ao Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP, foram utilizados para a determinação da cinética de produção de anticorpos anti-LT. Os animais foram imunizados subcutaneamente com três doses de LT purificada (1 µg) com intervalos de duas semanas entre as doses. A cada três dias, em média, o sangue dos animais foi coletado, coagulado a 37 °C por 30 minutos e o coágulo foi retraído a 4 °C por 30 minutos. Após centrifugação (3.000 x g por 15 minutos a 4 °C), o sobrenadante (soro) foi coletado e estocado a -20 °C até realização do ensaio de titulação dos anticorpos anti-LT por ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

3.3 Determinação da funcionalidade de anticorpos anti-LT e do receptor GM1 (Citotoxicidade *in vitro*)

A avaliação da atividade biológica *in vitro* da LT empregada como adjuvante nos ensaios de imunização foi realizada por meio do ensaio de citotoxicidade em cultura de células tumorais murinas Y-1. 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 o período de cultivo, o meio foi removido e a monocamada celular foi desprendida pelo contato durante um minuto com 1 mL de solução de Tripsina/EDTA 250 mg % (1:250) (Cultilab) a 37 °C. A solução de Tripsina/EDTA foi neutralizada com 1 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 ressuspensa em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e então as células foram dispensadas em placas de 96 poços (5 x 10⁴ células/poço) e incubadas a 37 °C em uma atmosfera com 5% de CO₂ por 16-18 horas. Decorrido o tempo, 1 µg de LT1 purificada

previamente incubada com soro contendo anticorpos anti-LT puro (7 µg de anticorpos/µg de LT) ou na diluição 1:10 (0,7 µg de anticorpos/µg de LT), produzido em camundongos, ou com o receptor gangliosídeo GM1 solúvel (0,5 µg/µg de LT) por 1 hora a 37 °C foi adicionada aos poços das placas contendo as células Y1 (MATHIAS-SANTOS et al., 2011; ZOETEWELJ et al., 2006). Após 8 horas de incubação a 37 °C, as células Y1 foram observadas quanto à alteração de morfologia induzida pela toxina. Como controle positivo, usamos a toxina LT não incubada com as substâncias neutralizantes e, como controle negativo, incubamos as células apenas com meio de cultura.

3.4 Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração subcutânea da toxina LT

3.4.1 Remoção e quantificação de lipolissacarídeo (LPS) presente na toxina utilizada nos ensaios de inflamação

O protocolo para a remoção do lipolissacarídeo (LPS), presente nas proteínas recombinantes provenientes do sistema de expressão em linhagens comerciais de *E. coli* (gram-negativa) foi feito em resina de poli-lisina e seguindo as especificações do fabricante (Pierce® *High-Capacity Endotoxin Removal Resin* Thermo Scientific). Para a remoção de LPS, a proteína LT1 foi mantida no tampão fosfato de sódio a 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,4. A concentração de endotoxina (EU - unidade endotóxica) presente na proteína tratada foi determinada empregando o kit *Limulus Amebocyte Lysate* LAL QCL-1000 (Lonza). As amostras apresentaram quantidades de LPS <0,017 EU/µg de proteína, ou seja, abaixo dos valores permitidos para formulações vacinais utilizando proteínas recombinantes, isto é, < 3,6 EU/100 µL da formulação vacinal (PADMA; SINGH, 2008).

3.4.2 Cinética de edemaciamento do sítio de inoculação da toxina

Para os ensaios de determinação da cinética de edemaciamento no sítio de inoculação da toxina, grupos de fêmeas de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6 foram inoculados, na região dorsal, por via subcutânea, com salina apirogênica ou com 1, 5 ou 10 µg de LT1, com quantidades aceitáveis de LPS. Foi realizada a mensuração diária da área de edema no sítio de inoculação das proteínas, com início imediatamente após a injeção (dia 0) e

término no 13º dia, com auxílio de paquímetro digital. A área de edema (mm^2) foi calculada a partir da fórmula: $M1 \times M2$, onde M1 e M2 representam medidas transversais e longitudinais do diâmetro da região edemaciada.

3.4.3 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 BALB/c e C57Bl/6 imunizados foram obtidas 48 horas após a inoculação subcutânea de 100 μL de salina, de 10 μg de toxina LT1 com quantidades aceitáveis de LPS, ou de 10 μg de LT1 com quantidades aceitáveis de LPS previamente incubada com anticorpos LT-específicos ou com o receptor GM1, como descrito na seção 3.3. As biópsias de pele foram homogeneizadas (2 vezes, 45 segundos por vez) em tampão fosfato de sódio (0,02 M de fosfato de sódio; 0,015 M de Na_2EDTA ; 0,1 M 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 minutos 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 H_2SO_4 a 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 bicinconínico 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 ($\text{DO}_{450\text{nm}}$)/mg de proteína total.

3.4.4 Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias presentes no sítio de inoculação da toxina

Para a avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias presentes no sítio de inoculação, camundongos fêmeas da linhagem BALB/c e C57BL/6 foram inoculados por via subcutânea com 10 µg de LT1, com quantidades aceitáveis de LPS, previamente incubada ou não com anticorpos LT-específicos ou com o receptor GM1, como descrito da seção 3.3. 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 polipropileno (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 IL-1 β presentes nos fluidos oriundos das regiões de edemaciamento foram mensurados empregando o kit de ELISA para pesquisa de citocinas BD OptEIA™ (BD Biosciences), 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).

3.5 Expressão e purificação da proteína NS1

3.5.1 Expressão da proteína NS1

Os protocolos de expressão, renaturação e purificação da proteína NS1 foram baseados em Amorim et al., (2010). Uma alíquota do estoque congelado da linhagem recombinante *E. coli* BL21 DE03-RIL contendo o plasmídeo que codifica para proteína NS1 foi inoculada em 50 mL de caldo LB contendo canamicina (50 µg/mL) e cloranfenicol (30 µg/mL). O pré-inóculo foi acondicionado em um erlenmeyer de 250 mL e incubado a 37 °C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital por aproximadamente 18 horas. A cultura foi utilizada como pré-inóculo com diluição inicial de 1:100 para 4 L de LB, que foram distribuídos em 4 erlenmeyers e incubados a 37 °C sob agitação de 200 rpm até a fase de crescimento exponencial (DO_{600nm} = 0,5-0,6), quando foi acrescentado à cultura o indutor IPTG na

concentração final de 0,5 mM. A cultura induzida foi mantida sob as condições descritas anteriormente por mais 4 horas. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C. A massa bacteriana obtida foi ressuspensa em 400 mL de tampão A (100 mM de Tris-HCl, 500 mM de NaCl, 20% de glicerol, pH 8.2). As células foram lisadas por homogeneização a alta pressão (600 psi), utilizando o aparelho homogeneizador durante 10 minutos. O homogenato obtido foi clarificado por centrifugação a 10.000 x g por 1 hora a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a amostra decantada, contendo a proteína NS1 insolúvel em corpúsculos de inclusão, foi submetida a uma condição desnaturante com a adição de 10 mL/L de cultura do tampão desnaturante (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 8 M uréia, 20% de glicerol, pH 8.2), permanecendo em agitação orbital a 4 °C por aproximadamente 18 horas.

3.5.2 Renaturação da proteína NS1 por diluição pulsada

O extrato resultante da solubilização dos corpúsculos de inclusão foi centrifugado a 9.000 x g por 40 minutos a 4 °C. Para a renaturação da proteína NS1, 10 mL de extrato solubilizado em tampão desnaturante foram submetidos à diluição pulsada com auxílio de bomba peristáltica em velocidade de rotação suficiente para gotejamento de 250 µL por minuto em 2 L de tampão A sob agitação constante de 60 rpm. Após renaturação, a amostra foi novamente centrifugada e filtrada em pré-filtros de 0,22 µm da marca Millipore.

3.5.3 Purificação da proteína NS1

A amostra foi aplicada em coluna His-Trap HP 5 mL (GE Healthcare Life Sciences) em função da ligação da cauda de histidina da proteína à resina de níquel. O processo de purificação foi realizado em aparelho AKTA – Avant (GE Healthcare Life Sciences). A coluna foi previamente equilibrada com 5 vc de tampão A. A amostra (2 L) foi aplicada à coluna em um fluxo de 2 mL/minuto, em seguida a coluna foi lavada novamente com 100 mL de tampão A e foi iniciado o processo de eluição das proteínas adsorvidas à coluna sob utilização de um gradiente linear de imidazol (0 a 100%) a partir da mistura do tampão A com o tampão B (100 mM de Tris-HCl, 500 mM de NaCl, 1 M de Imidazol, 20% de glicerol, pH 8,2). A coluna foi regenerada com 5 vc de tampão B e lavada com mais 5 vc de tampão A, 5 vc de água ultrapura e 5 vc com solução contendo 20% de etanol. Amostras correspondentes aos picos obtidos foram aplicadas em SDS-PAGE 15% e as frações escolhidas foram

concentradas em filtros Amicon Ultra-15 3.000 MWCO (Millipore) em tampão A, para a retirada do eluente imidazol. A amostra final com NS1 purificada foi quantificada através da medida de absorbância em espectrofotômetro (Gene Quant spectrophotometer GE Amersham Biosciences) segundo procedimento descrito por Edelhoch (1967).

3.6 Western blot

Para determinar as propriedades antigênicas das proteínas recombinantes NS1 e LT purificadas, foi empregado o ensaio de *western blot*, no qual as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (poros 0,45 µm) a 60 mA por 40 minutos. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 12 horas com leite desnatado 3% em tampão PBS contendo 0,05% Tween 20 (PBS-T) a 4 °C. A membrana de nitrocelulose foi lavada por três vezes com PBS-T e incubada com anticorpo policlonal anti-toxina colérica e anticorpo monoclonal anti-NS1, no caso das proteínas LT e NS1, respectivamente, na diluição 1:3000. As membranas foram lavadas novamente como na etapa anterior e incubadas com anticorpo IgG conjugado à peroxidase (Sigma), de acordo com procedimento descrito previamente. As reações foram reveladas utilizando um kit quimioluminescente (Super Signal™, Pierce), conforme descrito pelo fabricante.

3.7 Avaliação do impacto da imunidade prévia na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina LT

3.7.1 Avaliação do impacto da incubação *in vitro* da toxina com anticorpos anti-LT e com o receptor GM1 na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade obtidos junto ao Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP foram divididos em 4 grupos de imunização (n=5), denominados conforme se segue: NS1: animais imunizados com 10 µg do antígeno NS1; NS1 + LT: animais imunizados com 10 µg de NS1 coadministrada à 1 µg da toxina LT1; NS1 + LT-anticorpos: animais imunizados com 10 µg de NS1 coadministrada à 1 µg de LT1 previamente incubada *in vitro* com 0,7 µg de anticorpos IgG anti-LT produzidos em camundongo, por 1 hora a 37 °C (seção 3.2); NS1 + LT-GM1: animais imunizados com 10 µg de NS1 coadministrada à 1 µg de LT1 previamente incubada *in vitro* com o receptor GM1 solúvel (0,5 µg) por 1 hora a 37 °C (seção 3.2) (MATHIAS-SANTOS et al., 2011;

ZOETWEIJ et al., 2006). O protocolo de imunização consistiu da administração subcutânea (via parenteral) de três doses da formulação vacinal. Duas semanas após cada dose, o sangue dos animais foi coletado, coagulado a 37 °C por 30 minutos e o coágulo foi retraído a 4 °C por 30 minutos. Após centrifugação (3.000 x g por 15 minutos a 4 °C) o sobrenadante (soro) foi coletado e estocado a -20 °C até realização do ensaio de titulação dos anticorpos por ELISA.

