

PROBIÓTICO *Saccharomyces boulardii* E GOMA XANTANA COMO POTENCIALIZADORES DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE VACINA DE DNA CONTRA LEPTOSPIROSE EM CAMUNDONGOS

MARCELLE MOURA SILVEIRA¹; MARCELO MENDONÇA²; DAIANE HARTWIG³; ANGELITA MOREIRA⁴; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵; ÂNGELA NUNES MOREIRA⁶.

¹ Universidade Federal de Pelotas – marcellemsilveira@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – marcelomendoncavet@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas – daianehartwig@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – angelitadasilveiramoreira@gmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

⁶ Universidade Federal de Pelotas -angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

As vacinas de DNA consistem no uso de sequências gênicas que codificam antígenos imunodominantes de agentes patogênicos. Elas têm sido avaliadas com a finalidade de induzir proteção imune em diferentes modelos animais contra uma série de patologias bacterianas, virais ou parasitárias. As sequências que codificam para os antígenos de interesse são inseridas em plasmídeos, sendo que, um único plasmídeo pode carregar um ou vários genes diferentes. Essa construção quando administrada via intramuscular, entra no núcleo da célula, onde o gene é transcrito, levando a produção da proteína no citoplasma DONNELLY et al.(2005).

As vacinas de DNA apresentam diversas vantagens, tais como: expressão do antígeno desejado utilizando a maquinaria celular do indivíduo vacinado, indução de resposta imune celular, elaboração de vacinas multigênicas, indução de respostas de memória, são estáveis, de fácil preparação, apresentam baixo custo de produção e são seguras para pacientes imunocomprometidos MAZUMDER et al. (2011). Entretanto, apresentam como desvantagens a baixa eficiência de transfecção, que faz com que sejam necessárias repetidas doses de injeções intramusculares e a baixa imunogenicidade, quando testadas isoladamente em ensaios clínicos ZHANG et al. (2006) . Por isso, estudos têm sido realizados visando à melhora da resposta imune gerada pelas vacinas de DNA.

Probióticos são definidos, pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002), como micro-organismos vivos que, quando administrados em concentrações adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Na medicina humana, probióticos são utilizados na regulação da microbiota intestinal, na prevenção de doenças e distúrbios gastrointestinais, como imunomoduladores, no tratamento de câncer, entre outros THOMAS et al. (2009). *Sacharomyces boulardii*, uma levedura probiótica, que apresenta, entre seus efeitos benéficos, a capacidade de potencializar a resposta imune, não foi avaliada como adjuvante em vacinas de DNA.

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular produzido pela fermentação de bactérias pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. Esse polissacarídeo tem sido estudado como uma nova alternativa para utilização como adjuvante vacinal. Entretanto não foi avaliado como adjuvante em vacinas de DNA.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do probiótico *Saccharomyces boulardii* e do biopolímero Xantana potencializarem a resposta imune humoral de uma vacina de DNA, utilizando como imunógeno a sequência gênica de um fragmento da proteína LigA de *Leptospira* clonada no plasmídeo pTARGET, e como modelo animal camundongos.

2. METODOLOGIA

2.1 Expansão do plasmídeo de expressão em eucariotos contendo a sequência de DNA que codifica um fragmento da proteína LigA (pTARGET//ligAni)

Para imunização dos camundongos, o plasmídeo de expressão em eucariotos contendo o gene que codifica a proteína LigAni (pTARGET//ligAni) foi expandido conforme descrito por SAMBROOK E RUSSELL (2001). Células competentes de *Escherichia coli* TOP 10F (Invitrogen) foram preparadas e transformadas com o plasmídeo pTARGET//ligAni previamente construído (Silva, 2007). Após, o DNA plasmidial foi extraído. O protocolo de purificação também foi realizado de acordo com metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001) com modificações. A mistura de plasmídeo-RNase foi extraída com 500 µL de fenol clorofórmio, centrifugada por 5 min a 1300 rpm e o sobrenadante foi coletado. A precipitação do DNA ocorreu através da adição de 1 mL de isopropanol, homogeneizado em vortex e resfriamento em gelo por 10 min. Após, o material foi centrifugado por 5 min a 1300 rpm para a retirada do pellet.

2.2 Avaliação da capacidade do probiótico *S. boulardii* e do biopolímero xantana potencializarem a resposta imune humoral de uma vacina de DNA contra leptospirose em camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas com 4 a 6 semanas de idade foram divididos em 3 grupos contendo 12 animais cada. Os animais do grupo 1 e 2 (G1 e G2) foram alimentados com ração isenta de antimicrobianos e os animais do grupo 3 (G3), com a mesma ração contendo 10^8 UFC.g⁻¹ de *Saccharomyces boulardii*, quatorze dias antes da primeira imunização, para adaptação, e durante todo o experimento. O protocolo de imunização consistiu em três doses, nos dias 1, 14 e 21, contendo 100 µg do plasmídeo pTARGET//ligAni, via intramuscular. Os animais do grupo 2 (G2) receberam juntamente com o plasmídeo uma dose de 0,5% de xantana, via intramuscular, como adjuvante nas três imunizações. Nos dias 0, 13, 20 e 27, amostras de sangue foram coletadas a partir do plexo venoso retro ocular dos animais. As amostras foram incubadas por 15 min a 37° C e posteriormente por mais 30 min a 4° C. Centrifugou-se o sangue (10 min; 5000 g) e o soro foi utilizado para avaliação da resposta imune humoral.

