



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE PEPTÍDEOS DE ANTÍGENOS
DE *Shigella* spp.**

ALINE RUBENS DE SOUZA

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM
BIOTECNOLOGIA

ALINE RUBENS DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE PEPTÍDEOS DE ANTÍGENOS
DE *Shigella* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Saúde.

Orientadora: Dr^a. Patrícia Puccinelli Orlandi

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729a	Souza, Aline Rubens de Avaliação do potencial vacinal de peptídeos de antígenos de Shigella spp. / Aline Rubens de Souza. 2018 95 f.: il.; 31 cm. Orientadora: Patricia Puccinelli Orlandi Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Shigella. 2. peptídeo sintético. 3. imunização. 4. vacina. I. Orlandi, Patricia Puccinelli II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	--

ALINE RUBENS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL VACINAL DE PEPTÍDEOS DE ANTÍGENOS
DE *Shigella* spp.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração em Saúde.

APROVADA EM: 15/05/2018

BANCA EXAMINADORA



**Profª Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi, Presidente
Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia**



**Prof. Dr. Adolfo José Mota, Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM**



**Prof. Dr. Gemilson Soares Pontes, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, não só por Ele ter sido o primeiro cientista a conseguir publicar os resultados sem revelar a Sua metodologia, mas também porque Ele me permitiu realizar este mestrado, segundo a sua boa, perfeita e agradável vontade. Porque d'Ele, e por Ele, e para Ele são todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, o meu Maior Mestre, que sempre me guia no melhor caminho que devo seguir e que é a razão de tudo para mim.

Ao meu noivo **Lucas Barbosa**, que eu tive a dádiva de conhecer neste mestrado, e que me mostrou desde o início até o final do projeto uma prestatividade e companheirismo imensuráveis. Eu não teria conseguido sem você amor. Então obrigada por ter sofrido junto comigo todos os momentos difíceis desse trabalho, bem como por ter se alegrado comigo com todas as vitórias. Você sabe que somos eu e você até o fim.

À minha família, meus pais **João e Micineia**, e minhas irmãs **Hellen e Caroline**. Vocês são a minha base. Obrigada de coração por me apoiarem sempre no caminho que estou trilhando para a minha estabilidade, encontro em vocês força para nunca desistir. Amo muito cada um e sonho com o dia em que irei retribuir de alguma forma tudo que já fizeram por mim.

Aos meus companheiros de laboratório **João, Juliane, Késsia, Paloma, Daniele, Wellington, Yury, Alessandra, Daniel, Fernanda e Ruth**. Por todo o apoio prestado já que eu era novata na Fiocruz, bem como pelas conversas e lutas diárias no nosso grupo DCDIA.

A **Paula Taquita**, que sempre esteve disposta a me ajudar quando tanto precisei. Obrigada por todos os conselhos e orientações que foram essenciais para o desenvolvimento desse projeto.

A minha orientadora **Dra. Patrícia Orlandi**, pela confiança depositada em mim para um trabalho tão importante, pela oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa, pelo incentivo e conselhos.

Aos professores **Dr. André Mariúba e Dr. Paulo Afonso Nogueira**, por toda a co-orientação prestada sobre a idéia do projeto.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia** pela oportunidade do curso, obrigada pelo incentivo.

A **Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ILMD**. Obrigada pela estrutura física e laboratorial.

A **FAPEAM**, agradeço pelo apoio financeiro fornecido no decorrer deste projeto.