3.7.2 Avaliação *in vivo* do impacto de anticorpos anti-LT na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade obtidos junto ao Biotério de Isogênicos da Parasitologia-ICBII/USP foram utilizados para os ensaios de imunização. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=5). O protocolo de imunização consistiu da administração subcutânea (via parenteral) de três doses prévias consistentes de 100 µL de PBS ou 1 µg de LT1 com intervalos de duas semanas entre elas, seguido de três doses de imunização com 10 µg do antígeno modelo (NS1) na presença ou ausência do adjuvante LT1 (1 µg), também com intervalos de duas semanas entre as doses. Os grupos de imunização foram denominados conforme se segue: PBS/NS1: animais que receberam três doses prévias de imunização com PBS e três doses posteriores com NS1; PBS/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com PBS e três doses posteriores com NS1 coadministrada a LT1; LT/NS1: animais que receberam três doses prévias de imunização com LT1 e três doses posteriores com NS1; LT/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com LT e três doses posteriores com NS1 coadministrada a LT (Tabela 2). O sangue dos animais foi coletado duas semanas após cada dose, coagulado a 37 °C por 30 minutos e o coágulo foi retraído a 4 °C por 30 minutos. Após centrifugação (3.000 x g por 15 minutos a 4 °C), o sobrenadante (soro) foi coletado e estocado a -20 °C até realização do ensaio de titulação dos anticorpos por ELISA.

Tabela 2 - Denominações dos grupos de imunizações, por via subcutânea, de estratégia de neutralização *in vivo*.

Grupos	Imunização prévia	Imunização subsequente
PBS/NS1	PBS	NS1
PBS/NS1 + LT	PBS	NS1 + LT
LT/NS1	LT	NS1

LT/NS1 + LT	LT	NS1+ LT

3.7.3 Titulação de anticorpos anti-NS1 por ELISA

Poços de microplacas de poliestireno Maxisorp (Nalge Nunc) foram sensibilizados com a proteína NS1 purificada diluída em PBS 1 x em uma concentração final de 1,5 µg/mL. As placas foram incubadas por aproximadamente 16-18 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com leite a 5% diluído em PBS 1 x por 2 horas a 37 °C. Após, os soros dos animais imunizados foram adicionado aos poços, em duplicatas, na diluição 1:100, e diluídos seriadamente na proporção 1:2. As amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T para remoção dos anticorpos séricos não ligados à proteína purificada. Adicionou-se aos poços anticorpo anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo conjugado à peroxidase e diluído em PBS-T + 3% de leite por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram, então, lavadas como descrito e a revelação foi realizada com solução reveladora [tampão citrato-fosfato 33 mM, pH 5; O-fenilenodiaminadihidroclorato (OPD); e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)] por 15 minutos, a temperatura ambiente e no escuro, e interrompida com ácido sulfúrico a 1 M. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems). Os níveis de anticorpos IgG específicos para NS1 foram apresentados na forma de títulos, calculados por meio de análise de regressão linear com $R^2 > 0,96$ no programa Excel.

3.7.4 Titulação de anticorpos anti-LT por ELISA

Poços de microplacas de poliestireno Maxisorp (Nalge Nunc) foram sensibilizados com a proteína LT purificada diluída em PBS 1x em uma concentração final de 1 µg/mL. As placas foram incubadas por aproximadamente 16-18 horas a 4 °C. Em seguida, as placas foram bloqueadas com leite a 5% diluído em PBS 1 x por 2 horas a 37 °C. Após, os soros dos animais imunizados foram adicionado aos poços, em duplicatas, na diluição 1:400, e diluídos seriadamente na proporção 1:2. As amostras foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a placas foram lavadas por 3 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) para remoção dos anticorpos séricos não ligados à proteína purificada. Adicionou-se aos poços anticorpo anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo

conjugado à peroxidase e diluído em PBS-T + 3% de leite por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida a placa foi lavada como descrito e a revelação foi realizada com solução reveladora [tampão citrato-fosfato 33 mM, pH 5; O-fenilenodiaminadihidroclorato (OPD); e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)] por 15 minutos, a temperatura ambiente e no escuro, e interrompida com ácido sulfúrico a 1 M. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm em leitor de placa (Multiscan MS- Labsystems). Os níveis de anticorpos IgG específicos para LT foram apresentados na forma de títulos, calculados por meio de análise de regressão linear com $R^2 > 0,96$ no programa Excel.

3.7.5 Análise do perfil de citocinas

Para avaliação da produção de citocinas, os animais imunizados foram submetidos à eutanásia e seus baços foram coletados para a obtenção dos esplenócitos, duas semanas após o término das imunizações. Os baços foram macerados em 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 2% de soro fetal bovino (RPMI 2%), as células foram centrifugadas a 1.500 rpm e lavadas com RPMI 2%. Após, estas células foram tratadas com solução de acetato de potássio (1 mL/baço) para a remoção das hemácias e novamente lavadas com RPMI 2%. As células foram ressuspensas em meio RPMI completo [meio RPMI suplementado com soro fetal bovino (10%), beta-mercaptoetanol (100 x), aminoácidos essenciais (50 x), aminoácidos não essenciais (100 x), L-glutamina (100 x), vitaminas (100 x) e piruvato (100 x)]. As células foram contadas em câmara de Newbauer e um *pool* de 1×10^7 células/mL foi incubado em estufa de CO_2 a 37 °C com a presença ou ausência de 10 µg da proteína NS1 durante 48 horas. Em seguida, as amostras foram coletadas e centrifugadas e os sobrenadantes coletados e estocados a -80 °C até serem utilizados para a dosagem das citocinas, empregando o kit de ELISA BD OptEIA™ (BD Biosciences) ou o kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation (BD Biosciences) e citometria de fluxo, de acordo com as instruções do fabricante.

3.8 Análises estatísticas

Para verificar diferenças estatisticamente significativas entre grupos foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* Bonferroni. 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 Análise da integridade da toxina LT purificada

A toxina LT1 empregada nos ensaios deste trabalho foi avaliada quanto à sua integridade e pureza por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida, revelando alto grau de pureza e massa molecular esperada para cada uma das subunidades da toxina (28 kDa para a subunidade A e 11,5 kDa para os monômeros de subunidade B) (Figura 3-A). O reconhecimento imunológico da toxina LT por anticorpos policlonais anti-toxina colérica (anti-CT) foi demonstrado por *western blot* associado à imunodetecção (Figura 3-B).

Figura 3 - Avaliação da integridade estrutural e antigênica da toxina LT. A) Gel de poliacrilamida a 17,5% apresentando a toxina LT1 submetida à eletroforese. Colunas: 1, Marcador de massa molecular de proteína (Fermentas); 2, Proteína LT1 aquecida a 100 °C (subunidade A com 28 kDa e monômeros de subunidade B com 11,5 kDa). B) Imunodetecção após *Western blot* da proteína LT aquecida a 100 °C (coluna 2), realizado com anticorpo policlonal anti-CT.

4.2 Determinação da cinética de produção de anticorpos anti-LT

Este ensaio teve por objetivo a obtenção de anticorpos LT-específicos e a avaliação da cinética de produção de anticorpos anti-LT, de modo a darmos andamento aos ensaios posteriores. Para tanto, cinco camundongos BALB/c foram imunizados com três doses contendo 1 µg da toxina LT1 purificada, com intervalos de duas semanas entre elas. O sangue coletado dos animais foi processado para a obtenção do soro, de modo a avaliarmos, por ELISA, o pico da produção de anticorpos anti-LT. O esquema de imunização está demonstrado na figura 4 e a cinética de produção de anticorpos anti-LT está demonstrada na

figura 5. Observa-se que o maior título de anticorpos IgG LT-específicos – 2×10^5 (7 μg de anticorpos específicos por μL de soro) – foi obtido no dia 48 do esquema de imunização, ou seja, 20 dias após a administração da terceira dose da toxina. Não foi possível detectar quantidades significativas de IgA, IgE, IgM e IgD séricos nas amostras (dados não mostrados). O grupo controle, que recebeu apenas PBS durante o protocolo vacinal, não apresentou níveis mensuráveis de anticorpos IgG anti-LT. A partir desses resultados, determinamos que o soro do dia 48 seria utilizado para incubar a toxina LT durante os ensaios de caracterização da resposta inflamatória e durante os ensaios de neutralização *in vitro*. Também padronizamos que o ensaio *in vivo* consistiria de três doses prévias de imunização com a LT1 e que no 20º dia após a terceira dose, iniciariamos a imunização com o antígeno alvo (NS1) acrescido, ou não, do adjuvante.

Figura 4 - Esquema de imunização com a toxina LT para a determinação da cinética de produção de anticorpos LT-específicos. Para determinar quando ocorreria o pico de produção de anticorpos anti-LT, cinco animais da linhagem BALB/c foram imunizados com três doses de 1 μg da toxina LT, com um intervalo de duas semanas entre as doses. O sangue dos animais foi coletado a cada três dias, em média, a partir da primeira dose de administração de LT e processado para obtenção do soro, com o qual realizamos os ensaios de ELISA.

Figura 5 - Cinética de produção de anticorpos anti-LT em camundongos após imunização por via parenteral. Um grupo de cinco animais foi imunizado com 3 doses da toxina LT e o sangue foi coletado a intervalos regulares para determinação do momento em que ocorreria o pico de produção de IgG anti-LT. Para facilitar a visualização do gráfico, apenas alguns pontos estão representados para demonstrar a cinética de produção de anticorpos LT-específicos. As barras

apresentadas nesta figura representam os títulos de anticorpos anti-LT mensurados em *pools* de soros obtidos dos animais nos diferentes pontos do protocolo vacinal. Dados obtidos a partir de um único experimento.

4.3 Determinação da funcionalidade de anticorpos anti-LT e do receptor GM1 (Citotonicidade *in vitro*)

A fim de dar andamento aos ensaios, avaliamos primeiramente a atividade tóxica da proteína LT purificada e investigamos se esse efeito poderia ser revertido por anticorpos anti-LT e/ou pela ligação ao receptor GM1. Assim, cultivamos células Y1 e as incubamos com 1 µg da toxina LT ou com 1 µg da LT previamente incubada com o soro, contendo anticorpos anti-LT produzidos no presente trabalho, puro ou diluído na proporção de 1:10 (7 e 0,7 µg de anticorpos, respectivamente) (Figura 6), ou com o receptor GM1 (0,5 µg, seguindo o protocolo de Zoetewij et al., 2006) (Figura 7). Como podemos observar na figura 6-B e 7-B, a proteína LT purificada possui seu efeito citotônico conservado, uma vez que as células Y1, que normalmente possuem aspecto fusiforme (figura 6-A e 7-A), perdem água e passam a ter um aspecto arredondado e com ramificações quando estão em contato com a toxina. Além disso, vimos que essa toxicidade foi neutralizada pelos anticorpos provenientes do soro de animais imunizados, quando o mesmo foi utilizado nas duas concentrações testadas (figura 6-C e 6-D, respectivamente), e pela ligação da toxina ao receptor GM1 solúvel (figura 7-C). Foi descartado um possível efeito tóxico induzido pelo receptor GM1, pois como podemos observar na figura 7-D, as células incubadas com GM1 permanecem com aspecto fusiforme, similar ao controle negativo. No ensaio também foram testadas diluições maiores dos anticorpos anti-LT, as quais não se mostraram eficientes em reverter o efeito citotônico causado pela toxina. Portanto, após este ensaio ficou estabelecido que utilizaríamos 0,7 µg de anticorpos/µg de LT, bem como 0,5 µg do receptor GM1/µg de LT, para avaliar os efeitos dessas substâncias nas atividades inflamatórias e adjuvantes da toxina.

Figura 6 - Neutralização *in vitro* da toxina LT com anticorpos anti-LT gerados nos animais imunizados. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* avalia a atividade citotônica de LT e a capacidade neutralizante de anticorpos, contidos no soro de animais imunizados com a toxina LT, quando o mesmo é previamente incubado com a LT purificada. A: células Y1 em cultura; B: cultura de células Y1 incubadas com 1 µg da proteína LT purificada; C: cultura de células Y1 incubadas com 1 µg da proteína LT previamente incubada com 7 µg de anticorpos IgG anti-LT; D: cultura de células Y1 incubadas com 1 µg da proteína LT previamente incubada com 0,7 µg de anticorpos IgG anti-LT. Ac's: anticorpos. Os dados apresentados são representativos de 2 experimentos independentes.

Figura 7 - Neutralização *in vitro* da toxina LT com o receptor GM1 solúvel. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* avalia a atividade citotônica da proteína LT e a capacidade neutralizante do receptor gangliosídeo GM1 solúvel, quando o mesmo é previamente incubado com a LT purificada. A: células Y1 em cultura; B: cultura de células Y1 incubadas com 1 µg da proteína LT purificada; C: cultura de células Y1 incubadas com 1 µg da proteína LT, a qual foi previamente incubada com 0,5 µg do receptor GM1; D: cultura de células Y1 incubadas somente com 0,5 µg do receptor GM1. Os dados apresentados são representativos de 2 experimentos independentes.