A resposta imune humoral foi avaliada através de Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) indireto. Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 5 µg.mL⁻¹ da proteína rLigAni diluída em tampão carbonato bicarbonato pH 9,8. Soros dos animais na diluição 1:30 foram utilizados como anticorpo primário e anticorpo de cabra anti-imunoglobulinas de camundongos conjugado a peroxidase como anticorpo marcado. Todas as reações ocorreram por 1 hora, utilizando-se um volume de 50 µL por cavidade e, após todas as etapas de incubação, procedeu-se 3 lavagens com 200 µL/cavidade de PBS, pH 7,4 acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T). Após a remoção de excesso de conjugado, através de 5 lavagens com PBS-T, as

reações foram reveladas através da adição da solução cromógena ortofenilenodiamina (OPD) diluída em tampão fosfato-citrato, pH 4.0 (0,2 M com 0,01% de peróxido de hidrogênio) e incubação das placas no escuro por 15 min a temperatura ambiente. A leitura das densidades ópticas (D.O. 450 nm) foram realizadas em espectrofotômetro.

Como controles negativo e positivo da reação, foram utilizados o soro do dia 0 de um animal e anticorpo monoclonal anti-rLigAni, respectivamente. Unidades de ELISA foram calculadas dividindo-se a média das absorbâncias em duplicata das reações dos soros de cada animal pela média das absorbâncias do dia zero.

Foram eliminados os resultados dos soros que obtiveram a maior e a menor absorbância de cada grupo e calculada a média das duplicatas dos outros soros. Teste ANOVA seguido de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos em cada imunização.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação da vacina de DNA contendo o plasmídeo pTARGET/*ligAni* foi capaz de induzir uma resposta imune humoral em todos os animais vacinados, como demonstrado na Figura 1. Após a primeira imunização, somente os soros dos animais do grupo imunizado com xantana apresentaram unidades de ELISA estatisticamente superiores às obtidas pelos animais dos outros grupos. Esse resultado indica que a goma xantana foi capaz de potencializar a resposta imune humoral já na primeira imunização. Já após a segunda e terceira imunizações, houve diferença significativa nas médias de unidades de ELISA dos soros dos animais que receberam probióticos na sua alimentação e dos animais imunizados com xantana via intramuscular quando comparadas com as médias dos animais do grupo controle. Além disso, não houve diferença significativa nos valores de unidades de ELISA entre a segunda e terceira imunizações dos animais suplementados com o probiótico e com o biopolímero. Esses resultados indicam que *Saccharomyces boulardii* e xantana podem ser utilizados como adjuvantes de vacinas de DNA e que, quando utilizados, somente duas imunizações são suficientes para obtenção de uma resposta imune adequada.

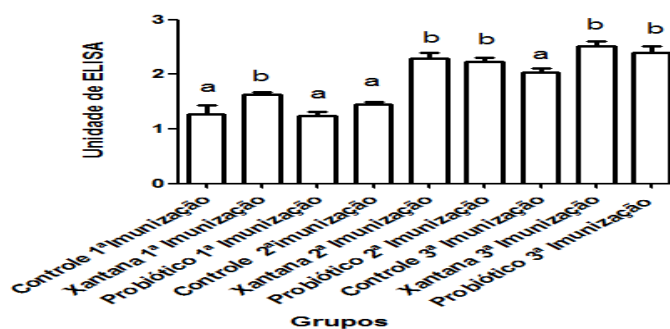


Figura 1: Avaliação da resposta imune humoral, através de ELISA indireto, de camundongos imunizados com uma vacina de DNA contra leptospirose (pTARGET/*ligAni*, 100 µg), utilizando como adjuvantes o probiótico *S. boulardii* e o biopolímero xantana. Os dados estão representados como médias de unidades de ELISA de duplicatas. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

4. CONCLUSÕES

O probiótico *Saccharomyces boulardii* e o biopolímero Xantana potencializaram a resposta imune humoral de uma vacina de DNA contra leptospirose em camundongos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DONNELLY, J. J & WAHREN, B & LIU, M. A. DNA vaccines: progress and challenges. *Journal Immunol*, V. 175, n. 2, p. 633-9, 2005.

MAZUMDER, S.; MAJI, M.; DAS, A; ALI, N. Potency, Efficacy and Durability of DNA/DNA, DNA/Protein and Protein/Protein Based Vaccination Using gp63 Against *Leishmania do novani* in BALB/c Mice. *Plos one*, V.6, 2011.

ZHANG, X.; DIVANGAHI, M.; NGAI, P.; SANTOSUOSSO, M.; MILLAR, J.; ZGANIAC, z, A.; WANG, J, B J.; XING, Z. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene. *Vaccine Journal*, V.25, n.7, P. 1342-52, 2006.

THOMAS, S.; PRZESDZING, I.; METZKE, D; SCHMITZ, J; RADBRUCH, A; BAUMGART, D. C. *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation. *Alternate Journal*. V. 156, P. 78-87, 2009.