*“Viver é a coisa mais rara do mundo. A maioria das
pessoas apenas existe.”*

Oscar Wilde

RESUMO

Shigelose é uma doença diarreica que afeta principalmente crianças menores de 5 anos, causada por uma bactéria Gram-negativa e enteroinvasiva denominada *Shigella*. Os camundongos estão entre os modelos de animais utilizados mais comuns para avaliação da resposta imune desse patógeno, devido sua similaridade com as respostas intestinais quando são submetidos à infecção. Como não está disponível ainda nenhuma vacina contra shigelose, propõe-se como alternativa as vacinas de peptídeos sintéticos, que são produzidas a partir de sequências de aminoácidos de proteínas da bactéria e são sintetizadas em laboratório. Assim, este estudo objetivou imunizar camundongos da linhagem BALB/c pela via intraperitoneal com peptídeos sintéticos que foram desenhados a partir de epítomos imunodominantes das proteínas de superfície da membrana externa de *Shigella* spp., denominadas OmpC, OmpA e FimH, e posteriormente submetê-los a infecção desafio com uma dose letal de uma cepa virulenta da bactéria – a *S. flexneri* 5a M90T, para estimar a capacidade de proteção dos peptídeos, simulando assim a idéia de uma vacina. A produção de anticorpos anti-peptídeos foi analisada por meio do teste imunoenzimático ELISA Indireto, e a avaliação do reconhecimento desses anticorpos nas proteínas nativas presentes nas espécies de *Shigella* foi realizada por Citometria de Fluxo. Após a infecção desafio, os camundongos foram observados em relação ao peso e sobrevivência, e o padrão de secreção de citocinas pós-desafio foi avaliado por CBA (*Cytometric Bead Array*). Os resultados demonstraram que todos os grupos de peptídeos testados demonstraram ser imunogênicos na primeira etapa de imunização com eles nos camundongos, assim como houve reconhecimento dos anticorpos nas proteínas de *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae* antes e após o desafio com a M90T. Todos os camundongos pertencentes aos grupos de peptídeos selecionados sobreviveram após a infecção desafio, porém os camundongos dos grupos do peptídeo 1 e do Pool- não conseguiram a recuperação do peso inicial. O grupo do peptídeo 2 se destacou entre os demais na avaliação das citocinas pós-desafio pelo equilíbrio observado entre elas, sugerindo assim uma regulação do sistema imune dos camundongos. Assim, entre todos os peptídeos testados neste trabalho, indica-se o P2 como o mais efetivo na via intraperitoneal, por ter demonstrado ser tanto imunogênico como um protetor eficaz na infecção por *Shigella*, o que favorece que ele seja um bom candidato vacinal para shigelose.

Palavras-chave: *Shigella*, peptídeo sintético, imunização, vacina.

ABSTRACT

Shigellosis is a diarrheal disease that mainly affects children under 5, caused by a Gram-negative and enteroinvasive bacterium called *Shigella*. Mice are among the most commonly used animal models for assessing the immune response of this pathogen, due to their similarity to intestinal responses when they are subjected to infection. As no shigellosis vaccine is available yet, synthetic peptide vaccines are proposed as an alternative, which are produced from amino acid sequences of bacterial proteins and are synthesized in the laboratory. Thus, this study aimed to immunize mice from the BALB/c line through the intraperitoneal route with synthetic peptides that were designed from immunodominant epitopes of the outer membrane surface proteins of *Shigella* spp., called OmpC, OmpA and FimH, and then subjected them to challenge infection with a lethal dose of a virulent bacterial strain - *S. flexneri* 5a M90T, to estimate the protective capacity of the peptides, thus simulating the idea of a vaccine. The production of anti-peptide antibodies was analyzed by means of the Indirect ELISA immunoenzymatic assay, and the evaluation of the recognition of these antibodies in the native proteins present in the *Shigella* species was performed by Flow Cytometry. After challenge infection, the mice were observed for weight and survival, and the post-challenge cytokine secretion pattern was assessed by CBA (*Cytometric Bead Array*). The results demonstrated that all groups of peptides tested showed to be immunogenic in the first step of immunization with them in mice, as well as recognition of the antibodies in *S. flexneri*, *S. boydii* and *S. dysenteriae* proteins before and after challenge with M90T. All mice belonging to the selected peptide groups survived after the challenging infection, but the mice in the Peptide 1 and Pool-groups did not recover the initial weight. The peptide 2 group stood out among the others in the evaluation of the post-challenge cytokines by the equilibrium observed among them, thus suggesting a regulation of the immune system of the mice. Thus, among all the peptides tested in this study, P2 is indicated as the most effective in the intraperitoneal route, because it has been shown to be both immunogenic and an effective protector in *Shigella* infection, which favors it being a good vaccine candidate for shigellosis.