4.4 Avaliação da resposta inflamatória induzida pela administração subcutânea da toxina LT

Uma das principais ressalvas quanto ao uso de LT1 como adjuvante em seres humanos é a resposta inflamatória induzida pela toxina. Há, na literatura, trabalhos que demonstram a drástica redução do efeito inflamatório de LT1 após sua incubação com o receptor GM1, quanto a um único critério: formação de edemas no sítio de inoculação após administração de LT pela via intradérmica (MATHIAS-SANTOS et al., 2011). De modo a caracterizar a resposta inflamatória induzida pelo adjuvante previamente tratado com anticorpos anti-LT ou com GM1, aplicamos a toxina por via subcutânea, em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, que apresentam diferenças quanto à resposta imunológica inata (MILLS et al., 2000; WATANABE et al., 2004). Os seguintes parâmetros de inflamação foram

determinados: formação de edema, níveis da enzima mieloperoxidase (MPO) e citocinas pró-inflamatórias presentes no sítio de injeção das formulações.

4.4.1 Cinética de edemaciamento do sítio de inoculação da toxina

Para iniciar os ensaios de caracterização da resposta inflamatória induzida pela LT, primeiramente determinamos a cinética de formação de edemas no sítio de injeção após o inóculo de 1, 5 ou 10 μg da toxina por via subcutânea. Os animais foram acompanhados durante 13 dias (312 horas) e os edemas, quando presentes, foram medidos com o auxílio de um paquímetro, como descrito na seção 3.4.2. Conforme se pode observar na figura 8, os camundongos BALB/c e C57BL/6 apresentaram edemas no sítio de inoculação da toxina de tamanhos semelhantes e, em ambos os casos, o edema se apresentou maior após 48 horas da inoculação das diferentes quantidades de LT1. Porém, os animais BALB/c conseguiram controlar melhor o edema induzido pela toxina, uma vez que o grupo que recebeu 1 μg de LT não apresentou inchaço durante os sete dias em que foi acompanhado e os animais de todos os grupos tiveram os edemas revertidos a partir do dia 6 (144 horas), após a inoculação. Os camundongos da linhagem C57BL/6 que receberam 1 μg da toxina apresentaram edemas pequenos e que foram revertidos dentro de 72 horas, enquanto os grupos que receberam 5 e 10 μg de LT apresentaram edemas até o 13º dia após a inoculação. Como era esperado, os animais dos grupos controle não apresentaram edemas. Em ambas as linhagens, os grupos que receberam 10 μg de LT apresentaram edemas com maior relevância estatística em relação aos grupos controle e aos grupos que receberam 1 μg da toxina. Logo, ficou estabelecido que os demais ensaios relacionados à atividade inflamatória de LT1 seriam realizados utilizando-se a quantidade de 10 μg da mesma.

Figura 8 - Cinética de edemaciamento no sítio de inoculação de LT1 (via subcutânea). Os animais foram divididos em quatro grupos (n=5), os quais receberam, por via subcutânea, 100 µL de salina apirogênica ou 1, 5 ou 10 µg de LT1 diluídas em salina apirogênica. Os animais foram avaliados, durante 312 horas, quanto à formação de edema no sítio de inoculação da toxina. Os edemas, quando presentes, foram medidos com o auxílio de um paquímetro. No gráfico estão representados os dados referentes a 168 horas de observação. Os valores e os desvios apresentados nas figuras representam médias e desvios padrão, respectivamente, dos tamanhos dos edemas mensurados individualmente entre os animais de cada um dos grupos. Os dados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. O símbolo # representa a diferença estatística entre o grupo que recebeu 10 µg de LT em comparação com o grupo Salina. Já o símbolo * representa a diferença estatística entre o grupo que recebeu 5 µg de LT em comparação com o grupo Salina: *: p < 0,05; **: p < 0,01; ### ou ***: p < 0,001.

Corroborando o resultado obtido, as figuras 9-A e 9-B demonstram o tamanho dos edemas apresentados por animais de cada um dos grupos que receberam 10 µg da toxina, 48 horas após a injeção das formulações, em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, respectivamente. Pode-se observar que os animais do grupo LT-GM1 apresentaram edemas significativamente menores se comparados aos animais dos grupos LT e LT-anticorpos, em ambas as linhagens. Como o esperado, os animais que receberam apenas salina não apresentaram edemas no sítio de injeção.

Figura 9 - Formação de edema em camundongos inoculados com LT pela via subcutânea. Tamanho dos edemas de (A) camundongos da linhagem BALB/c e (B) camundongos da linhagem C57BL/6, 48 horas após a injeção da toxina. Os grupos avaliados foram: Salina, em que os animais receberam 100 µL de salina apirogênica; LT, em que os animais receberam 10 µg de LT1; LT-anticorpos, em que os animais receberam 10 µg de LT1 previamente incubadas com 7 µg de anticorpos LT-específicos; e LT-GM1, em que os animais receberam 10 µg de LT1 previamente incubadas com 5 µg de receptor GM1 solúvel. As barras e os desvios apresentados nas figuras representam médias e desvios padrão, respectivamente, dos tamanhos dos edemas mensurados individualmente entre os animais de cada um dos grupos. Cada grupo foi composto por cinco animais. Os dados apresentados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. *: p < 0,05.

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

O infiltrado inflamatório no sítio de inoculação de LT1 é composto, majoritariamente, por neutrófilos (HU et al., 2014). A dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) se correlaciona com a quantidade de neutrófilos infiltrados no sítio de inflamação, sendo,

portanto, um parâmetro quantitativo (CROSS et al., 2003). Os níveis de MPO foram determinados em homogenatos de pele no sítio de injeção de LT, 48 horas após a injeção de salina apirogênica ou de 10 µg toxina apenas ou previamente incubada com soro contendo 0,7 µg de anticorpos anti-LT para cada µg da toxina (grupo LT-anticorpos), ou com 0,5 µg do receptor GM1 solúvel para cada µg da toxina (grupo LT-GM1). Na figura 10-A, pode-se observar que os grupos de animais BALB/c que receberam 10 µg da toxina e 10 µg da toxina previamente incubada com anticorpos apresentaram altos níveis de MPO se comparados ao grupo controle que recebeu salina apirogênica. O grupo LT-GM1 apresentou um nível basal de MPO, não possuindo diferença estatística em relação ao grupo controle. Um comportamento semelhante é visto na figura 10-B, que representa os níveis da enzima MPO em animais da linhagem C57BL/6. Assim, pode-se concluir que a incubação prévia da LT com anticorpos específicos não afeta o recrutamento de neutrófilos para o sítio de inflamação, enquanto que a incubação da toxina com o receptor GM1 diminui o recrutamento dessas células inflamatórias a níveis comparáveis ao observado no grupo controle.

Figura 10 - Avaliação quantitativa do infiltrado de neutrófilos no sítio de injeção de LT. Reação da enzima mieloperoxidase (MPO) em homogenatos da pele de (A) camundongos da linhagem BALB/c e (B) camundongos da linhagem C57BL/6. As biópsias da pele foram retiradas 48 horas após a injeção da toxina. Os grupos avaliados foram: Salina, em que os animais receberam 100 µL de salina apirogênica; LT, em que os animais receberam 10 µg de LT1; LT-anticorpos, em que os animais receberam 10 µg de LT1 previamente incubadas com 7 µg de anticorpos LT-específicos; e LT-GM1, em que os animais receberam 10 µg de LT1 previamente incubadas com 5 µg de receptor GM1 solúvel. As barras e os desvios apresentados nas figuras representam médias e desvios padrão, respectivamente, dos níveis de MPO mensurados individualmente entre os animais de cada um dos grupos. Cada grupo foi composto por cinco animais. Os dados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.4.3 Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias presentes no sítio de inoculação da toxina

Avaliamos também a presença de sete citocinas associadas à atividade inflamatória (IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-12(p70) e IL-1 β) no sítio de inoculação após administração subcutânea da toxina previamente incubada ou não com anticorpos específicos ou com o receptor GM1 solúvel. Na figura 11, mostramos as citocinas detectadas nos tecidos do sítio de inoculação de LT em camundongos BALB/c: IL-6, IL-12(p70) e IL-1 β . Nos tecidos dos animais tratados com salina, não foi possível detectar os mediadores inflamatórios avaliados. O grupo LT-anticorpos apresentou concentrações de IL-6 e IL-12 estatisticamente maiores em comparação com os grupos Salina, LT e LT-GM1. Quanto à concentração da IL-1 β , os grupos LT e LT-anticorpos não apresentaram diferenças estatísticas entre si. O grupo LT-GM1 não apresentou concentrações detectáveis das citocinas testadas, incluindo a IL-6 que embora aumentada, não apresentou significância estatística em relação ao grupo controle. Assim, concluímos que, embora o grupo LT tenha induzido a presença das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-12(p70), a formulação LT-anticorpos foi a que apresentou um ambiente mais inflamatório no sítio de injeção sob o parâmetro em questão. A toxina, ao ser previamente incubada com o receptor GM1, teve sua atividade inflamatória neutralizada no que diz respeito à presença de citocinas que desencadeiam a resposta imune inflamatória, corroborando os dados anteriores que mostram uma diminuição do potencial inflamatório da LT após sua exposição ao GM1.

Figura 11 - Avaliação da concentração de citocinas inflamatórias presentes no sítio de injeção em camundongos da linhagem BALB/c. As concentrações das diferentes citocinas foram medidas nos tecidos dos sítios de injeção, retirados 24 horas após a injeção da toxina. Os grupos avaliados foram: Salina, em que os animais receberam 100 µL de salina apirrogênica; LT, em que os animais receberam 10 µg de LT1; LT-anticorpos, em que os animais receberam 10 µg de LT1 previamente incubadas com 7 µg de anticorpos LT-específicos; e LT-GM1, em que os animais receberam 10 µg de LT1 previamente incubadas com 5 µg de receptor GM1 solúvel. As barras e os desvios apresentados nas figuras representam média e desvio padrão, respectivamente, das concentrações de citocinas medidas individualmente entre os animais de cada um dos grupos. Cada grupo foi composto por cinco animais. Os dados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

Dentre as citocinas avaliadas nos tecidos dos animais da linhagem C57BL/6, as únicas que conseguimos detectar foram IL-6 e IL-12(p70) (Figura 12). Confirmamos aqui o potencial da formulação LT-anticorpos em aumentar a concentração de citocinas pró-inflamatórias no sítio de injeção da toxina, se comparado ao grupo LT. Mais uma vez, ficou clara a característica da formulação LT-GM1 de reduzir a quantidade das citocinas testadas a níveis não detectáveis nos tecidos dos animais em comparação com o grupo de animais que receberam apenas LT.

Figura 12 - Avaliação da concentração de citocinas inflamatórias presentes no sítio de injeção em camundongos da linhagem C57BL/6. As concentrações das diferentes citocinas foram medidas em biópsias de pele retiradas 24 horas após a injeção da toxina. Os grupos avaliados foram: Salina, em que os animais receberam 100 μ L de salina apirrogênica; LT, em que os animais receberam 10 μ g de LT1; LT-anticorpos, em que os animais receberam 10 μ g de LT1 previamente incubadas com 7 μ g de anticorpos LT-específicos; e LT-GM1, em que os animais receberam 10 μ g de LT1 previamente incubadas com 5 μ g de receptor GM1 solúvel. As barras e os desvios apresentados nas figuras representam média e desvio padrão, respectivamente, das concentrações de citocinas medidas individualmente entre os animais de cada um dos grupos. Cada grupo foi composto por cinco animais. Os dados apresentados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

4.5 Purificação da proteína NS1

Para realizarmos os ensaios imunológicos foi preciso, inicialmente, obter o antígeno-alvo (proteína NS1) purificado. A expressão da NS1 foi realizada em linhagem recombinante de *E. coli*, em cultivo contendo IPTG, e o extrato celular clarificado foi utilizado para purificação da proteína NS1 contendo cauda de histidina por cromatografia de afinidade ao níquel. A etapa de eluição com gradiente de concentração de imidazol gerou um pico correspondente à proteína NS1, na concentração de 550 mM de imidazol (Figura 13-A). As frações referentes ao pico foram coletadas, dialisadas contra o tampão PBS, quantificadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida, resultando na obtenção da proteína com alto grau de pureza e com a massa molecular esperada (47,65 kDa) (Figura 13-B). Pela técnica de *western blot* associada à imunodeteção foi observado o reconhecimento da proteína purificada pelo anticorpo monoclonal anti-NS1 (Figura 13-C). Em condições não desnaturantes (sem fervura prévia em tampão de amostra), a proteína recombinante apresentou migração eletroforética correspondente à massa molecular aproximadamente duas vezes maior do que o monômero de NS1, o que corresponderia ao dímero proteico, como descrito anteriormente (AMORIM et al., 2010). Com base nesses resultados, foi demonstrada a pureza da proteína NS1 e a formação de dímeros em condições não desnaturantes.

