

AVALIAÇÃO DO SACCHAROMYCES BOULARDII COMO ADJUVANTE PARA VACINAS DE DNA

MARCELLE MOURA SILVEIRA¹; MARCELO MENDONÇA²;
PATRÍCIA DIAZ DE OLIVEIRA³; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁴; FABRICIO
ROCHEDO CONCEIÇÃO⁵; ANGELA NUNES MOREIRA⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas - marcellemsilveira@gmail.com

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

³Universidade Federal de Pelotas - bilicadiaz@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas - daianehartwig@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - fabriciorc@pop.com.br

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

1. INTRODUÇÃO

Nas vacinas de DNA, as quais têm sido avaliadas em diferentes modelos animais para diversas doenças infecciosas, virais e parasitárias (SEDEGAH et al., 2010; ZOU et al., 2010; JEON et al., 2011) a sequência de DNA que codifica para o antígeno de interesse é inserida em um plasmídeo, o plasmídeo é administrado *in vivo* e a proteína codificada é expressa em células hospedeiras. Comparadas às vacinas convencionais, as vacinas de DNA 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 e expressam a proteína com uma conformação mais próxima da sua forma nativa (COBAN et al., 2013). Entretanto induzem, frequentemente, baixos títulos de anticorpos, fazendo com que sejam necessárias repetidas imunizações intramusculares (ZHANG et al., 2007). Sendo assim, a descoberta de novos adjuvantes seguros e eficazes é essencial para o desenvolvimento de vacinas de DNA mais efetivas.

Adjuvantes atuam aumentando a resposta imune específica a um antígeno. Esse aumento de imunogenicidade do antígeno é capaz de modular a resposta imune reduzindo a quantidade de antígeno ou o número de imunizações necessárias (REED et al., 2009) e, conseqüentemente, o custo da vacinação.

Probióticos são definidos, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 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, dessa forma, serem usadas como promissores adjuvantes vacinais (OLIVARES et al., 2007).

Saccharomyces boulardii, uma levedura probiótica usada na prevenção e tratamento de diarreia e de outras doenças gastrointestinais, apresenta efeito imunomodulador, ou seja, leva a um incremento da resposta imune caracterizada pelo 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 proliferação de células T (CANONICI et al., 2011). Entretanto, o uso de *S. boulardii* como adjuvante de vacinas de DNA ainda não foi avaliado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *S. boulardii* potencializar a resposta imune humoral de vacinas de DNA utilizando como imunógeno a sequência gênica de um fragmento da proteína LigB (*ligBrep*). Esta proteína está exposta na superfície de *Leptospiras* patogênicas, sendo altamente conservada, está envolvida no mecanismo de patogenicidade desta bactéria, tem

sua expressão aumentada durante o processo de invasão e tem sido estudada como antígeno, principalmente em vacinas recombinantes (DELLAGOSTIN et al., 2011).

2. METODOLOGIA

A levedura *S. boulardii*, proveniente do Laboratório de Imunologia Aplicada (CDTec–UFPel), foi recuperada em caldo *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) por 24 h, a 28 °C e 200 rpm. Este cultivo foi adicionado a 7L de caldo YPD e incubado em biorreator de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific), a 28 °C, 500 rpm, 1 vvm de ar por 24 h, utilizando anti-espumante 204 (Sigma) em quantidade suficiente. Após o processo fermentativo, as células foram recuperadas, suspensas em solução salina (NaCl 0,9%) e adicionadas à ração comercial isenta de antimicrobianos e antifúngicos triturada (10^8 UFC.g⁻¹ de ração)

O plasmídeo de expressão em eucariotos contendo o gene *ligBrep* (pTARGET/*ligBrep*) previamente construído por FORSTER (2013) foi expandido e a proteína LigBrep foi expressa em larga escala em *E. coli* BL21 (DE3) STAR conforme descrito por SAMBROOK e RUSSEL (2001).

Camundongos fêmeas BALB/c foram divididos em dois grupos. Os animais do G1 foram alimentados somente com dieta sem o probiótico (grupo controle) e 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 humoral, amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 13, 20 e 27, a partir do plexo venoso retro ocular dos animais, processadas e armazenadas a – 20 °C.

