

AVALIAÇÃO DE IL-10 e TNF- α INDUZIDA POR VACINAÇÃO TERAPEUTICA CONTRA A ESPOROTRICOSE EM MODELO MURINO

CAROLINA OLIVEIRA DA SILVA¹; SERGIO JORGE²; SABRINA DE OLIVEIRA CAPELLA³; NATASHA RODRIGUES DE OLIVEIRA⁴; JULIA MANUELA BRUNES BANDEIRA⁵; FABIO PEREIRA LEIVAS LEITE⁶

¹ Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas – carolinaosilva96@gmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas – sergiojorgevet@hotmail.com

³ Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas – capelas.oliveira@gmail.com

⁴ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas – oliveira_natasha@hotmail.com

⁵ Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Pelotas – bandeirajulia27@gmail.com

⁶ Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas – fleivasleite@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Causada por fungos do gênero *Sporothrix*, a esporotricose é a zoonose micótica mais comum no Brasil, e representa um sério problema de saúde pública, afetando humanos, cães e especialmente a população felina (PIÑEIRO, 2021). A doença apresenta lesões que acometem tecidos subcutâneos e se desenvolvem gradualmente, sendo transmitida por meio do contato com gatos infectados, especialmente através de ferimentos causados por mordidas ou arranhaduras (DE FRANKLIN et al., 2021). O *S. brasilienses* é responsável por altas taxas de mortalidade em felinos, por ser comum a ocorrência da doença na sua forma sistêmica e não apenas subcutânea (LOPES-BEZERRA & DE ALMEIDA, 2021).

O tratamento é realizado através da administração prolongada de antifúngicos, sendo limitados os princípios ativos disponíveis para uso, baseando-se principalmente no uso de itraconazol (PIÑEIRO, 2021). No entanto, a escolha do antifúngico pode variar dependendo do tipo de infecção, da resposta e de fatores individuais do paciente. (MATOS et al., 2023). Há também, casos de falha no tratamento, que ocorrem por diversos fatores como custo elevado dos fármacos, tempo e disponibilidade do tutor, dificuldade na administração oral dos medicamentos, uso generalizados dos antifúngicos gerando resistência, reações adversas e longo tempo de tratamento. (GREMIAO et al., 2022).

A resposta imune do hospedeiro desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da esporotricose (GARCÍA-LOZANO, 2018). Os mastócitos são uma das primeiras células do sistema imune a entrar em contato com patógenos invasores e, a partir da interação com leveduras de *S. schenckii*, ocorre a liberação de citocinas pró-inflamatórias (ROMO-LOZANO et al., 2014). De acordo com Castro et al (2016), a interleucina IL-10 e o fator de necrose tumoral (TNF- α) modulam o processo inflamatório envolvidos na resposta anti-fúngica.

Perante as limitações terapêuticas atuais para o tratamento de infecções fúngicas invasivas como a esporotricose, e do crescente problema de resistência e efeitos adversos dos medicamentos disponíveis, o desenvolvimento de vacinas contra o gênero *Sporothrix* representa uma alternativa para uso clínico, seja profilático ou terapêutico. (TÉLLEZ-MARTÍNEZ et al., 2019). Segundo Portuondo et al (2022), peptídeos da proteína SsEno e a Gp70 podem servir como base para

o desenvolvimento de vacinas seguras e eficazes para a prevenção e tratamento da esporotricose felina. Nosso grupo desenvolveu uma proteína quimérica (rChi) contendo epítopos imunogênicos fusionados das proteínas SsEno e Gp70 de *S. brasiliensis*. Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi caracterizar a resposta imune celular induzida (IL-10 e TNF- α) pela ação terapêutica de diferentes formulações vacinais compostas pela quimera rChi em camundongos infectados com cepa virulenta de *Sporothrix brasiliensis*.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção da vacina: Um plasmídeo (pET28a) contendo a região codificadora para a proteína quimérica (rChi) foi previamente desenhado por nosso grupo e sintetizado quimicamente por empresa especializada. O plasmídeo pET28a-Chi foi utilizado para a transformação da cepa de expressão *Escherichia coli* BL21 (DE3) Star. A proteína rChi foi expressa e purificada por cromatografia de afinidade conforme previamente descrito por Maia et al., (2022).

2.2 Inoculação e vacinação: Foram utilizados 50 camundongos BALB/c (*Mus musculus*), machos, com idade entre 6 a 8 semanas e, com peso entre 15 e 20g, provenientes do Biotério Central da UFPEL (Aprovação pela Comissão de ética no uso de animais CEUA-UFPEL043681/2022-72). Os animais foram divididos de forma aleatória em cinco grupos de 10 animais e identificados individualmente antes de iniciarem os procedimentos, conforme descrito a seguir: (G1) rChi (50 μ g); (G2) rChi (100 μ g) + Hidróxido de alumínio (AlOH₃) 15%v/v; (G3) rChi (100 μ g) + Montanide Pet-Gel; (G4) PBS (controle negativo); (G5) Itraconazol 10mg/kg diário, via oral (grupo controle positivo).