Figura 13 - Purificação da proteína NS1 do DENV2. A) Cromatograma da etapa de eluição de proteínas ligadas à coluna níquelada com diferentes concentrações de imidazol (IMZ). A linha verde representa a porcentagem de tampão B, contendo 1 M de IMZ misturado ao tampão A, formando um gradiente com diferentes concentrações do eluente. A linha azul refere-se ao valor de absorvância lida a 280 nm, representando um parâmetro de detecção de proteína total. Dados obtidos através do aparelho AKTA – FPLC (Pharmacia). B) Gel de poliacrilamida a 15% contendo amostra correspondente ao pico de eluição dialisada e submetida à eletroforese. Coluna: 1, Marcador de massa molecular de proteína (Fermentas); 2, Proteína NS1 purificada e não tratada por aquecimento a 100 °C – as setas indicam o dímero e a proteína monomérica; 3, Proteína NS1 purificada aplicada ao gel após aquecimento a 100 °C, processo que desassocia os dímeros, gerando apenas a proteína monomérica. C) Imunodeteção após *Western blot* da proteína NS1 não aquecida (coluna 1) ou aquecida a 100 °C (coluna 2), realizado com anticorpo monoclonal anti-NS1.

Vale destacar que tanto a proteína NS1 quanto a LT1, utilizadas nos ensaios de avaliação dos efeitos adjuvantes de LT, não foram submetidas a métodos de remoção de lipopolissacarídeos (LPS), os quais estavam presentes em quantidades acima dos níveis aceitáveis para formulações vacinais utilizando proteínas recombinantes (< 3,6 EU/100 µL da formulação vacinal) (PADMA; SINGH, 2008). Porém, observações prévias feitas no laboratório indicam que a presença da endotoxina não influencia a potência e a modulação das propriedades adjuvantes da LT1 na linhagem BALB/c (FABRIS, 2014).

4.6 Avaliação do impacto da presença de anticorpos anti-LT na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina LT

Para avaliar se a presença de anticorpos anti-LT possui influência na potência e/ou modulação da imunogenicidade e adjuvanticidade da toxina, duas estratégias foram utilizadas: a estratégia em que a toxina LT foi incubada *in vitro* com anticorpos LT-específicos ou com o receptor GM1 antes de ser administrada juntamente com a proteína NS1 em camundongos; e a estratégia *in vivo*, na qual camundongos foram imunizados com três doses da toxina antes de serem imunizados com a proteína NS1 na presença ou ausência do adjuvante. Ressaltamos que os ensaios foram realizados em camundongos da linhagem BALB/c apenas, já que dentre nossos objetivos estava avaliar a modulação da resposta imune intermediada por citocinas dos diferentes perfis, em especial do perfil Th17 e, como visto anteriormente, animais C57BL/6 não foram capazes de induzir a expressão da citocina IL-1 β , indutora da ativação de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17.

4.6.1 Avaliação do impacto da incubação in vitro da toxina com anticorpos anti-LT ou com o receptor GM1 na imunogenicidade e na atividade adjuvante da toxina

Para a caracterização das atividades adjuvantes e imunogênicas da toxina após a incubação com anticorpos específicos ou com o receptor GM1, estabelecemos, no ensaio de citotonicidade *in vitro* (seção 4.3), que o soro utilizado para incubar a toxina LT1 seria diluído na proporção 1:10, ou seja, deveria conter 0,7 μ g de anticorpos LT-específicos por μ g da toxina, enquanto utilizaríamos 0,5 μ g do receptor GM1 por μ g da toxina. Seguindo o protocolo descrito na seção 3.3, 1 μ g da toxina, tratada ou não, foi inoculada nos camundongos, juntamente com 10 μ g da proteína NS1, em um regime de 3 doses, com intervalos de duas semanas entre elas. Um dia antes de cada imunização e duas semanas após a última dose, o sangue dos animais foi coletado para obtenção dos soros com os quais realizamos os ensaios imunológicos (Figura 14).

Figura 14 - Esquema de imunização da estratégia de neutralização *in vitro* da LT. Os animais receberam três doses de imunização com intervalos de duas semanas entre elas. As formulações vacinais consistiram de 10 µg da proteína NS1 apenas ou na presença de 1 µg de LT previamente incubada ou não com 0,7µg de anticorpos anti-toxina ou com 0,5 µg do receptor GM1. O sangue foi coletado antes de cada dose e duas semanas após a última dose para obtenção do soro.

Após as imunizações, determinamos os títulos de anticorpos anti-LT e anti-NS1, para avaliarmos o impacto da neutralização da toxina na sua imunogenicidade e na sua atividade adjuvante, respectivamente. Na figura 15, que ilustra o título de anticorpos anti-LT produzidos pelos animais após cada uma das doses de imunização, vemos que a incubação da toxina com os anticorpos específicos não interferiu na sua imunogenicidade, posto que os títulos de anticorpos IgG anti-LT induzidos nos grupos vacinados com LT não tratada (NS1 + LT) ou tratada com anticorpos LT-específicos (NS1 + LT-anticorpos) são similares. Já as imunizações realizadas com a toxina previamente incubada com o receptor GM1 (NS1 + LT-GM1) geraram títulos de IgG anti-LT estatisticamente mais baixos do que os títulos alcançados pelos grupos de animais que receberam a toxina não incubada ou incubada com anticorpos, demonstrando que a incubação prévia da toxina com o receptor GM1 solúvel reduz a imunogenicidade da LT.

Figura 15 - Avaliação do impacto da incubação prévia da LT com anticorpos específicos ou com o receptor GM1 na imunogenicidade da toxina. Para estudar os efeitos da neutralização da toxina LT na sua imunogenicidade, utilizamos os soros dos cinco animais de cada um dos grupos de imunização, obtidos duas semanas após cada uma das doses, para determinar o título de anticorpos anti-LT produzido por cada um dos grupos que receberam a toxina. NS1 + LT: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg do adjuvante LT; NS1 + LT-anticorpos: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente neutralizada com soro contendo 0,7µg de anticorpos anti-LT; NS1 + LT-GM1: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente neutralizada com 0,5 µg do receptor GM1 solúvel. As barras e os desvios apresentados na figura representam as médias e o desvios-padrão, respectivamente, entre os títulos de anticorpos anti-LT mensurados em *pools* de soros de cada grupo vacinal de três experimentos independentes. NS: Valores cujas diferenças não possuem significância estatística entre si. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

De modo a avaliar o impacto da neutralização prévia da LT com anticorpos ou com o receptor GM1 na modulação da resposta imunológica contra a própria toxina, medimos por ELISA a razão entre IgG1 e IgG2a, subclasses de anticorpos que sugerem modulação de resposta imunológica de padrão Th2 e Th1, respectivamente (Figura 16). O que podemos ver é que os grupos que receberam a LT não incubada e incubada com anticorpos ou com GM1 apresentaram razões semelhantes entre as subclasses e que demonstram indução de um perfil misto de resposta imunológica. Assim, concluímos que a neutralização prévia da toxina não modula diferencialmente a resposta humoral medida pelas subclasses de IgG em anticorpos contra a LT.

Figura 16 - Avaliação do impacto da imunização prévia na modulação das subclasses de IgG induzidas contra LT. O sangue dos cinco animais de cada um dos grupos de imunização foi coletado duas semanas após a última dose e utilizado no ensaio de ELISA para avaliação das subclasses IgG1 (barras brancas) e IgG2a (barras pretas) produzidas após a vacinação. NS1 + LT: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg do adjuvante LT; NS1 + LT-anticorpos: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente neutralizada com soro contendo 0,7 µg de anticorpos anti-LT; NS1 + LT-GM1: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente neutralizada com 0,5 µg do receptor GM1. As barras e os desvios apresentados na figura representam as médias e os desvios-padrão, respectivamente, dos títulos de anticorpos anti-LT mensurados nos *pools* dos soros dos animais de cada grupo vacinal de três experimentos independentes. Os dados mostrados não apresentam diferenças estatísticas entre si.

Uma vez avaliada a influência da exposição da toxina a anticorpos anti-LT e ao receptor GM1 em sua imunogenicidade, realizamos a mesma avaliação em relação ao potencial adjuvante da LT. Na figura 17 vemos os títulos de anticorpos anti-NS1 produzidos pelos animais após cada dose. Fica evidente o poder adjuvante da toxina LT após a terceira dose de imunização, já que os grupos que receberam a proteína NS1 coadministrada ao adjuvante mostraram um aumento do título de anticorpos antígeno-específicos em comparação ao grupo que recebeu apenas o antígeno. Os grupos NS1 + LT-anticorpos e NS1 + LT-GM1 não tiveram uma redução estatisticamente significativa nos títulos de anticorpos anti-NS1 em relação ao grupo NS1 + LT, sugerindo que o tratamento prévio da toxina com ambas as substâncias não altera a potência da atividade adjuvante da LT.

Figura 17 - Avaliação do impacto da neutralização prévia na potência da atividade adjuvante humoral de LT. Para estudar os efeitos da neutralização da toxina LT na sua atividade adjuvante, utilizamos os soros dos cinco animais dos diferentes grupos, obtidos após cada dose de imunização, para determinar o título de anticorpos anti-NS1 produzido. NS1: animais imunizados apenas com 10 µg do antígeno modelo; NS1 + LT: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg do adjuvante LT; NS1 + LT-anticorpos: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente incubada com soro contendo 0,7 µg anticorpos anti-LT; NS1 + LT-GM1: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente incubada com 0,5 µg do receptor GM1. As barras e os desvios apresentados na figura representam as médias e os desvios-padrão, respectivamente, entre os títulos de anticorpos anti-NS1 medidos em soros de cada grupo vacinal de três experimentos independentes. NS: Valores cujas diferenças não possuem significância estatística entre si. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

De modo a avaliar o impacto da imunidade prévia na modulação da resposta imunológica contra o antígeno alvo coadministrado à LT, medimos a razão entre IgG1 e IgG2a (Figura 18). O que podemos observar é que os animais que receberam as diferentes formulações vacinais apresentaram razões semelhantes entre as subclasses de IgG e diferenças estatísticas não foram observadas entre elas. O perfil da resposta imunológica apresentado por todos os grupos é misto, porém direcionado para o perfil Th2. Portanto, concluímos que a presença da toxina LT, previamente incubada ou não com anticorpos específicos e com o receptor GM1, não altera a modulação da resposta imunológica em relação às subclasses de IgG de anticorpos direcionados a um antígeno específico.

Figura 18 - Avaliação do impacto da neutralização prévia da LT na modulação das subclasses de IgG induzida pela toxina. O sangue dos cinco animais de cada um dos grupos de imunizações foi coletado duas semanas após a última dose e utilizado no ensaio de ELISA para avaliação das subclasses IgG1 (barras brancas) e IgG2a (barras pretas) produzidas após a vacinação. NS1 + LT: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg do adjuvante LT; NS1 + LT-anticorpos: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente neutralizada com soro contendo 0,7µg de anticorpos anti-LT; NS1 + LT-GM1: animais imunizados com 10 µg do antígeno modelo na presença de 1 µg da toxina LT previamente neutralizada com 0,5 µg do receptor GM1. As barras e os desvios apresentados na figura representam as médias e os desvios-padrão, respectivamente, dos títulos de anticorpos anti-LT mensurados nos *pools* dos soros dos animais de cada grupo vacinal de três experimentos independentes. Os símbolos * e # representam as diferenças estatísticas dos níveis de IgG1 e IgG2a, respectivamente, entre os grupos que receberam a toxina como adjuvante em comparação com o grupo que recebeu apenas o antígeno. * ou #: $p < 0,05$.

