

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces boulardii* COMO ADJUVANTE PARA VACINA DE DNA

LUISA DOMINGUES SCAPIN¹; MARCELLE MOURA SILVEIRA²; PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA³; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁴; ANGELA NUNES MOREIRA⁵; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO⁶

¹UFPEl - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – luisascapin@outlook.com

²UFPEl - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – marcellemsilveira@gmail.com

³UFPEl - Núcleo Engenharia de Materiais, CDTec- bilicadiaz@yahoo.com.br

⁴UFPEl - Instituto de Biologia, Departamento de microbiologia e Parasitologia- daianehartwig@gmail.com

⁵UFPEl-Departamento de Nutrição, Faculdade de Nutrição- angelanmoreira@yahoo.com.br

⁶UFPEl - Campus Universitário; Laboratório de Imunologia Aplicada, Cenbiot/CDTec – fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A vacinação com DNA é uma das mais promissoras técnicas de imunização contra uma variedade de patógenos e tumores, para os quais os métodos convencionais não têm sido eficientes. Estas comparadas às vacinas convencionais estão associadas a maior estabilidade e segurança, são facilmente preparadas em larga escala com pureza elevada, apresentam baixo custo de produção, estimulam uma resposta imune prolongada tanto humoral quanto celular (Alpar HO & Bramwell VW, 2002) e expressam a proteína com uma conformação mais próxima da sua forma nativa (Coban C. et al, 2013). Entretanto induzem, frequentemente, baixos títulos de anticorpos (Wang S. et al, 2000), fazendo com que sejam necessárias repetidas imunizações intramusculares (Zhang X. et al, 2007).

Adjuvantes auxiliam os antígenos a desencadearem a resposta imune mais cedo, com menor carga dos antígenos e com longa duração, ajudando o custo de produção destas vacinas (Gupta & Siber, 1995). Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em concentrações adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (OMS, 2001). Cepas probióticas com efeitos imunoestimuladores são capazes de aumentar as respostas imunes específicas a antígenos, podendo, desta forma, serem usadas como adjuvantes vacinais (Licciardiand Tang, 2011; Olivares et al., 2007). *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) é uma levedura probiótica que apresenta propriedades imunomoduladoras devido ao aumento de citocinas anti-inflamatórias, redução de citocinas pro-inflamatórias, secreção de fatores que modulam a restituição de células intestinais, ativação de células dendríticas e a proliferação de células-T (Thomas S. et al, 2009; Canonici A. et al 2011). Entretanto, ainda não foi avaliada como um adjuvante em vacinas de DNA.

Leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial (WHO, 1999) causada por espiroquetas do gênero *Leptospira*.

Proteínas presentes na membrana da leptospira vêm sendo produzidas de forma recombinante e demonstrando serem antígenos vacinais protetores (COUTINHO et al, 2011). Dentre estas proteínas, destacam-se as adesinas, em especial a LigB, pertencente a superfamília das *Immunoglobulin-Like* (Lig), sendo caracterizada por apresentar repetições de 12 a 13 domínios de afinidade por imunoglobulina, possuindo ainda alta identidade em sua região dita conservada,

na porção N terminal (LigBrep) em relação a outras proteínas da mesma família (MATSUNAGA et al, 2003). Seu papel na patogênese durante a infecção está relacionado com sua ligação a componentes da matriz extracelular, favorecendo a invasão e ligação as células do hospedeiro (Ko et al, 2009).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da levedura *S. boulardii* potencializar a resposta imune celular de uma vacina de DNA utilizando como imunógenos as sequências gênicas de fragmentos da proteína LigB de *Leptospira* utilizando camundongos BALB/c como modelo animal.

2. METODOLOGIA

A fermentação para obtenção da levedura *S. boulardii* proveniente do Laboratório de Imunologia Aplicada (CDTec – UFPel) foi realizada em caldo YPD e, após o processo fermentativo, as células foram recuperadas e armazenadas em 500 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril sob refrigeração.

A expansão do plasmídeo de expressão em eucariotos contendo o gene *ligBrep* (pTARGET/*ligBrep*) previamente construído por Forster et al. (2013) e a expressão da proteína LigBrep em larga escala por transformação em *E. coli* BL21 (DE3) STAR foram realizados conforme Sambrook e Russel (2001).

