



Form
Arial,
(Portu

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONFERIDA PELA PROTEÍNA SM14 DE *Schistosoma mansoni* FUSIONADA AO ADJUVANTE LTB

**BRUM, Clarice¹; DA HORA, Vanusa Pousada¹; MOREIRA, Angela Nunes²;
CONCEIÇÃO, Fabrício Rochedo¹; ALEIXO, José Antônio Guimarães²;
DELLAGOSTIN, Odir Antônio¹.**

¹Laboratório de Biologia Molecular; ² Laboratório de Imunologia Aplicada – Centro de Biotecnologia – CenBiot/UFPEL *Campus Universitário, Caixa Postal 354, CEP 96010-900*. claricebbrum@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose, causada principalmente por *Schistosoma mansoni*, é a principal infecção helmíntica humana (King *et al.*, 2005). Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo e que mais de 600 milhões vivem em áreas de risco em regiões tropicais (Chitsulo *et al.*, 2000). Apesar da existência de uma quimioterapia eficaz contra a esquistossomose, ela tem limitações, como altas taxas de reinfecção e o aparecimento de cepas resistentes. Dessa forma, o desenvolvimento de uma vacina eficiente e comercialmente viável seria uma alternativa para o controle dessa parasitose (Bergquist *et al.*, 2005).

Neste contexto, moléculas candidatas a compor uma vacina vêm sendo avaliadas. Entre elas a proteína ligadora de ácidos graxos de 14 kDa de *S. mansoni*, Sm14, a qual tem sido considerada um dos antígenos mais promissores (Tendler *et al.*, 1996). Essa proteína é vital à sobrevivência do parasito, estando envolvida diretamente na captura, transporte e compartimentalização de ácidos graxos derivados do hospedeiro (Moser & Murphy, 1991). Apesar da Sm14 ser uma candidata promissora contra a esquistossomose, mais estudos precisam ser realizados com objetivo de potencializar a eficácia desta vacina.

Investigações vêm sendo realizadas a fim de associar proteção e reposta imune da a Sm14 como antígeno vacinal, sendo que a proteção parece estar associada com resposta imune celular e humoral (Al-Sherbiny *et al.*, 2003). A escolha adequada do adjuvante e da rota de administração pode potencializar a eficácia dos antígenos, desde possa modular a resposta imune na direção desejada. Antígenos microbianos têm sido utilizados como moduladores para ativar a imunidade adaptativa, entre eles a enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* (LTB). Estudos têm apontado a LTB como um adjuvante capaz de induzir resposta imune celular e humoral contra antígenos co-administrados ou fusionados (Conceição *et al.*, 2006). A LTB tem sua atividade adjuvante fortemente influenciada pela rota da imunização e pela natureza do antígeno (Fingerut *et al.*, 2006).

O objetivo desse trabalho foi avaliar em modelo murino a resposta imune conferida pela Sm14 fusionada a LTB, administrada por diferentes rotas a fim de selecionar a formulação ideal para ser avaliada em teste de proteção.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os genes *ltb* e *sm14* foram amplificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), fornecidos pelo Laboratório de Biologia Molecular da UFPel e pelo Laboratório de Schistosomose Experimental da Fiocruz-RJ, respectivamente. Os fragmentos gerados na PCR foram submetidos à clonagem no vetor de expressão pAE e transformados por eletroporação em *E. coli* TOP10F. Após a indução da expressão, estas proteínas foram purificadas por cromatografia líquida de afinidade em coluna de sepharose (HisTrap™) carregada com níquel, usando o sistema ÄKTAPrime (GE Healthcare). Posteriormente, estas proteínas foram dialisadas contra um tampão fisiológico e quantificadas pelo método de microtitulação de Bradford (Bradford, 1976). Posteriormente foram utilizadas em ensaios de imunização em animais.