Para uma melhor avaliação dos perfis de resposta imunológica induzidos pelas formulações vacinais, duas semanas após as imunizações, os animais foram eutanasiados, seus baços foram retirados, processados e reestimulados *in vitro* com o antígeno NS1 para obtenção dos sobrenadantes e detecção de citocinas secretadas por ELISA. Na figura 19, podemos observar o perfil de produção de diferentes citocinas. O grupo que recebeu a vacina contendo apenas NS1 produziu majoritariamente citocinas de perfil Th1 (IFN- γ) e Th17 (IL-17A), embora em concentrações significativamente menores do que aquelas apresentadas pelo grupo NS1 + LT. Este último induziu maior concentração de IFN- γ e de IL-5 (citocina de perfil Th2) do que os grupos NS1 + LT-anticorpos e NS1 + LT-GM1. A incubação prévia da toxina com anticorpos LT-específicos não alterou o perfil de produção de IL-17A demonstrado pelo grupo NS1+LT, porém a incubação com o receptor GM1 reverteu a expressão desta citocina a níveis estatisticamente semelhantes àqueles induzidos pela imunização com o antígeno apenas.

Conclui-se que a presença do adjuvante é capaz de exacerbar a modulação da resposta imunológica de perfis Th1, Th2 e Th17 induzida contra o antígeno. A incubação prévia da LT com anticorpos e com GM1 mantém a potencialização da resposta humoral contra o antígeno, mas altera a modulação da resposta imune quanto aos perfis Th1 e Th2, revertendo-a a um perfil semelhante àquele induzido pela imunização com o antígeno apenas. Quanto à resposta Th17, indutora de processos inflamatórios, vimos que a incubação da LT com o seu receptor cognato GM1 restaurou a concentração desta citocina a níveis basais, se comparado ao grupo NS1, corroborando os resultados apresentados anteriormente, de que a exposição da toxina ao receptor diminui o seu potencial inflamatório.

Figura 19 - Análise do impacto da incubação prévia de LT com anticorpos específicos e com o receptor GM1 na produção de citocinas após as imunizações. Duas semanas após o término das imunizações, os baços dos animais foram coletados, processados e as células do baço foram reestimuladas *in vitro* com a proteína NS1 para posterior análise do perfil de citocinas secretadas. NS1: animais imunizados apenas com 10 μ g do antígeno modelo; NS1 + LT: animais imunizados com 10 μ g do antígeno modelo na presença de 1 μ g do adjuvante LT; NS1 + LT-anticorpos: animais imunizados com 10 μ g do antígeno modelo na presença de 1 μ g da toxina LT previamente incubada com soro contendo 0,7 μ g de anticorpos anti-LT; NS1 + LT-GM1: animais imunizados com 10 μ g do antígeno modelo na presença de 1 μ g da toxina LT previamente incubada com 0,5 μ g do receptor GM1 solúvel. As barras e os desvios apresentados na figura representam as médias das concentrações (pg/mL) de citocinas secretadas pelo *pool* de células do baço dos indivíduos de cada grupo de imunização e os desvios-padrão, respectivamente. Os dados apresentados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.6.2 Avaliação *in vivo* do impacto de anticorpos anti-LT na imunogenicidade e atividade adjuvante da toxina

Nesta segunda abordagem, grupos de animais foram imunizados previamente com três doses de 1 µg de toxina LT. Como determinado pelo ensaio de cinética de produção de anticorpos anti-LT (seção 4.2), 20 dias após a terceira dose os animais foram imunizados com três doses contendo 10 µg de NS1 na presença ou ausência de 1 µg do adjuvante LT. O sangue dos animais foi coletado antes de cada uma das doses para obtenção de soros, com os quais realizamos os ensaios imunológicos. O esquema representativo do protocolo vacinal utilizado está ilustrado na figura 20.

Figura 20 - Esquema de imunização referente à estratégia *in vivo*. Os animais receberam três doses prévias de imunização com PBS contendo ou não LT e 20 dias após a terceira dose, receberam três doses do antígeno NS1 na presença ou ausência de LT. O sangue foi coletado antes de cada uma das doses e duas semanas após a última dose para obtenção do soro.

Primeiramente, foi avaliado o título de anticorpos anti-LT produzidos pelos animais imunizados com cada uma das formulações (Figura 21), de modo a determinar se os anticorpos gerados durante as imunizações prévias poderiam interferir na imunogenicidade da toxina. Como é possível observar, a imunização prévia não afetou a imunogenicidade da LT, ou seja, os títulos de anticorpos anti-LT alcançados pelos grupos PBS/NS1 + LT e LT/NS1 + LT (os quais, respectivamente, não receberam e receberam previamente a toxina) são estatisticamente semelhantes.

Figura 21 - Avaliação do impacto da imunidade prévia na imunogenicidade de LT. Para estudar os efeitos das imunizações prévias na imunogenicidade da toxina LT, utilizamos o *pool* dos soros dos cinco animais de cada um dos grupos, obtidos após cada dose de imunização, para determinar o título de anticorpos anti-LT produzidos. PBS/NS1 e PBS/NS1 + LT: animais que receberam três doses de PBS e, posteriormente, três doses com 10 µg de NS1 ou 10 µg de NS1 coadministrada à 1 µg de LT, respectivamente; LT/NS1 e LT/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com 1 µg de LT, seguido por três doses com 10 µg de NS1 ou 10 µg de NS1 coadministrada à 1 µg de LT, respectivamente. A seta indica o início das dosagens contendo a proteína NS1 como antígeno. As barras e os desvios representam médias e desvios-padrão das dosagens de anticorpos anti-LT dos soros de cada um dos grupos de imunização. Os dados apresentados foram obtidos a partir de dois experimentos. NS: Valores cujas diferenças não possuem significância estatística entre si.

Para avaliar o impacto da imunidade prévia na modulação da resposta imunológica contra a própria toxina, determinamos a razão entre IgG1 e IgG2a anti-LT (Figura 22). Todos os grupos que receberam a toxina, apenas na imunização prévia (LT/NS1), apenas na imunização posterior (PBS/NS1 + LT) ou em ambas (LT/NS1 + LT), apresentaram um perfil de modulação de resposta imunológica misto, porém com resposta imunológica de perfil Th2 mais acentuada. De acordo com os dados obtidos, pode-se dizer que não há diferença nas razões de IgG1/IgG2a entre os grupos que possuíam imunidade prévia contra LT, corroborando os dados gerados em ensaios feitos com a adição de anticorpos anti-LT em animais naive imunizados com LT.

Figura 22 - Avaliação do impacto da imunidade prévia na modulação das subclasses de IgG induzidas por LT. O sangue dos cinco animais de cada um dos grupos de imunizações foi coletado duas semanas após a última dose e utilizado no ensaio de ELISA para avaliação das subclasses IgG1 (barras brancas) e IgG2a (barras pretas) produzidas após a vacinação. PBS/NS1 e PBS/NS1 + LT: animais que receberam três doses de PBS e, posteriormente, três doses com 10 µg de NS1 ou 10 µg de NS1 coadministrada à 1 µg de LT, respectivamente; LT/NS1 e LT/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com 1 µg de LT, seguido por três doses com 10 µg de NS1 ou 10 µg de NS1 coadministrada à 1 µg de LT, respectivamente. As barras e os desvios apresentados na figura representam as médias e os desvios-padrão, respectivamente, dos títulos de anticorpos anti-LT medidos nos *pools* dos soros dos animais de cada grupo vacinal de dois experimentos independentes. Os dados mostrados não apresentam diferenças estatísticas entre si.

Uma vez comprovada que a imunidade prévia não compromete a imunogenicidade de LT, foram realizadas testes para se avaliar o possível impacto da imunidade prévia na adjuvantividade de LT por meio da titulação de anticorpos específicos para o antígeno alvo NS1 (Figura 23). É possível observar que o efeito adjuvante de LT é mantido nestas condições, uma vez que os grupos que receberam NS1 coadministrada a LT (PBS/NS1 + LT e LT/NS1 + LT) apresentaram títulos de anticorpos NS1-específicos maiores do que os grupos que receberam apenas o antígeno durante as imunizações posteriores (PBS/NS1 e LT/NS1). Nota-se que o grupo que recebeu a toxina na imunização prévia e na imunização posterior (LT/NS1 + LT) não apresentou títulos de IgG anti-NS1 estatisticamente diferentes do grupo que recebeu a LT apenas durante as imunizações posteriores, coadministrada ao antígeno (PBS/NS1 + LT). Logo, pode-se concluir que: (i) LT apresenta forte efeito adjuvante; (ii) a presença de anticorpos específicos anti-LT não exerce efeitos negativos sobre a potência da atividade adjuvante de LT. O grupo que recebeu a toxina apenas durante a imunização prévia (LT/NS1) apresentou títulos de anticorpos anti-NS1 maiores do que o grupo que não recebeu a LT em nenhum momento (PBS/NS1), porém esta diferença não possui significância estatística. Estes dados corroboram os resultados mostrados na seção 4.6.1, de que a presença de anticorpos LT-específicos não afeta negativamente os efeitos adjuvantes de LT.

Figura 23 - Avaliação do impacto da imunidade prévia na atividade adjuvante de LT. Para estudar os efeitos das imunizações prévias na atividade adjuvante da toxina LT, utilizamos o *pool* dos soros dos cinco animais de cada um dos grupos de imunização, obtidos duas semanas após cada dose, para determinar o título de anticorpos anti-NS1 produzidos. PBS/NS1 e PBS/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com PBS e três doses posteriores com 10 µg de NS1 e com 10 µg de NS1 coadministrada a 1 µg de LT, respectivamente; LT/NS1 e LT/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com 1 µg de LT e três doses posteriores com 10 µg de NS1 ou com 10 µg de NS1 coadministrada a 1 µg de LT, respectivamente. As barras e os desvios representam médias e desvios-padrão das dosagens de anticorpos anti-NS1 dos soros de cada um dos grupos de imunização. Os dados apresentados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. NS: Resultados cujas diferenças não possuem significância estatística entre si. **: p < 0,01; ***: p < 0,001.

Para avaliar o impacto da imunidade prévia na modulação da resposta imunológica contra o antígeno alvo, medimos por ELISA, a razão entre as subclasses de IgG, IgG1 e IgG2a, específicos para a proteína NS1. Na figura 24-A e 24-B, apresentamos os dados obtidos com soros dos animais coletados duas semanas após o primeiro e o segundo ensaio de imunização, respectivamente. Foram realizados dois experimentos independentes cujos resultados são apresentados na figura 24-B. Como pode ser observado na figura, os dados obtidos em cada experimento se revelaram incongruentes e não permitem uma conclusão sobre esse ponto.

Figura 24 - Avaliação da imunidade prévia na modulação das subclasses de IgG em anticorpos anti-LT. O sangue dos cinco animais de cada um dos grupos de imunizações foi coletado duas semanas após a última dose e utilizado no ensaio de ELISA para avaliação das subclasses IgG1 (barras brancas) e IgG2a (barras pretas) produzidas após a vacinação. A: Dados gerados no primeiro experimento; B: Dados gerados no segundo experimento. PBS/NS1 e PBS/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com PBS e três doses posteriores com 10 µg de NS1 e com 10 µg de NS1 coadministrada a 1 µg de LT, respectivamente; LT/NS1 e LT/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com 1 µg de LT e três doses posteriores com 10 µg NS1 e com 10 µg NS1 coadministrada a 1 µg de LT, respectivamente. As barras representam as médias dos títulos de anticorpos anti-LT mensurados nos *pools* dos soros dos animais de cada grupo de imunização. Cada um dos dados apresentados é representativo de um único experimento independente.