Keywords: *Shigella*, synthetic peptide, immunization, vaccine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Incidência de Shigelose por região geográfica (2012-2017).....	21
Figura 02 - Mecanismo de patogenicidade de <i>Shigella</i> : Invasão e inflamação provocada pelo microrganismo.....	27
Figura 03 – Estrutura de OmpC, OmpA e FimH.....	32
Figura 04 - Esquematização demonstrando as imunizações em camundongos Balb/c.....	41
Figura 05 – ELISA Indireto da produção de anticorpos específicos IgG total contra <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	50
Figura 06 – ELISA Indireto da dosagem do soro anti- <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T. O soro foi testado nas concentrações: 1/100, 1/500, 1/1000 e 1/2000.....	51
Figura 07 – ELISA da triagem dos peptídeos sintéticos.....	53
Figura 08 - Alinhamento de P1 com as proteínas C de membrana externa (OmpC) de <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dysenteriae</i> e <i>S. flexneri</i> . feito através do Clustal Ômega.....	54
Figura 09 - Alinhamento de P2 com as proteínas A de membrana externa (OmpA) de <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. dysenteriae</i> e <i>S. flexneri</i> . feito através do Clustal Ômega.....	55
Figura 10 – Alinhamento de P6 com as proteínas A de membrana externa (OmpA) de <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. dysenteriae</i> e <i>S. flexneri</i> . feito através do Clustal Ômega.....	56
Figura 11 – Alinhamento de P9 com as proteínas FimH de <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. flexneri</i> , feito através do Clustal Ômega.....	57
Figura 12 – ELISA Indireto da produção de anticorpos IgG anti-peptídeos.....	58
Figura 13 – ELISA Indireto da dosagem dos soros anti-peptídeos.....	59
Figura 14 – Nível de reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse dos antissoros P1, P2, P6, P9 e Pool + pelos epítomos correspondentes presentes nas cepas de <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. dysenteriae</i> através de citometria de fluxo.....	62

Figura 15 – Taxa de sobrevivência dos camundongos após infecção-desafio com <i>S. flexneri</i> M90T.....	63
Figura 16 – Mensuração do peso dos camundongos de cada grupo de peptídeo e do grupo controle (C-) após desafio com <i>S. flexneri</i> M90T em relação ao peso inicial.....	65
Figura 17 – Mensuração do peso dos camundongos por grupo de peptídeo após desafio com <i>S. flexneri</i> M90T.....	66
Figura 18 – Mensuração do peso dos camundongos de todos os grupos de peptídeos juntos após desafio com <i>S. flexneri</i> M90T em relação ao peso inicial (peso 0).....	67
Figura 19 – Nível de reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse dos antissoros P1, P2, P6, P9 e Pool + pelos epítomos correspondentes presentes nas cepas de <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. dysenteriae</i> através de citometria de fluxo após o desafio com <i>S. flexneri</i> M90T.....	70
Figura 20 – Dosagem das Citocinas IL-4, IL-10, TNF, IL-6, IFN- γ , L-17 A e IL-2 por CBA (Cytometric Bead Array) com os soros dos camundongos pós-desafio de cada grupo de peptídeo e do grupo controle.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas de bactérias <i>Shigella</i> spp., com suas respectivas numerações.....	37
Tabela 2 - Informações das sequências peptídicas preditas pela ferramenta IEDB correspondentes aos epítomos lineares.....	38
Tabela 3 – Informações sobre o tamanho das proteínas em aminoácidos de OmpC, OmpA e FimH de <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. flexneri</i> e <i>S. dysenteriae</i> e seus respectivos números de acesso utilizados no programa Clustal Ômega.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variação

APC's – Células apresentadoras de antígenos

BSA – *Bovine Serum Albumin* (Albumina de soro bovino)

CBA - *Cytometric Bead Array*

CÉLULAS M – *microfold cells*

CEUA – Comitê de Ética em Pesquisa no Uso em Animais

DCDIA - Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia

D.O – Densidade Óptica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

FACS - *Fluorescence-activated cell sorting*

FimH – Proteína de dois domínios do pilus tipo I

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GEMS – Estudo Multicêntrico Entérico Global