Todos animais de cada grupo foram desafiados experimentalmente com 0,02 ml por via subcutânea (coxim plantar direito) com inóculo de *Sporothrix brasiliensis* (10⁷células/ml) no dia 0. No dia 10 e no dia 24 pós infecção, os animais receberam os tratamentos por via subcutânea, conforme os grupos descritos anteriormente, exceto grupo itraconazol que recebeu tratamento diário por gavagem.

2.3 Resposta imune celular: Aos 38 dias, após a inoculação do fungo, todos os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica e o baço foi coletado e macerado. Realizou-se o cultivo dos esplenócitos (5 \times 10⁶ células/cavidade) em pools, em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), em triplicata, utilizando placas de cultivo celular com 24 poços. As células foram incubadas a 37 °C com 5 % CO₂ durante 24 horas e após adicionados os seguintes estímulos: 10 μ g de rChi, livre de endotoxinas, 10 μ g de Concanavalina (ConA) (Sigma-Aldrich) (controle positivo) e meio DMEM (controle negativo). Após, as células foram novamente incubadas durante aproximadamente 24 horas nas mesmas condições. RNA total foi extraído destas células utilizando TRIzol® reagente (Life Technologies) e a síntese de cDNA foi realizada com High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). PCR em Tempo Real (qPCR) foi realizada utilizando a plataforma LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche) utilizando primers específicos para as citocinas de interesse.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A transcrição de IL-10 e TNF- α foi avaliada usando qPCR. Células do baço de camundongos imunizados com rChi + AlOH₃ e o tratamento com itraconazol exibiram níveis de transcrição de IL-10 significativamente maiores em comparação ao grupo de controle negativo (PBS) e os outros tratamentos (Figura 1A). Adicionalmente, a transcrição de IL-10 nas células de animais vacinados com rChi

+ AlOH₃ foi significativamente superior quando comparada ao grupo itraconazol. Com relação a expressão de TNF- α (Figura 1B), o grupo rChi + hidróxido de alumínio também apresentou níveis maiores, porém não foi significativo em comparação com o controle negativo, podendo ser notado o aumento significativo, apenas no grupo controle positivo (itraconazol).

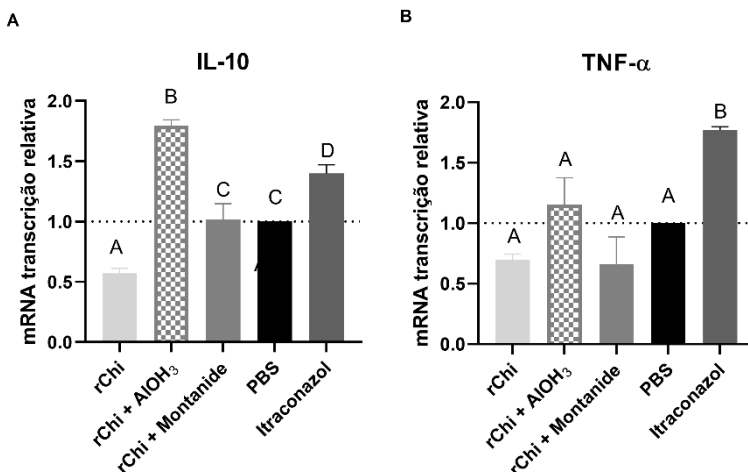


Figura 1: Níveis relativos de transcrição de IL-10 (A) e TNF- α (B) do pool de esplenócitos de camundongos que receberam diferentes tratamentos para esporotricose. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,05$) entre os grupos de terminadas por ANOVA de duas entradas seguido de pós teste de Tuckey.

Podemos observar que a formulação vacinal da proteína rChi associada ao AlOH₃ induziu um aumento significativo da transcrição de IL-10 no tratamento contra a esporotricose. Sabe-se que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, regula a resposta imune iniciada pelos mastócitos, reduzindo a inflamação excessiva (NAGATA & NISHIYAMA, 2021), o que pode estar associada a uma melhor taxa de recuperação induzida pelo tratamento com a proteína recombinante associada ao AlOH₃. O TNF- α é reconhecido como um mediador essencial na defesa do organismo contra infecções fúngicas (ROMO-LOZANO et al., 2014). A liberação desse mediador pelos mastócitos e outras populações celulares pode desempenhar um papel importante na resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção por esporotricose (ROMO-LOZANO et al., 2014). Neste estudo, o grupo 2 (rChi + AlOH₃) induziu maiores níveis de transcrição de TNF- α , contudo, não houve diferença estatística com os demais grupos, como o observado para o tratamento com itraconazol, o qual está associado ao estímulo da produção de moléculas pró-inflamatórias para o combate de infecções fúngicas (GRISOLIA et al., 2023). Tal resultado pode ser decorrente da maior resposta anti-inflamatória induzida pelos altos níveis de expressão de IL-10 neste grupo.