Uma vez que a determinação do perfil de subclasses não foi conclusiva quanto à modulação da resposta imunológica induzida pelas diferentes formulações vacinais, avaliamos, por *CBA*, as citocinas produzidas após reestímulo *in vitro* das células do baço com o antígeno alvo NS1. Como pode ser visto na figura 25, os dados confirmam a tendência de polarização da resposta imunológica para um perfil Th2, como observado, no grupo PBS/NS1 + LT, pelas altas concentrações de IL-5. Nota-se ainda que anticorpos anti-LT preexistentes alteram o perfil de citocinas secretados quando a toxina é administrada novamente em uma imunização posterior, uma vez que, comparando-se os grupos PBS/NS1 + LT e LT/NS1 + LT, vê-se que há uma maior concentração de IFN- γ , citocina de perfil Th1, e menores concentrações de IL-17A, envolvida com respostas inflamatórias e conhecida induzida durante imunizações com LT1 (BRERETON et al., 2011).

Figura 25 - Análise do impacto da imunidade prévia na produção de citocinas após as imunizações com LT. Duas semanas após o término das imunizações, os baços dos animais foram coletados, processados e as células do baço foram reestimuladas *in vitro* com a proteína NS1 para posterior análise do perfil de citocinas secretadas. PBS/NS1 e PBS/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com PBS e três doses posteriores com 10 μ g de NS1 e com 10 μ g de NS1 coadministrada a 1 μ g de LT, respectivamente; LT/NS1 e LT/NS1 + LT: animais que receberam três doses prévias de imunização com 1 μ g de LT e três doses posteriores com 10 μ g NS1 e com 10 μ g NS1 coadministrada a 1 μ g de LT, respectivamente. As barras representam as médias das concentrações (pg/mL) de citocinas secretadas pelo *pool* de células do baço dos indivíduos de cada grupo de imunização. Os dados apresentados foram obtidos a partir de um único experimento.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram levantadas questões relacionadas à influência da imunidade prévia contra a toxina LT1 na sua atividade inflamatória e na potência e qualidade da resposta imunológica humoral específica a um antígeno coadministrado. Observamos que a presença de anticorpos anti-LT exacerba a atividade inflamatória da toxina, através do aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias no sítio de injeção, mas não influencia as atividades imunogênica e adjuvante da toxina. Por outro lado, o tratamento da LT com o seu receptor cognato GM1 induz a redução dos mediadores inflamatórios avaliados, bem como a imunogenicidade da toxina, porém sem prejudicar o seu potencial adjuvante frente a um antígeno alvo. Nossos dados demonstram que o contato prévio com linhagens de ETEC, bem como em situações de imunizações subsequentes que utilizem a toxina em suas formulações, não prejudicam a potência e qualidade dos efeitos adjuvantes conhecidos da LT. Os resultados obtidos também esclarecem alguns aspectos importantes sobre os efeitos inflamatórios locais de LT induzidos no sítio de inoculação quando empregada na forma de adjuvante parenteral. Embora a imunidade prévia contra LT não tenha maiores impactos na inflamação local observada no sítio de inoculação, nossos dados demonstram que a coadministração do gangliosídeo GM1 é capaz de reverter totalmente os efeitos inflamatórios de LT, um aspecto deletério para o seu possível uso clínico, sem comprometer seus efeitos adjuvantes.

Observamos que 48 horas após a inoculação por via subcutânea da toxina previamente incubada ou não com as diferentes substâncias, o tamanho, em mm², do edema provocado pela LT1 tratada com anticorpos é semelhante ao tamanho do edema provocado pela toxina não tratada. No entanto, o tamanho do edema induzido pela LT previamente tratada com GM1 foi menor do que aqueles induzidos pelas outras formulações contendo a toxina, não havendo diferenças estatísticas em relação ao grupo controle, que recebeu salina. Mathias-Santos et al., (2011) demonstraram que o tratamento da toxina com anticorpos não exerce influência sobre o tamanho dos edemas induzidos por LT, enquanto que o tratamento com o receptor GM1 solúvel reverte a formação de edemas a níveis comparáveis aos do grupo salina. O mesmo foi observado por Zoetewij et al., (2006), em relação ao tratamento da toxina LT com o receptor GM1. Vale ressaltar que ambos os trabalhos citados avaliaram o fenômeno quando a toxina foi injetada pela via intradérmica, portanto, os dados apresentados neste trabalho, que utilizou a via subcutânea, são inéditos e de suma importância para o conhecimento do comportamento inflamatório de LT em vias distintas.

Demonstramos ainda, de forma inédita, que o tratamento da toxina com anticorpos ou com o receptor GM1 antes de injetá-la por via subcutânea apresenta efeitos distintos na atividade inflamatória de LT1. Hu et al., (2014) demonstraram que uma grande quantidade de células inflamatórias migra para o local de injeção de LT e, dentre elas, as células presentes em maior quantidade são os neutrófilos. Uma forma de se correlacionar a quantidade de neutrófilos recrutados na lesão durante a inflamação é a dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO). Esta enzima é encontrada em leucócitos polimorfonucleares, porém é secretada três vezes mais por neutrófilos do que por outras células, sendo, portanto, uma técnica que possibilita demonstrar o componente inflamatório de forma quantitativa (CROSS et al., 2003; KRAWISZ; SHARON; STENSON, 1984; MULLANE; KRAEMER; SMITH, 1985). Utilizamos essa análise para determinar o influxo de neutrófilos no sítio de injeção induzido pela LT previamente tratada com os anticorpos ou com o GM1. Vimos que a toxina LT1 recruta uma grande quantidade de neutrófilos para o local de injeção, se comparada aos animais inoculados com salina, e o mesmo ocorreu com a LT previamente incubada com anticorpos específicos, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos LT e LT-anticorpos. Quando a toxina é tratada com o receptor GM1 solúvel antes de ser inoculada nos animais, no entanto, o influxo de neutrófilos, medido pelos níveis de MPO, é estatisticamente menor do que aquele induzido pelas outras formulações contendo a toxina, sendo comparáveis aos níveis observados pelo grupo de animais inoculado apenas com salina. Estes resultados são compatíveis aos encontrados anteriormente no presente trabalho, relacionados ao tamanho dos edemas, sendo assim mais um indício de que os neutrófilos são as principais células a migrarem para o sítio de injeção da toxina, corroborando os resultados de Hu et al., (2014).

O terceiro parâmetro mediador de inflamação que avaliamos foi a presença de citocinas específicas no sítio de injeção da toxina e da toxina previamente tratada com anticorpos ou com GM1. Foi possível detectar na biópsia de pele dos animais as citocinas IL-6, IL-12(p70) e IL-1 β , as quais são citocinas pró-inflamatórias e pró-estimulatórias produzidas, principalmente, em resposta a antígenos microbianos por células apresentadoras de antígenos (APCs) e possuem seus níveis aumentados em camundongos e humanos que apresentam doenças autoimunes e inflamatórias (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; DINARELLO, 2009; TANIGUCHI; KARIN, 2012; VIGNALI; KUCHAROO, 2012). Em animais da linhagem BALB/c, apenas os grupos LT e LT-anticorpos foram capazes de induzir concentrações detectáveis das citocinas. Surpreendentemente, as concentrações de IL-6 e IL-12(p70) foram significativamente maiores no grupo que recebeu LT tratada com anticorpos, se comparado ao grupo que recebeu apenas a toxina. As concentrações de IL-1 β parecem ser

maiores no grupo LT, mas a diferença não possui relevância estatística em comparação ao grupo LT-anticorpos. A presença mais acentuada de citocinas pró-inflamatórias no sítio de injeção de camundongos do grupo LT-anticorpos pode ser explicada, em parte, por uma possível internalização do complexo toxina-anticorpo por células apresentadoras de antígenos circulantes que possuem receptores para a porção Fc dos anticorpos ligados à proteína, ativando, assim, vias inflamatórias com maior eficiência (ARMAN; KRAUEL, 2015; LAJOIE et al., 2014). O perfil de citocinas encontradas no sítio de injeção das formulações foi essencialmente o mesmo em camundongos da linhagem C57BL/6. A única discrepância foi a ausência de IL-1 β em todos os grupos avaliados. Em experimentos de ativação *in vitro*, com LT1, de macrófagos murinos intraperitoneais notamos o mesmo fenômeno: macrófagos originados de camundongos da linhagem BALB/c induzem níveis maiores de IL-1 β se comparados a macrófagos oriundos de animais da linhagem C57BL/6 (dados não publicados).

Há dados na literatura de que a amplitude da resposta imunológica inata inflamatória influencia a polarização da resposta imunológica para um perfil Th específico (LANKFORD; FRUCHT, 2003; MILLS et al., 2000; WATANABE et al., 2004). Isso justifica a nossa escolha por realizar os experimentos em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, as quais possuem *backgrounds* genéticos que induzem respostas imunológicas inatas distintas. Cabe ressaltar que o padrão encontrado quanto ao influxo de neutrófilos e ao tamanho dos edemas 48 horas após a injeção da toxina foi semelhante em camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, sugerindo que, quanto ao recrutamento de neutrófilos, células da imunidade inata relacionadas aos processos inflamatórios, não há diferenças entre as duas linhagens. Porém, os camundongos BALB/c tiveram os edemas revertidos 6 dias após o inóculo da LT, ou seja, em um período menor do que os camundongos C57BL/6, cujos edemas reverteram apenas após o 13º dia. Quanto à produção de citocinas, as linhagens distintas de animais não induzem a produção discrepante de citocinas pró-inflamatórias, afora IL-1 β , relacionada com a ativação de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17 (Th17) que, por sua vez, estão fortemente associados com processos inflamatórios (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; DATTA et al., 2010; DINARELLO, 2009; FOSSIEZ et al., 1996). Mesmo que camundongos C57BL/6 expostos à LT não apresentem níveis detectáveis de IL-1 β , acreditamos que o *background* genético dos animais não exerce marcante influência nos processos inflamatórios locais induzidos pela toxina LT, em relação aos parâmetros que avaliamos.

Os resultados descritos no presente trabalho abrem perspectiva para o estudo do papel da ligação da LT ao receptor GM1 durante os processos inflamatórios. Nossos dados

demonstram que a ligação ao receptor GM1 solúvel, previamente a inoculação pela via subcutânea, reduz a formação de edemas (exsudação de fluidos e proteínas plasmáticas), o influxo de neutrófilos e a produção de citocinas pró-inflamatórias no local de injeção. Zoetewij et al., (2006) avaliaram a formação de edema induzido pelo mutante LT(G33D), o qual possui uma mutação que torna sua ligação ao receptor GM1 deficiente, pela via intradérmica. Esse estudo traz dados semelhantes aos que encontramos em relação à formação de edemas. Hu et al., (2014) demonstraram que variantes naturais da toxina LT, as LTs do tipo II, as quais possuem afinidade por outros receptores gangliosídeos e afinidade reduzida pelo receptor GM1, também levam à formação de edemas menores e níveis de recrutamento de neutrófilos mais baixos, se comparadas à toxina LTI, a qual também possui afinidade por outros receptores gangliosídeos, porém possui maior afinidade pelo receptor GM1 expresso pelas células eucarióticas (HAAN et al., 1998; NATARO; KAPER, 1998). Essas informações podem indicar que a ligação da toxina ao receptor GM1 pode ser responsável, pelo menos em parte, por desencadear o forte efeito inflamatório característico de LT quando administrada por via parenteral.

Tal fenômeno pode ser confirmado com o estudo do perfil inflamatório da toxina colérica (CT). A CT é secretada por *Vibrio cholerae* e exibe alta homologia estrutural pela LTI padrão (LT1), além de apresentar propriedades imunológicas muito semelhantes a esta (FREYTAG; CLEMENTS, 2005). A CT, por sua vez, não é promíscua em sua afinidade por receptores, ligando-se apenas ao GM1, sendo, portanto, uma alternativa para avaliar os efeitos da ligação a esse receptor na ativação da cascata inflamatória (FUKUTA et al., 1988; HAAN; HIRST, 2004).

Uma vez que avaliamos a influência da ligação aos anticorpos e ao GM1 na atividade inflamatória da toxina, questionamo-nos sobre tais efeitos nas atividades imunogênica e adjuvante de LT. Demonstramos que o tratamento da toxina com anticorpos anti-LT antes de inoculá-la nos animais não afetou negativamente o seu reconhecimento pelo sistema imunológico dos animais, uma vez que o título de anticorpos IgG anti-LT duas semanas após a última dose das imunizações foi estatisticamente semelhante entre os grupos LT e LT combinada aos anticorpos. Por outro lado, o tratamento prévio da LT1 com seu receptor cognato GM1 solúvel reduziu a imunogenicidade da toxina, uma vez que o título de anticorpos IgG anti-LT encontrado duas semanas após as imunizações foi significativamente menor no grupo LT-GM1, se comparado aos grupos LT e LT-anticorpos. Este dado é inédito, porém corrobora dados da literatura que demonstram que a ligação da LT aos receptores GM1

das células eucarióticas é importante para o seu reconhecimento pelo sistema imunológico (HAAN et al., 1998).