A resposta imune humoral foi avaliada através de ELISA indireto. Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram sensibilizadas com 200 ng de rLigBrep diluída em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6). Em seguida foram adicionados os soros de cada animal diluídos 1:30 em PBS-T. Como controle negativo das reações, foi utilizado soro de camundongo não imunizado, e como controle positivo, anticorpo policlonal anti-rLigB, na diluição 1:100. Anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase diluído em PBS-T (1:4000) foi utilizado como anticorpo secundário. Todas as reações ocorreram por 1h a 37 °C, os reagentes foram utilizados a um volume de 50 µL/cavidade e após todas as etapas de incubação (exceto após a adição do conjugado), as placas foram lavadas três vezes com 200 µL/cavidade de 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 H₂O₂). As placas foram mantidas no escuro por 15 min a temperatura ambiente e a leitura das densidades ópticas foi realizada em espectrofotômetro para microplacas Thermo Plate a 450nm. A avaliação dos soros de cada animal foi realizada em triplicata.

Os níveis de anticorpos foram expressos em unidades de ELISA, dividindo-se a média das absorbâncias dos soros de cada animal pela média da absorbância do pool dos soros dos animais no dia zero.

Teste Anova seguido de Tukey foi utilizado para determinar diferenças significativas ($P < 0,05$) entre unidades de ELISA dos animais vacinados. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel (registro nº 7603).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imunização com três doses da vacina de DNA utilizando *S. boulardii* como adjuvante foi capaz de potencializar a resposta imune humoral específica conforme observado na Figura 1, pois os níveis de anticorpos dos animais alimentados com a levedura e vacinados com pTARGET/*ligBrep*, após a terceira imunização foram maiores do que os do grupo controle ($P < 0,05$).

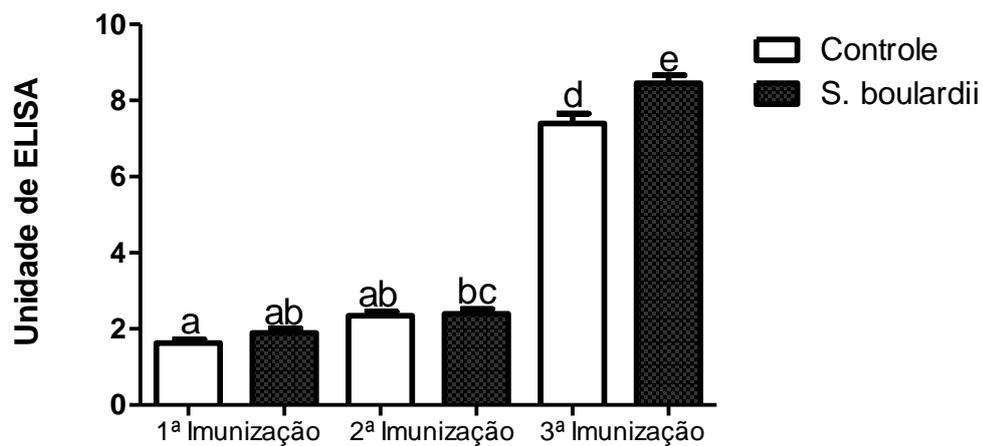


Figura 1. Níveis de anticorpos, avaliados através de ELISA indireto, de camundongos imunizados com vacinas de DNA (três doses de 100 μg via intramuscular) contra leptospirose, utilizando *S. boulardii* como adjuvante (10^8 UFC.g⁻¹ de ração a partir de quatorze dias antes da 1ª imunização) e o plasmídeo pTARGET/*ligBrep* como imunógeno. Letras diferentes representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com os encontrados por FORSTER (2013) após a segunda imunização em um estudo que utilizou 15% de Alhydrogel como adjuvante para avaliar o potencial protetor de vacinas de DNA utilizando o mesmo vetor expressando LigBrep na mesma dose (100 μg) utilizada no presente estudo e hamsters como modelo animal. Entretanto, no estudo de FOSTER (2013) os hamsters foram vacinados a intervalos de 21 dias e a resposta imune foi avaliada nos dias 21 e 42 após a primeira imunização. Ou seja, no presente estudo, embora tenham sido necessárias três doses para obter a mesma resposta frente ao mesmo antígeno, esta foi obtida em um menor período de tempo (após 27 dias).