4. CONCLUSÕES

A formulação vacinal rChi + AlOH₃, mostrou-se capaz de induzir a transcrição de IL-10 em animais Desafiados experimentalmente com *Sporothrix brasiliensis*, indicando a modulação de uma resposta anti-inflamatória que pode ser benéfica para o tratamento da doença. Pesquisas futuras ainda são necessárias para validar o potencial profilático e terapêutico de formulações baseadas na proteína rChi que sejam efetivas contra a infecção por esporotricose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTRO, V. S. P.; DA SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; PAIM, F. C.; ... & ANDRADE, C. M. Cholinergic enzymes and inflammatory markers in rats infected by *Sporothrix schenckii*. **Microbial pathogenesis**, v. 97, p. 94-102, 2016.
- DE FRANKLIN, K. B. L., BARROS, T. M., DE ALMEIDA BEZERRA, T., SOARES, B. C. M., LUZ, A. M. F., & MOREIRA, E. A. C. Esporotricose zoonótica e sua relação com o ambiente rural e urbano: Revisão. **Pubvet**, v. 16, n. 05, p. a1107, 2021.
- GARCÍA-LOZANO, A. TORIELLO, C., ANTONIO-HERRERA, L., & BONIFAZ, L. C. *Sporothrix schenckii* immunization, but not infection, induces protective Th17 responses mediated by circulating memory CD4+ T cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1275, 2018
- GREMIÃO, I. D. F., MIRANDA, L. H. M., PEREIRA-OLIVEIRA, G. R., MENEZES, R. C., MACHADO, A. C. S., RODRIGUES, A. M., PEREIRA, S. A. Advances and challenges in the management of feline sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 39, n. 3-4, p. 61-67, 2022.
- GRISOLIA, J. C., P. L., SANTOS, L. A., IKEGALI, M., MALAKIAS, L. C. C., & BURGER, E. Itraconazole and neutrophil interactions in the immune-inflammatory response of paracoccidioidomycosis using a murine air pouch infection model. **Life Sciences**, v. 315, p. 121371, 2023.
- LOPES-BEZERRA, L. M.; DE ALMEIDA, S. R. Special issue on sporotrichosis: challenges to deal with the new emerging pathogenic species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1-3, 2021.
- MAIA, M. A. C.; BETTIN, E. B.; BARBOSA, L. N.; DE OLIVEIRA, N. R.; BUNDE, T. T.; ... & McBRIDE, A. J. Desafios para o desenvolvimento de uma vacina universal contra a leptospirose revelados pela avaliação de 22 vacinas candidatas. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 940966, 2022.
- MATOS, C.B. de; GUTERRES, K. A.; GUIM, C. C. da S.; WALLER, S.; CLEFF, M. B. Óleo essencial de *Origanum vulgare* no tratamento da esporotricose experimental cutânea. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 6, p. e0212641860, 2023.
- MICHELON, L. **Aspectos epidemiológicos e mensuração da interleucina-10 em felinos com esporotricose no município de Pelotas (RS) e região**. 2017. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.
- NAGATA, K.; NISHIYAMA, C. IL-10 in mast cell-mediated immune responses: Anti-inflammatory and proinflammatory roles. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4972, 2021.
- PIÑEIRO, M. B. C. **Terapêutica da esporotricose felina: revisão de literatura**. 2021. 60f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PORTUONDO, D. L., BATISTA-DUHARTE, A., CARDENAS, C., de OLIVEIRA, C. S., BORGES, J. C., TELLEZ-MARTINEZ, D., ... & CARLOS, I. Z. A *Sporothrix* spp. enolase derived multi-epitope vaccine confers protective response in BALB/c mice challenged with *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 166, p. 105539, 2022.
- ROMO-LOZANO, Y.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; SALINAS, E. *Sporothrix schenckii* yeasts induce ERK pathway activation and secretion of IL-6 and TNF- α in rat mast cells, but no degranulation. **Medical Mycology**, v.52, n.8, p.862-868, 2014.
- TÉLLEZ-MARTÍNEZ, D., BATISTA-DUHARTE, A., PORTUONDO, D. L., CARLOS, I. Z. Prophylactic and therapeutic vaccines against sporotrichosis. Feasibility and prospects. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 10, p. 432-440, 2019.