Grupos de 5 camundongos BALB/c foram inoculados por via intramuscular (IM) e subcutânea (SC) com três doses de 20 µg das quimeras recombinantes (rLTB/Sm14) e 10 µg de cada proteína (rLTB e rSm14). Grupos vacinados com rSm14 associada com hidróxido de alumínio e outro vacinado apenas com rLTB foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. O sangue dos animais imunizados foi coletado via plexo retro-orbital, nos dias zero (pré-imune), 15, 30, 60 e 120 após a primeira imunização.

A detecção de anticorpos específicos presentes no soro dos animais vacinados foi monitorado por “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (ELISA), utilizando como antígeno a rSm14. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-IgG, anti-IgG2a e anti-IgG1, produzidos em camundongo e conjugados com peroxidase. A técnica foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante dos anticorpos secundários (Invitrogen). A reação colorimétrica do ELISA foi desenvolvida com *o-phenylenediamine dihydrochloride* (OPD) (Sigma) e peróxido de hidrogênio, após 15 min de incubação no escuro. A leitura foi realizada utilizando filtro de comprimento de onda de 492nm com leitor de microplacas (Multiskan MCC/340, Titertek Instruments, Huntsville, AL). A média das absorbâncias (OD_{492nm}) e o desvio padrão (S.D) foram calculados com os soros analisados em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de anticorpos anti-Sm14 foi investigada através de ELISA indireto utilizando-se soro de cinco animais de cada grupo, coletado 30 dias após a primeira imunização. Anticorpos IgG específicos anti-Sm14 foram detectados em todos os grupos experimentais. Observou-se o maior nível de anticorpos IgG anti-Sm14 no soro dos animais vacinados com rLTB/Sm14+Al(OH)₃ inoculados via IM, quando comparado com os grupos controles. Para determinar o tipo de resposta imune induzida, as subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2a foram tituladas. Os dados são apresentados como o título de cada grupo (Figura 2), determinado como a diluição de soro maior ou igual a média de OD_{492} do soro pré-imune acrescida de dois S.D. Camundongos imunizados com a quimera rLTB/Sm14 via SC apresentaram a maior razão (1,25) entre os títulos de IgG1:IgG2a, ao passo que os demais apresentaram títulos de IgG1 superiores a IgG2a. Os animais vacinados com rLTB/Sm14+Al(OH)₃ administrada via SC demonstraram a maior diferença na razão IgG1:IgG2a.

Quando analisada a influência da rota de administração na modulação da resposta imune, apenas o grupo rLTB/Sm14 imunizado via SC apresentou diferença no tipo de resposta, quando comparado com o grupo vacinado via IM. Este grupo demonstrou um perfil misto IgG1/IgG2a, sugerindo um balanço entre o tipo de

resposta imune mediada por linfócitos TCD4⁺ tipo 1 (Th1) e linfócitos TCD4⁺ tipo 2 (Th2). Esta diferença pode ser atribuída à presença do adjuvante LTB, uma vez que ele é capaz de induzir resposta imune celular e humoral (Conceição *et al.*, 2006).

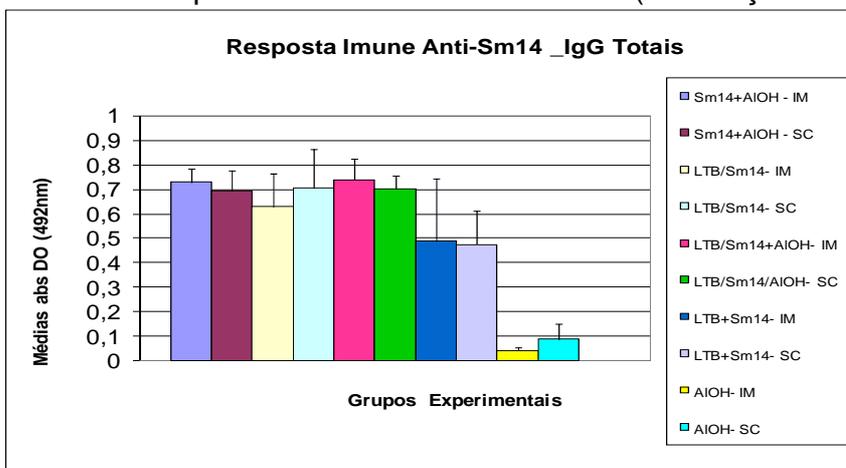


Figura 1. Avaliação da produção de anticorpos IgG anti-Sm14 através de ELISA indireto. O soro de cinco animais coletado no dia 30 após a primeira imunização foi diluído na proporção de 1:100 e testado em triplicata. A resposta imune demonstra a média da OD₄₉₂ e o desvio padrão analisados em triplicata.