O uso de adjuvantes, além de potencializar a ação da vacina, pode permitir uma redução na quantidade de DNA utilizado e, com isso, uma redução no seu custo de fabricação. Além disso, por ser uma levedura não patogênica, *S. boulardii* apresenta a vantagem de não possuir efeitos adversos e, seu uso como adjuvante em vacinas de DNA, além de potencializar a resposta imune humoral específica contra o antígeno, uma limitação normalmente observada neste tipo de vacina, proporciona efeitos benéficos à mucosa intestinal do hospedeiro, como incremento da resposta imune, da digestão, da absorção de nutrientes e prevenção ou tratamento de várias desordens intestinais (BUTS et al., 1990).

Assim sendo, os resultados obtidos representam uma contribuição importante no campo do desenvolvimento de vacinas.

4. CONCLUSÕES

Concluiu-se que o probiótico *S. boulardii* é capaz de potencializar a resposta imune humoral de vacinas de DNA, sugerindo o seu potencial como adjuvante.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CANONICI, A.; SIRET, C.; PELLEGRINO, E.; PONTIER-BRES, R.; POUYET, L.; MONTERO, M. P.; COLIN, C.; CZERUCKA, D.; RIGOT, V. e ANDRE, F. *Saccharomyces boulardii* improves intestinal cell restitution through activation of the alpha2beta1 integrin collagen receptor. **PLoS One**, v.6, n.3, p. e18427. 2011.

COBAN, C.; KOBIYAMA, K.; JOUNAI, N.; TOZUKA, M. e ISHII, K. J. DNA vaccines: a simple DNA sensing matter? **Hum Vaccin Immunother**, v.9, n.10, p. 2216-21. 2013.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F. e MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Hum Vaccin**, v.7, n.11, p. 1215-24. 2011.

JEON, B. Y.; EOH, H.; HA, S. J.; BANG, H.; KIM, S. C.; SUNG, Y. C. e CHO, S. N. Co-immunization of plasmid DNA encoding IL-12 and IL-18 with Bacillus Calmette-Guerin vaccine against progressive tuberculosis. **Yonsei Med J**, v.52, n.6, p. 1008-15. 2011.

OLIVARES, M.; DIAZ-ROPERO, M. P.; SIERRA, S.; LARA-VILLOSLADA, F.; FONOLLA, J.; NAVAS, M.; RODRIGUEZ, J. M. e XAUS, J. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. **Nutrition**, v.23, n.3, p. 254-60. 2007.

REED, S. G.; BERTHOLET, S.; COLER, R. N. e FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol**, v.30, n.1, p. 23-32. 2009.

SEDEGAH, M.; ROGERS, W. O.; BELMONTE, M.; BELMONTE, A.; BANANIA, G.; PATTERSON, N. B.; RUSALOV, D.; FERRARI, M.; RICHIE, T. L. e DOOLAN, D. L. Vaxfectin enhances both antibody and in vitro T cell responses to each component of a 5-gene *Plasmodium falciparum* plasmid DNA vaccine mixture administered at low doses. **Vaccine**, v.28, n.17, p. 3055-65. 2010.

ZHANG, X.; DIVANGAHI, M.; NGAI, P.; SANTOSUOSSO, M.; MILLAR, J.; ZGANIACZ, A.; WANG, J.; BRAMSON, J. e XING, Z. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF transgene. **Vaccine**, v.25, n.7, p. 1342-52. 2007.

ZOU, Q.; ZHONG, Y.; SU, H.; KANG, Y.; JIN, J.; LIU, Q.; GENG, S.; ZHAO, G. e WANG, B. Enhancement of humoral and cellular responses to HBsAg DNA vaccination by immunization with praziquantel through inhibition TGF-beta/Smad2,3 signaling. **Vaccine**, v.28, n.8, p. 2032-8. 2010.