Foram utilizados camundongos fêmeas BALB/c, mantidos de acordo com as normas internacionais e em consonância com os princípios éticos de experimentação animal (COBEA), segundo projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel (registro nº 7603). Foram utilizados X animais divididos em 2 grupos, G1 e G2. Os animais do G1 foram alimentados somente com dieta sem o probiótico (grupo controle). Os animais do G2 foram alimentados com dieta isenta de antimicrobianos contendo 10^8 UFC de *S. Boulardii*.

O protocolo de imunização consistiu de três doses via intramuscular com 100 µg do plasmídeo pTARGET/*ligBrep* (dias 1, 14 e 21 do início da imunização). Para avaliação da resposta imune celular no 34º dia, os animais receberam uma dose contendo 50 µg da proteína rLigBrep, via intraperitoneal e no 37º dia amostras de sangue foram coletadas e acondicionadas em *ependorfs* com EDTA. Posteriormente, 500 µL dessas amostras foram transferidas para *ependorfs* livres de RNase, 1,3 mL de solução RNA lator foram adicionados e o material foi armazenado a -70 °C.

A resposta imune celular foi avaliada segundo protocolo descrito por Barjesteh et al. (2013) com modificações. Para a reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa quantitativa (qRT-PCR) em tempo real foram realizadas três extrações do RNA total a partir de três pools de amostras com 50 µL de sangue provenientes de cada animal para cada grupo (G1 e G2). Para a síntese de cDNA foram utilizados 0,5 µg de RNA. As reações de qRT-PCR foram realizadas no Stratagene® utilizando o SYBR® e os primers descritos na tabela 1. Os dados obtidos foram expressos em Ct, as amostras foram analisadas utilizando o software REST 2009 e a taxagênica de expressão relativa foi calculada em relação à expressão do GAPDH na reação de qRT-PCR em tempo real para avaliação da expressão relativa das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-γ e TGF-β.

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados na reação de qRT-PCR em tempo real para avaliação da expressão relativa das citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-γ e TGF-β.

Correlação (R ²)	Eficiência (%)	TM** *	Sequência	Gene
------------------------------	----------------	-----------	-----------	------

0,95	88	60°C	F* 5' CCAAGGTGCTTCGCATATTT3'	IL-4
			R** 5' ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT3'	
0,99	99	60°C	F 5' TTTGAATTCCTGGGTGAGAA 3'	IL-10
			R 5' ACAGGGGAGAAATCGATGACA 3'	
0,95	95	60°C	F 5' AGCACCAGCTTCTTCATCAGG3'	IL-12
			R 5' CCTTTCTGGTTACACCCCTCC3'	
0,98	73	60°C	F 5' TTCATCCACTGTCCCACTGA 3'	IL-17
			R 5' GTTCCTCTATGGGGTCGTCA 3'	
0,91	93	60°C	F 5' GCGTCATTGAATCACACCTG 3'	IFN-γ-gama
			R 5' TGAGCTCATTGAATGCTTGG 3'	
0,97	80	60°C	F 5' GCAACATGTGGA ACTCTACCAGAA 3'	TGF-β
			R 5' GACGTCAA AAGACAGCCACTCA 3'	
0,98	95.0	60°C	F 5' AACGCCCTTCATTGAC 3'	GAPDH
			R 5' TCCACGACATACTCAGCAC 3'	

*F: forward **R: reverse ***TM: Temperatura média de fusão

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foi demonstrado que o uso do *S. boulardii* como adjuvante foi capaz de aumentar significativamente os níveis de IL-10.

A IL-10 atua como fator de sobrevivência para linfócitos B, aumenta a produção de imunoglobulinas, é mediadora dos efeitos imunoestimuladores de linfócitos T (Llorente et al., 1995) e pode aumentar a eficácia de vacinas (Mocellin S. et al, 2005). Além disto, está associada a um melhor prognóstico da leptospirose em hamsters e com a redução da gravidade das lesões histopatológicas (Faisal et al., 2008). Assim, o *S. boulardii* apresenta potencial para ser usado como adjuvante em vacinas de DNA. O uso de adjuvantes, além potencializar a ação da vacina, pode permitir uma redução na quantidade de DNA utilizado e, com isto, uma redução no seu custo de fabricação. Ainda, por ser uma levedura não patogênica, o *S. boulardii* apresenta a vantagem de não possuir efeitos adversos.

