

PROBIÓTICO *SACCHAROMYCES BOULARDII* COMO ADJUVANTE PARA VACINA DE DNA CONTRA LEPTOSPIROSE EM CAMUNDONGOS

MARINA DA SILVA MEDEIROS¹, MARCELLE MOURA SILVEIRA²; DAIANE DRAWANZ HARTWIG²; PRISCILA MOURA DE LEON²; FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³; ÂNGELA NUNES MOREIRA³.

¹Universidade Federal de Pelotas – medeirosmarina82@gmail.com¹

³Universidade Federal de Pelotas - angelanmoreira@yahoo.com.br³

1. INTRODUÇÃO

Nas vacinas de DNA, genes que codificam antígenos de interesse são clonados em plasmídeos de expressão em eucariotos, os quais são posteriormente utilizados para vacinar animais, e as células expressa o antígeno do agente patogênico de interesse, fornecendo proteção ao hospedeiro (Coban C et al., 2013). Como o DNA é menos propenso à degradação e não há risco de infecção ao hospedeiro, as vacinas de DNA oferecem maior estabilidade e segurança em relação às vacinas convencionais. Além disso, produção em larga escala e um alto grau de pureza são facilmente obtidos a baixo custo (Miura N et al., 2015). Em relação a eficiência, essas vacinas podem estimular as respostas humorais e celulares por longos períodos (Miura N et al., 2015). No entanto, muitas vezes induzem baixos títulos de anticorpos (Wang S et al., 2000), resultando na necessidade de múltiplas doses (Miura N et al., 2015). Dessa forma, a investigação de novos adjuvantes e imunomoduladores seguros e eficazes é fundamental para o desenvolvimento de vacinas de DNA mais eficientes.

Imunomoduladores e adjuvantes de vacinas convencionais possuem a função de induzir o aumento da resposta imune, o que possibilita a redução da quantidade de antígeno ou número de doses necessárias e, consequentemente, os custos da vacinação (Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M, 2009). Alguns probióticos possuem a capacidade de desencadear efeitos imunoestimuladores e aumentar as respostas imunes específicas aos antígenos e, dessa forma, podem ser promissores como imunomoduladoras de vacinas (Roos TB et al., 2012). A levedura *Saccharomyces boulardii*, descrita por possuir capacidade probiótica imunomoduladora, ainda não tinha sido avaliada como adjuvante para vacinas de DNA. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade imunomoduladora de *S. boulardii* utilizada como probiótico em ração para camundongos, com o intuito de aumentar as respostas imunes humoral e celular de vacinas de DNA, utilizando como imunogênios as sequências de genes que codificam as proteínas LigAni e LigBrep de leptospiros.

2. METODOLOGIA

S. boulardii (10⁸ c.f.u. g⁻¹) foi obtido a partir do produto comercial liofilizado Floratil-Merck) foi adicionado à dieta específica para roedores (Supra) sem antibióticos. A formulação foi granulada, seca em um forno com circulação de ar durante 24 h a 40 ° C e armazenada a 4°C.

Camundongos BALB/c fêmeas de quatro a seis semanas de idade foram divididos de forma aleatória em quatro grupos contendo 12 animais. Os animais dos grupos 1 e 3 foram alimentados com dieta sem *S. Boulardii* (grupos controle).