Para compreender a ação adjuvante das LT1 sobre a resposta imunológica humoral contra a proteína NS1, baseamos nossas análises no estudo de anticorpos antígeno-específicos obtidos de animais imunizados com a proteína NS1 sozinha ou em combinação com o adjuvante, previamente tratado com anticorpos anti-LT ou com o receptor GM1. Observamos que a administração da LT1 como adjuvante proporcionou a potencialização da resposta de anticorpos antígeno-específicos, e essa propriedade não foi alterada pelo tratamento prévio da toxina com os anticorpos LT-específicos ou com o receptor GM1. Estes dados corroboram dados da literatura que demonstram que a deficiência na ligação ao GM1, avaliada por meio da imunização de animais com o mutante da toxina, LT(G33D), o qual possui uma mutação na subunidade B, não exerce efeitos negativos sobre a adjuvantividade da toxina quando esta é entregue pelas vias intranasal e intradérmica (HAAN et al., 1998; ZOETEWIJ et al., 2006), porém os ensaios não contaram com controles experimentais que permitissem uma conclusão efetiva sobre o impacto da neutralização da toxina sobre os efeitos adjuvantes da LT.

No entanto, a presença da toxina, previamente incubada ou não com as diferentes substâncias, não modulou diferencialmente o perfil de subclasses de IgG se comparado aos animais imunizados apenas com o antígeno. O perfil de resposta humoral baseado em anticorpos IgG apresentado foi misto (Th1/Th2), com predomínio da subclasse IgG1, sendo, portanto, sugestivo de resposta voltada para o perfil Th2. Este dado está de acordo com aqueles encontrados na literatura em relação às respostas anti-NS1 (AMORIM et al., 2012; WHITEHEAD et al., 2007). Além disso, a polarização para o perfil Th2 por LT já foi anteriormente descrito na literatura, sendo influenciado pela via de administração e pelas características do antígeno alvo (RYAN et al., 2000; WILLIAMS; DOUGAN, 2001). O perfil Th2 é favorável em relação ao antígeno modelo, já que a subclasse IgG1 é mais eficaz que a subclasse IgG2a em ativar a via clássica do sistema complemento, através da ligação à proteína NS1 de membrana, resultando em citotoxicidade celular mediada por anticorpos (ADCC) e em lise da célula infectada; e também em ativar monócitos e macrófagos (JEFFERIS; LUND, 2002; WHITEHEAD et al., 2007; WOOF; BURTON, 2004).

Para compreender melhor a modulação da resposta imunológica induzida pela LT tratada ou não com as diferentes substâncias, avaliamos o perfil de citocinas secretadas pelos esplenócitos dos animais imunizados, após reestímulo *in vitro*. A presença de LT como adjuvante (NS1 + LT) levou ao aumento da concentração das citocinas IFN- γ (Th1), IL-5 (Th2) e IL-17A (Th17), se comparado ao antígeno apenas, sugerindo a indução de um perfil

de resposta misto (FOSSIEZ et al., 1996; MOSMANN; COFFMAN, 1989). As formulações compostas por LT-anticorpos e LT-GM1 (NS1 + LT-anticorpos e NS1 + LT-GM1, respectivamente) induziram concentrações significativamente menores de IFN- γ e não foram capazes de induzir concentrações detectáveis de IL-5, se comparadas ao grupo NS1 + LT, indicando, assim, uma maior polarização da resposta imunológica para o perfil Th1. Quanto à citocina IL-17A, sugestiva de perfil Th17, relacionado a processos pró-inflamatórios, a presença de anticorpos anti-LT não alterou o padrão induzido pela LT. Sabe-se que a toxina é eficaz em induzir a produção desta citocina pela ativação do inflamassoma e liberação de IL-1 e IL-23 (BRERETON et al., 2011; DATTA et al., 2010). Demonstramos, de forma inédita, que o tratamento da LT com o receptor GM1 levou à redução das concentrações de IL-17A, tornando-as comparáveis às concentrações induzidas pelo grupo que recebeu apenas o antígeno NS1. Este dado corrobora os dados obtidos nos ensaios de avaliação dos processos inflamatórios, que mostraram que a incubação prévia da toxina com o receptor GM1 solúvel reduz as concentrações de IL-1 β , a qual induz resposta celular Th17, a níveis comparados ao do grupo controle, além de não induzir a formação de edemas e reduzir o fluxo de neutrófilos no sítio de injeção a níveis basais, quando entregue por via subcutânea.

Uma vez avaliada a influência da imunidade prévia da LT no seu potencial adjuvante após a incubação da toxina com anticorpos anti-LT ou com GM1 *in vitro*, nosso questionamento recaiu sobre a possibilidade de que anticorpos circulantes, gerados *in vivo* a partir de imunizações prévias, pudessem alterar as características imunológicas da toxina quando esta é administrada como adjuvante em imunizações posteriores. Demonstramos que a imunidade prévia contra LT não neutraliza os seus efeitos imunológicos como demonstrado pelos títulos de anticorpos anti-LT e anti-NS1. Quanto à modulação da resposta imunológica induzida contra a toxina, observamos que a presença da imunidade prévia anti-LT não alterou o padrão apresentado pelos animais que não foram previamente expostos à toxina. Assim, a resposta imunológica apresentada sugere um perfil misto, já que houve a indução das subclasses IgG1 e IgG2a, com uma leve polarização para o perfil Th2, dado o maior título de IgG1 verificado pela razão entre as duas subclasses. Estes dados estão de acordo com aqueles envolvendo o tratamento da toxina *in vitro* com anticorpos específicos. Ressaltamos que esta comparação nunca foi mostrada na literatura.

Utilizando a mesma estratégia, avaliamos também os efeitos da imunidade prévia na atividade adjuvante de LT. Baseamos nossas análises na resposta humoral, a qual foi fundamentada nos títulos de anticorpos anti-NS1 produzidos pelos animais dos diferentes grupos vacinais após a última dose das imunizações. Neste ensaio, ficou claro o efeito

adjuvante da toxina, uma vez que os títulos de IgG anti-NS1 apresentados pelos grupos que receberam a toxina coadministrada ao antígeno (PBS/NS1 + LT e LT/NS1 + LT) foram significativamente maiores do que os títulos de anticorpos antígeno-específicos apresentados pelos grupos que receberam apenas o antígeno durante as imunizações posteriores (PBS/NS1 e LT/NS1). Além disso, demonstramos que a imunidade prévia anti-LT não influenciou a adjuvantividade da LT. Este dado corrobora as observações baseadas na incubação da toxina com anticorpos específicos *in vitro*. Zoetewij et al., (2006) realizaram um experimento semelhante utilizando a variante LT(G33D) por via intradérmica, porém faltaram controles importantes que permitissem avaliar o papel dos anticorpos pré-existentes nos efeitos adjuvantes da toxina. Tais controles estão presentes neste trabalho, por exemplo, os grupos que receberam PBS durante as imunizações prévias e a comparação estatística dos títulos de anticorpos alcançados por estes grupos e os títulos de IgG alcançados pelos grupos que receberam LT durante as imunizações prévias.

6 CONCLUSÕES

A capacidade adjuvante da toxina LT foi avaliada por vários grupos de pesquisa, que direcionaram seus estudos para a análise da potencialização da resposta de anticorpos IgG antígeno-específico e para a modulação do perfil de resposta humoral induzida por esse adjuvante. Porém, ainda não havia sido levado em consideração que a LT é uma toxina altamente imunogênica e que a imunidade gerada contra ela poderia ter algum efeito em seu potencial inflamatório e adjuvante. Em nossos resultados verificamos, de forma inédita, que o tratamento da LT com anticorpos anti-LT antes da inoculação em camundongos não exerce influência em seus efeitos inflamatórios, quando os parâmetros avaliados são tamanhos dos edemas e recrutamento de neutrófilos para o sítio de injeção. Porém, descrevemos o aumento da expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias secretadas no sítio de injeção, demonstrando que a imunidade prévia pode amplificar o efeito inflamatório da toxina. Por outro lado, o tratamento prévio da toxina com o receptor GM1 reverte os parâmetros inflamatórios observados a níveis basais. Observamos, também, que o tratamento da toxina com anticorpos específicos e com GM1 não prejudica a potência e a modulação da atividade adjuvante da toxina, embora a incubação prévia com GM1 torne a LT menos imunogênica e ative células Th17 com menos eficiência, ao contrário do que ocorre quando a toxina é incubada previamente com anticorpos anti-LT. O padrão foi reproduzido quando os animais foram previamente imunizados com LT antes de receberem imunizações posteriores com LT sendo utilizada com adjuvante frente a um antígeno alvo. Neste caso, a imunogenicidade e a atividade adjuvante foram preservadas. Além disso, nosso trabalho possui o diferencial de investir na via subcutânea, enquanto a grande maioria dos trabalhos envolvendo a LT utilizam as rotas de mucosa e a via intradérmica. De modo geral, concluímos que a presença de anticorpos anti-LT não prejudica o seu uso como adjuvante em imunizações posteriores e abrimos uma nova perspectiva para a redução dos efeitos inflamatórios indesejáveis da toxina, sem prejudicar seu potencial adjuvante por meio do tratamento da LT com o receptor GM1 solúvel.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 7º ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. 560 p.

ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. **Nature Immunology**, v. 8, p. 942–949, 2007.

AMORIM, J. H.; DINIZ, M. O.; CARIRI, F. A. M. O.; RODRIGUES, J. F.; BIZERRA, R. S. P.; GONÇALVES, A. J. S.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. **Vaccine**, v. 30, p. 837-845, 2012.

AMORIM, J. H.; PORCHIA, B. F. M. M.; BALAN, A.; CAVALCANTE, R. C. M.; COSTA, S. M.; ALVES, A. M. B.; FERREIRA, L. C. S. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in *Escherichia coli* preserves structural and immunological properties of the native protein. **Journal of Virological Methods**, v. 167, p. 186-192, 2010.

ARCE, S.; NAWAR, H. F.; RUSSELL, M. W.; CONNELL, T.; CAROCARCA, D. 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 Immunity**, v. 73, p. 2718–2727, 2005.

ARMAN, M.; KRAUEL, K. Human platelet IgG Fc receptor Fc γ RIIA in immunity and thrombosis. **Journal of Thrombosis and Homeostasis**, v. 13, p. 893-908, 2015.

BASTIAENS, P. I. H.; MAJOUL, I. V.; VERVEER, P. J.; SOELING, H. D.; JOVIN, T. M. Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 4246-4253, 1996.

BEHRENS, R. H.; CRAMER, J. P.; JELINEK, T.; SHAW, H.; VON SONNENBURG, F.; WILBRAHAM, D.; WEINKE, T.; BELL, D. J.; ASTURIAS, E.; PAUWELLS, H. L.; MAXWELL, R.; PAREDES-PAREDES, M.; GLENN, G. M.; DEWASTHALY, S.; STABLEIN, D. M.; JIANG, Z. D.; DUPONT, H. L. 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.

BHATT, S.; GETHING, P. W.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; FARLOW, A. W.; MOYES, C. L.; DRAKE, J. M. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, p. 504-507, 2013.

BRAGA C. J.; RODRIGUES J. F.; MEDINA-ARMENTEROS Y.; FARINHA-ARCIERI L. E.; VENTURA A. M.; BOSCARDIN S. B.; SBROGIO-ALMEIDA M. E.; FERREIRA L. C. S. Parenteral adjuvant effects of an enterotoxigenic *Escherichia coli* natural heat-labile toxin variant. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-11, 2014.

---

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR: 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2003.

BRERETON, C. F.; SUTTON, C. E.; ROSS, P. J.; IWAKURA, Y.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R. *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, p. 5896-5906, 2011.