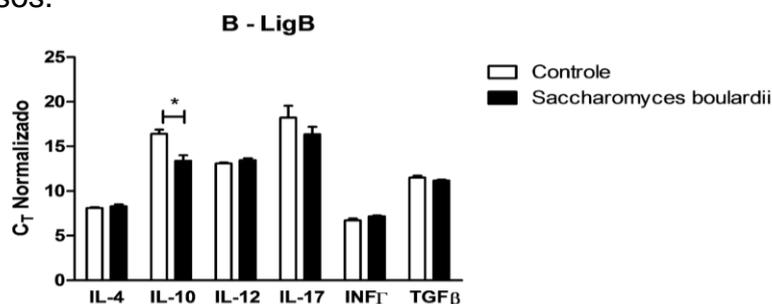


Figura 1: Níveis de mRNA de citocinas IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IFN-γ e TGF-β, avaliados através de qRT-PCR em tempo real.

4. CONCLUSÃO

Com este estudo pode-se avaliar a capacidade de *S. boulardii* de potencializar a resposta imune celular de uma vacina de DNA através do aumento da expressão da IL-10, mostrando que este probiótico tem potencial para ser empregado como adjuvante de vacinas de DNA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ko, A. I., GOARANT, C., MICARDEAU, M. **Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen.** Nat. Rev. Microbiol., v. 7, nº.10, p. 736-747, 2009.

MATSUNAGA, J. Barocchi M. A., Croda, J., Young T. A., Sanchez Y., Siqueira, I., Bolin, C. A., Reis, M. G., Riley, L. W., Haake, D. A., Ko, A. I. **Pathogenic Leptospira species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily.** Mol. Microbiol., v. 49, nº.4, p. 929-945, 2003.

Sambrook, J. & Russel. D. W. **Molecular Cloning – A laboratory Manual.** In (Cold Spring Harbor, Ed.), 2001.

World Health Organization. **Leptospirosis worldwide.** Wkly. Epidemiol. Rec.74:237–242, 1999.

Gupta, RK, Siber, RG. **Adjuvants for human vaccines:** Vaccine, v. 13, No. 14, pp. 1263-1276, 1995.

Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. **DNA vaccines: A simple DNA sensing matter?** Hum Vaccin Immunother 2013 Aug 2;9(10).

Alpar HO, Bramwell VW. **Current status of DNA vaccines and their route of administration.** Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2002;19(4-5):307-83.

Wang S, Liu X, Fisher K, et al. **Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminum phosphate.** Vaccine 2000 Jan 18;18(13):1227-35.

Zhang X, Divangahi M, Ngai P, et al. **Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene.** Vaccine 2007 Jan 26;25(7):1342-52.

Thomas S, Przesdzing I, Metzke D, Schmitz J, Radbruch A, Baumgart DC. **Saccharomyces boulardii inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation.** Clin Exp Immunol 2009 Apr;156(1):78-87.

Canonici A, Siret C, Pellegrino E, et al. **Saccharomyces boulardii improves intestinal cell restitution through activation of the alpha2beta1 integrin collagen receptor.** PLoS One 2011;6(3):e18427.

Forster KM, Hartwig DD, Seixas FK, et al. **A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response against leptospirosis.** Clin Vaccine Immunol 2013 May;20(5):725-31.

Barjesteh N, Hodgins DC, St PM, et al. **Induction of chicken cytokineresponses in vivo and in vitro by lipooligosaccharide of Campylobacter jejuni HS:10.** Vet Microbiol 2013 May 31;164(1-2):12230.

Llorente L, Zou W, Levy Y, et al. **Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus.** J Exp Med 1995 Mar 1;181(3):839-44.

Mocellin S, Marincola FM, Young HA. **Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint.** J Leukoc Biol 2005 Nov;78(5):1043-51.

Faisal SM, Yan W, Chen CS, Palaniappan RU, McDonough SP, Chang YF. **Evaluation of protective immunity of Leptospira immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters.** Vaccine 2008 Jan 10;26(2):277-87.