Os animais dos grupos 2 e 4 foram alimentados com dieta contendo *S. boulardii* (10^8 c.f.u. g⁻¹) por 14 dias antes da imunização e durante todo o experimento. O protocolo de imunização consistiu em três doses (dias 0, 14 e 21). Visando aumentar a absorção do DNA, sacarose a 25% (100 μ l) foi aplicada no membro traseiro direito aproximadamente 45 minutos antes da imunização em todos os grupos. Nos grupos 1 e 2, a imunização foi realizada com pTARGET/ligAni (100 μ g), enquanto os grupos 3 e 4 receberam a mesma dose de pTARGET/ligBrep. Todas as inoculações foram realizadas por via intramuscular. Um dia antes de cada imunização e 1 semana após a última (dias 1, 13, 20 e 27), amostras de sangue foram coletadas do plexo venoso retro-orbital para avaliar a resposta imune humoral através de ELISA com proteínas recombinantes. A avaliação da resposta imune celular foi realizada com RNA extraído de amostras de sangue coletadas no 37º dia, de acordo com o protocolo descrito por Barjesteh et al. (ANO). A taxa relativa de expressão do gene foi calculada em relação à expressão de GAPDH, conforme descrito por Pfaffl et al. (ANO).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que o probiótico *S. boulardii* é um imunomodulador potencialmente promissor, uma vez que a administração de três doses de vacina de DNA utilizando *S. boulardii* como adjuvante melhorou a resposta humoral específica das duas vacinas avaliadas no experimento (Figura 1). Os níveis de anticorpos, por sua vez, aumentaram após a segunda e terceira imunização ($P < 0,05$) em relação ao controle, nas vacinas com pTARGET/ligAni ou pTARGET/ligBrep, respectivamente. Além disso, não houve diferença significativa ($P < 0,05$) nos níveis de anticorpos entre a segunda e a terceira dose quando os animais foram vacinados com pTARGET/ligAni.

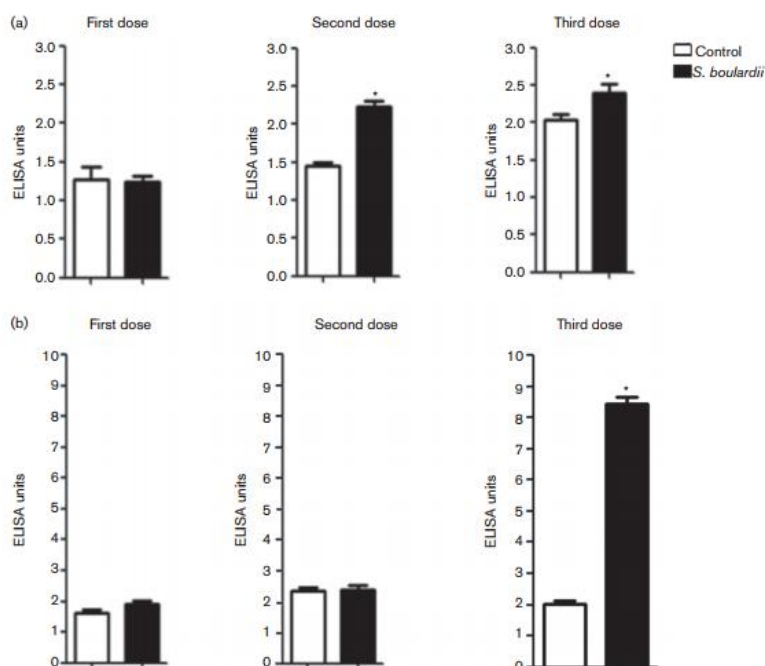


Figura 1: Níveis de anticorpos induzidos pelas vacinas de DNA pTARGET/ligAni e pTARGET/ligBrep utilizando *S. boulardii* como adjuvante. Os dados são representados como unidades ELISA médias de duplicatas. * representa diferença estatística ($P < 0,05$).

Esses resultados corroboram com os do estudo de avaliação de LigB como imunógeno em vacina de subunidade composta por alumínio como adjuvante (Yan W et al., 2009).

Com relação à resposta celular, os níveis de IL10 nos animais vacinados com pTARGET/ligBrep e administrados com *S. Boulardii* aumentaram significativamente em comparação ao grupo controle. A administração de *S. Boulardii* está associada ao aumento do nível de citocinas anti-inflamatórias, como observado no presente estudo, assim como à redução do nível de citocinas pró-inflamatórias (Thomas S et al, Canonici A. et al., 2009). No entanto, ainda não foi elucidado o exato mecanismo de ação de *S. Boulardii* na imunomodulação. Além disso, um estudo utilizando os probióticos *S. boulardii* e *Bacillus toyonensis*, demonstrou aumento da resposta imune no início da administração, o que sugere que a indução da resposta imune não exige a administração de probióticos durante longos períodos, facilitando o uso e reduzindo custos (Roos TB et al., 2012).