COX, E.; VERDINCK, F.; VANROMPAY, D.; GODDEERIS, B. Adjuvants modulating mucosal immune responses or directing systemic responses towards the mucosa. **Veterinary Research**, v. 37, p. 511-539, 2006.

CROSS, A. S.; SAKARYA, S.; RIFAT, S.; HELD, T. K.; DRYSDALE, B. E.; GRANGE, P. A.; CASSELS, F. J.; WANG, L. X.; STAMATOS, N.; FARESE, A.; CASEY, D.; POWELL, J.; BHATTACHARJEE, A. K.; KLEINBERG, M.; GOLDBLUM, S. E. Recruitment of murine neutrophils *in vivo* through endogenous sialidase activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 6, p. 4112-4120, 2003.

DA HORA V. P.; CONCEIÇÃO F. R.; DELLAGOSTIN O. A.; DOOLAN D. L. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants. **Vaccine**, v.29, n. 8, p. 1538-1544, 2011.

DATTA, S. K.; SABET, M.; NGUYEN, K. P.; VALDEZ, P. A.; GONZALEZ-NAVAJAS, J. M.; ISLAM, S.; MIHAJLOV, I.; FIERER, J.; INSEL, P. A.; WEBSTER, N. J, et al. Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America (PNAS)**, v. 107, p. 10638–10643, 2010.

DE GREGORIO, E.; CAPRONI, E.; ULMER, J. B. Vaccine adjuvants: mode of action. **Frontiers in Immunology**, v.4, p. 1-6, 2013.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 519–550, 2009.

EDELHOCH, H. Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. **Biochemistry**, v. 6, p. 1948-1954, 1967.

FABRIS, D. L. N. **Efeitos adjuvantes derivados da toxina termo-lábil de Escherichia coli (LT1) na resposta de anticorpos específicos voltados para o domínio III da glicoproteína E do vírus dengue tipo 2 (DENV2)**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2014.

FALCONAR, A. K. The dengue virus nonstructural-1 protein (NS1) generates antibodies to common epitopes on human blood clotting, integrin/adhesin proteins and binds to human endothelial cells: potential implications in haemorrhagic fever pathogenesis. **Archives of Virology**, v. 142, p. 897-916, 1997.

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.

FIGUEIREDO, L. T. M. **Patogenia das infecções pelos vírus do dengue**. Med. de Rib. Pret., cap. I, v. 32, p. 15-20, 1999a.

FIGUEIREDO, L. T. M. **Vacinas contra dengue**. Med., de Rib. Pret., cap.II, v. 32, p. 21-25, 1999b.

FLAMAND, M.; MEGRET, F.; MATHIEU, M.; LEAPULT, J.; REY, F. A.; DEUBEL, V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. **Journal of Virology**, v. 73, p. 6104-6110, 1999.

FOSSIEZ F.; DJOSSOU, O.; CHOMARAT, P.; FLORES-ROMO, L.; AIT-YAHIA, S.; MAAT C.; PIN J. J.; GARRONE P.; GARCIA E.; SAELAND S.; BLANCHARD D.; GAILLARD C.; DAS MAHAPATRA B.; ROUVIER E.; GOLSTEIN P.; BANCHEREAU J.; LEBECQUE S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, p. 2593-2605, 1996.

FREYTAG, L. C.; CLEMENTS, J. D. Mucosal adjuvants. **Vaccine**, v. 23, p. 1804–1813, 2005.

FRECH, S. A.; DUPONT, H. L.; BOURGEOIS, A. L.; MCKENZIE R.; BELKINDGERSON, J.; FIGUEROA, J. F., et al. Use of a patch containing heat labile toxin from *Escherichia coli* against traveller's diarrhoea: a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled field trial. **The Lancet**, v. 371, p. 2019-2025, 2008.

FUJIIHASHI, K.; KOGA, T.; VAN GINKEL, F. W.; HAGIWARA Y.; McGHEE, J. R. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 20, p. 2431-2438, 2002.

FUKUTA, S.; MAGNANI, J. L.; TWIDDY, E. M.; HOLMES, R. K.; GINSBURG, V. 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, p. 1748-1753, 1988.

GIULIANI, M. M.; DEL GIUDICE, G.; GIANNELLI, V.; DOUGAN, G.; DOUCE, G.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M. Mucosal adjuvant activity and immunogenicity of LTR72, a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with partial knockout of ADP-ribosyltransferase activity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, p. 1123-1132, 1998.

GUZMAN, M. G.; VAZQUEZ, S. The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. **Viruses**, v. 2, p. 2649-2662, 2010.

GRANDOCH, M.; ROSCIONI, S. S.; SCHMIDT, M. The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 159, p. 265-284, 2010.

HAAN, L.; HIRST, T. R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 21, p. 77-92, 2004.

HAAN, L.; VERWEIJ, W. R.; AGSTERIBBE, E.; WILSCHUT, J. The role of ADP-ribosylation and GM1-binding activity in the mucosal immunogenicity and adjuvanticity of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin and vibrio cholera toxin. **Immunology And Cell Biology**, v. 76, p. 270-279, 1998.

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

HAJISHENGALLIS, G.; AERCE, S.; GOCKEL, C. M.; CONNELL, T. D.; RUSSELL, M. W. Immunomodulation with enterotoxins for the generation of secretory immunity or tolerance: applications for oral infections. **Journal of Dental Research**, v.84, p. 1104-1116, 2005.

HOLMGREN, J.; CZERKINSKY, C.; ERIKSSON, K.; MHARANDI, A. Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. **Vaccine**, v. 21, supplement 2, p. S89–S95, 2003.

HU, J. C.; MATHIAS-SANTOS, C.; GREENE, C. J.; KING-LYONS, N. D.; RODRIGUES, J. F., HAJISHENGALLIS, G.; FERREIRA, L. C.; CONNELL, T. D. Intradermal administration of the type II heat-labile enterotoxins LT-IIb and LT-IIc of enterotoxigenic *Escherichia coli* enhances humoral and CD8⁺ T Cell immunity to a co-administered antigen. **PLoS One**, v. 9. doi:10.1371/journal.pone.0113978, 2014.

IWAKURA, Y.; ISHIGAME, H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1218-1222, 2006.

JEFFERIS, R., LUND, J. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. **Immunology Letters**, v. 82, p. 57-65, 2002.

KAMMER, G. M. The adenylate cyclase-camp-protein kinase a pathway and regulation of the immune response. **Immunology Today**, v. 9, p. 222–229, 1988.

KNUTTON, S.; LLOYD, D. R.; McNEISH, A. S. Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype 0148 H28 which adheres to human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor. **Infection and Immunity**, v. 55, p. 86-92, 1987.

KRAWISZ, J. E.; SHARON, P.; STENSON, W. F. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. **Gastroenterology**, v. 87(6), p. 1344-1350, 1984.

KUMAR, P.; CHEN, K.; KOLLS, J. K. Th17 cell based vaccines in mucosal immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 25(3), p. 373-380, 2013.

LAJOIE, L.; CONGY-JOLIVET, N.; BOLZEC, A.; GOUILLEUX-GRUART, V.; SICARD, E., SUNG, H. C.; PEIRETTI, F.; MOREAU, T.; VIÉ, H.; CLÉMENCEAU, B.; THIBAUT, G. ADAM17-mediated shedding of FcγRIIA on human NK cells: identification of the

cleavage site and relationship with activation. **The Journal of Immunology**, v. 192, p. 741-751, 2014.

LANKFORD, C. S. R.; FRUCHT, D. M. An unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, p. 49-53, 2003.

LASARO, M. A.; SANTOS, C. M.; RODRIGUES, J. F.; FERREIRA, L. C. S. 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**, v. 55, p. 93–99, 2009.

LEE, S.; PICKING, W. L.; TZIPORI, S. The immune response of two microbial antigens delivered intradermally, sublingually, or the combination of thereof. **Microbes and Infection**, v.16, p. 796-803, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12^o ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MATHIAS-SANTOS, C.; RODRIGUES, J. F.; SBROGIO-ALMEIDA, E. M.; CONNEL, T. D.; FERREIRA, L. C. S. 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, p. 1243-1251, 2011.

MILLS, C. D.; KINCAID K.; ALT, J. M.; HEILMAN M. J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **The Journal of Immunology**, v.164, p. 6166-6173, 2000.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145-173, 1989.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal**, v. 16, p. 79-88, 2006.

MULLANE, K. M.; KRAEMER, R.; SMITH, B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 74, p. 157-167, 1985.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

O'HAGAN, D. T.; GREGORIO, E. The path to a successful vaccine adjuvant – ‘the long and winding road’. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 541-551, 2009.

PADMA, M.; SINGH, M. Endotoxin limits informations for preclinical research. Novartis Vaccine. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 6, 2008.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature Medicine**, v. 11, p. 63-68, 2005.

PETERS-GOLDEN, M. Putting on the brakes: cyclic AMP as a multipronged controller of macrophage function. **Science Signaling**, v. 2., p. 1-3, 2009.

RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; DOUCE, G.; DOUGAN, G. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. **Immunology Today**, v. 20, p. 493-500, 1999.

RESENDE, F. C. B.; PASSOLD, J.; FERREIRA, S. I. A. C.; ZANETTI, C. R.; LIMA, H. C. Vaccine adjuvants: possibilities for use in humans or animals. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 27, p. 116-124, 2004.

RODRIGUES, J. F.; SANTOS, C. M.; ALMEIDA, M. E. S.; AMORIM, J. H.; CRESPO, J. C.; BALAN, A.; FERREIRA, L. C. S. Functional diversity of heat-labile toxins (LT) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): differential enzymatic and immunological activities of LT1 (hLT) and LT4 (pLT). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 5222-5233, 2011.

RYAN, E. J.; MCNEELA, E.; PIZZA, M.; RAPPUOLI, R.; O'NEILL, L.; MILLS, K. H. G. Modulation of innate and acquired immune responses by *Escherichia coli* heat-labile toxin: distinct pro- and anti-inflammatory effects of the nontoxic AB complex and the enzyme activity. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 5750-5759, 2000.

SIMMONS, C. P.; GHAEM-MAGAMI, M.; PETROVSKA, L.; LOPES, L.; CHAIN, B. M.; WILLIAMS, N. A.; DOUGAN, G. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 56, p. 218-226, 2001.

SIXMA, T. K.; KALK, K. H.; VAN ZANTEN, B. A.; DAUTER Z.; KINGMA J.; WITHOLT B.; HOL, W. G. Refined structure of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin, a close relative of cholera toxin. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, p. 890-918, 1993.

SLONCZEWSKI, J.; FOSTER, J. W. **Microbiology: An Evolving Science**. 3^a ed. New York: W.W. Norton & Company, 2009. Figura 25.19a.1408 p.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. IL-6 and relates cytokines as the critical linking between inflammation and cancer. **Seminars in Immunology**, v. 26, p. 54-74, 2004.

TIERNEY, R.; BEIGNON, A. S.; RAPPUOLI, R.; MULLER, S.; SESARDIC, D.; PARTIDOS, C. D. 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.

VIGNALI, D. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmarkers. **Nature Immunology**, v. 13, p. 722-728, 2012.

WATANABE, H.; NUMATA, K.; ITO, T.; TAKAGI, K.; MATSUKAWA, A. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock**, v. 22, p. 460-466, 2004.

WHITEHEAD, S. S.; BLANEY, J. E.; DURBIN, A. P.; MURPHY, B. R. Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 518-528, 2007.

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, p. H416–H424, 2003.

WILLIAMS, N. A.; DOUGAN, G. Immunomodulation using bacterial enterotoxins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 53, p. 218-226, 2001.

WOOF, J. M.; BURTON, D. R. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. **Nature Immunology Reviews**, v. 4, p. 1-11, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Dengue and severe dengue**. Geneva, 2015.

ZOETEWIJ, J. P.; EPPERSON, D.; PORTER, J. D.; ZHANG, C. X.; FROLOVA, O. Y.; CONSTANTINIDES, A. P.; FUHRMANN, S. R.; EL-AMINE, M.; TIAN, J. H.; ELLINGSWORTH, L. R.; GLENN, G. M. GM1 binding-deficient exotoxin is a potent noninflammatory broad spectrum intradermal immunoadjuvant. **The Journal of Immunology**, v.177, p. 1197-1207, 2006.