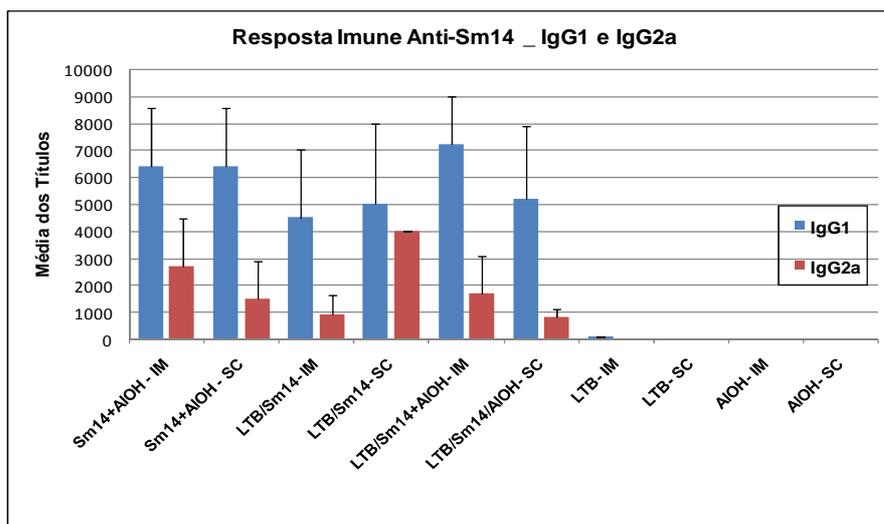


Figura 2. Avaliação do efeito das vias de administração da rLTB/Sm14 na resposta imune em camundongos. As subclasses de anticorpos IgG1 e IgG2a foram mensuradas por ELISA indireto utilizando-se soro de cinco animais de cada grupo, coletado 30 dias após a primeira imunização. A resposta imune demonstra a média da OD₄₉₂ dos títulos de cada grupo e do desvio padrão analisados em triplicata.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, apenas o grupo experimental rLTB/Sm14 imunizado via SC apresentou um equilíbrio entre o tipo de resposta imune Th1 e Th2. Como a proteção conferida pela Sm14 parece estar associada com este tipo de resposta, o uso da LTB como adjuvante pode contribuir para aumentar a eficácia da Sm14 como antígeno vacinal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SHERBINY, M.; OSMAN, A.; BARAKAT, R.; MORSHEDY, H. E.; BERGQUIST, R. & OLDS, R. In vitro cellular and humoral responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Acta Tropica**, 2003, v.88, p.117–130.

CHITSULO, L., ENGELS, D., MONTRESOR, A. & SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, 2000, v.77, p.41-51.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annals of Biochemistry**. 1976, 72, p. 248-254.

CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, A. N. & DELLAGOSTIN, O. A. A recombinant chimera composed of R1 repeat region of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit elicits immune response in mice. **Vaccine**, 2006, v. 24, p. 5734–5743.

FINGERUT, E., GUTTER, B., GOLDWAY, M., ELIAHOO, D. & PITCOVSKI, J. B subunit of E. coli enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination. **Veterinarian Immunology Immunopathology**, 2006, v.112, p.253–263.

KING, C.H., DICKMAN, K. & TISCH, D.J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, 2005, v. 365, p.1561–1569.

MOSER, M. & MURPHY, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. **Nature Immunology**, 2000, v. 1, p. 199-205.

TENDLER, M., BRITTO, C., SILVA, J.F., SAVINO, W., GARRATT, R., KATZ, N. & SIMPSON, A. A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, 1996, v.93, p.269-273.