Vacinas de DNA possuem diversas vantagens em relação a produção, manipulação, custo e em relação a capacidade de induzir resposta imune humoral e celular. Como as proteínas recombinantes são produzidas na célula do hospedeiro, não há necessidade de etapas adicionais como solubilização, resultando em uma proteína com conformação mais semelhante à nativa e proporcionando um menor custo com maior eficácia (Ma J, Wang et al, . Kojima Y, Xin et al., 2014).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio do presente trabalho contribuem de forma importante para a área de desenvolvimento de vacinas, gerando futuras investigações em relação a *S. Boulardii* como imunomodulador para aumentar a eficácia de vacinas de DNA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Coban C, Kobiyama K, Jounai N, Tozuka M, Ishii KJ. DNA vaccines: a simple DNA sensing matter Hum Vaccin Immunother 2013;9: 2216–2221.
2. Buaklin A, Palaga T, Hannaman D, Kerdkaew R, Patarakul K et al. Optimization of the immunogenicity of a DNA vaccine encoding a bacterial outer membrane lipoprotein. Mol Biotechnol 2014;56: 903–910.
3. Forster KM, Hartwig DD, Seixas FK, Bacelo KL, Amaral M et al. A conserved region of leptospiral immunoglobulin-like A and B proteins as a DNA vaccine elicits a prophylactic immune response
4. Zou Q, Zhong Y, Su H, Kang Y, Jin J et al. Enhancement of humoral and cellular responses to HBsAg DNA vaccination by immunization with praziquantel through inhibition TGF-b/ Smad 2,3 signaling. Vaccine 2010;28:2032–2038.
5. Chen X, Zhang W, Gao W, Zou Q, Feng C et al. Hemokinin-1 as an adjuvant molecule enhancing humoral and memory responses to HBsAg DNA vaccination. Viral Immunol 2012;25:289–296.

6. Aps LR, Diniz MO, Porchia BF, Sales NS, Moreno AC et al. *Bacillus subtilis* spores as adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine* 2015;33: 2328–2334.
7. Lee HJ, Cho H, Kim MG, Heo YK, Cho Y et al. Sublingual immunization of trivalent human papillomavirus DNA vaccine in baculovirus nanovector for protection against vaginal challenge. *PLoS One* 2015;10:e0119408.
8. Tan Z, Zhou T, Zheng H, Ding Y, Xu W. Malaria DNA vaccine gp96NTD-CSP elicits both CSP-specific antibody and CD8+ T cell response. *Parasitol Res* 2015;114:2333–2339.
9. Mbanefo EC, Kumagai T, Kodama Y, Kurosaki T, FurushimaShimogawara R et al. Immunogenicity and anti-fecundity effect of nanoparticle coated glutathione S-transferase (SjGST) DNA vaccine against murine *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Int* 2015;64:24–31.
10. Miura N, Shaheen SM, Akita H, Nakamura T, Harashima H. A KALA-modified lipid nanoparticle containing CpG-free plasmid DNA as a potential DNA vaccine carrier for antigen presentation and as an immune-stimulative adjuvant. *Nucleic Acids Res* 2015; 43:1317–1331.
11. Wang S, Liu X, Fisher K, Smith JG, Chen F et al. Enhanced type I immune response to a hepatitis B DNA vaccine by formulation with calcium- or aluminum phosphate. *Vaccine* 2000;18:1227–1235.
12. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009;30:23–32.
13. FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002.
14. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonolla J et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007;23:254–260.
15. Licciardi PV, Tang ML. Vaccine adjuvant properties of probiotic bacteria. *Discov Med* 2011;12:525–533.
16. De Vrese M, Rautenberg P, Laue C, Koopmans M, Herremans T et al. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr* 2005;44: 406–413.
17. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995;13:310–312.
18. Roos TB, de Lara AP, Dummer LA, Fischer G, Leite FP. The immune modulation of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice immunized with experimental inactivated bovine herpesvirus type 5 vaccine. *Vaccine* 2012;30:2173–2177.



19. Thomas S, Przesdzing I, Metzke D, Schmitz J, Radbruch A et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits lipopolysaccharide-induced activation of human dendritic cells and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* 2009;156:78–87.
20. Canonici A, Siret C, Pellegrino E, Pontier-Bres R, Pouyet L et al. *Saccharomyces boulardii* improves intestinal cell restitution through activation of the $\alpha 2\beta 1$ integrin collagen receptor. *PLoS One* 2011;6:e18427.