IEDB – *Immune Epitope DataBase and Analysis Resource*

IFN – Interferon

IL – Interleucina

ILMD – Instituto Leônidas e Maria Deane

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas na Amazônia

Ipas – Proteínas de invasão

kb – Quilobases

kDa – Quilodáltons (massa molecular da proteína expressa em *daltons* - Da)

KLH - *Keyhole Limpet Hemocyanin* (hemocianina de lapa)

LB – Luria Bertani

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC II – Complexo Principal de Histocompatibilidade

Omp – *Outer membrane protein* (Proteína da membrana externa)

OmpA – *Outer membrane protein A* (Proteína da membrana externa A)

OmpC – *Outer membrane protein C* (Proteína da membrana externa C)

OMS – Organização Mundial de Saúde

P.M – Peso Molecular

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salina)

PMN – Leucócitos polimorfonucleados

SST3 – Sistema de Secreção do Tipo 3

STX – Citotoxina Shiga

TGF- β - Fator de transformação do crescimento beta

Th - Linfócitos T Helper

TMB – Tetrametil Benzênico

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UPEC – *Escherichia coli* urupatogênica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 <i>Shigella</i> spp.....	19
2.2 Epidemiologia de <i>Shigella</i> spp.....	20
2.3 Shigelose.....	23
2.4 Mecanismos de virulência de <i>Shigella</i> spp. e respostas imunológicas do hospedeiro.....	25
2.5 Vacinas de peptídeos sintéticos e seus antígenos candidatos para <i>Shigella</i> spp.....	28
2.6 Camundongo como modelo experimental para estudos imunológicos com <i>Shigella</i> spp.....	32
3. JUSTIFICATIVA.....	34
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo Geral.....	35
4.2 Objetivos Específicos.....	35
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.1 Animais.....	36
5.2 Cepas de bactérias de <i>Shigella</i> spp.....	36
5.3 Peptídeos Sintéticos.....	37
5.4 Desenho Experimental e Protocolo de Imunização.....	39
5.5 Produção de anticorpos específicos IgG total contra <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T e Protocolo <i>Heat-Killed</i>	42
5.5.1 ELISA Indireto para detecção de anticorpos contra <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	42
5.5.2 ELISA Indireto para a dosagem do soro anti- <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	43
5.6 Triagem dos Peptídeos.....	44
5.6.1 ELISA Indireto para determinação dos peptídeos mais imunogênicos.....	44
5.7 Alinhamento múltiplo das sequências peptídicas com proteínas das espécies de <i>Shigella</i> spp.....	44
5.8 Imunização com os Peptídeos Sintéticos.....	45
5.8.1 ELISA Indireto para avaliação da produção de anticorpos IgG anti-peptídeos.....	45

5.8.2	ELISA Indireto para a dosagem dos soros anti-peptídeos.....	45
5.9	Avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos por Citometria de Fluxo.....	46
5.10	Infecção desafio com <i>S. flexneri</i> 5a M90T e Estudo de Proteção.....	47
5.11	Avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos pós-desafio por Citometria de Fluxo.....	47
5.12	Dosagem de Citocinas por CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>), adaptado do protocolo da BD Biosciences CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit.....	48
5.13	Análise Estatística.....	49
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
6.1	ELISA Indireto da produção de anticorpos contra <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	50
6.2	ELISA Indireto da dosagem do soro anti- <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	51
6.3	ELISA Indireto da determinação dos peptídeos mais imunogênicos.....	52
6.4	Alinhamento múltiplo das sequências peptídicas de P1, P2, P6 e P9 com proteínas das espécies de <i>Shigella</i> spp.....	53
6.5	ELISA Indireto da produção de anticorpos IgG anti-peptídeos.....	57
6.6	ELISA Indireto da dosagem dos soros anti-peptídeos.....	58
6.7	Reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos antes da infecção desafio por Citometria de Fluxo.....	61
6.8	Taxa de sobrevivência dos camundongos após desafio com <i>S. flexneri</i> M90T.....	62
6.9	Mensuração do peso dos camundongos desafiados com <i>S. flexneri</i> M90T.....	64
6.10	Reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos pós-desafio por Citometria de Fluxo.....	68
6.11	Dosagem de Citocinas por CBA (<i>Cytometric Bead Array</i>) com os soros dos camundongos pós-desafio.....	71
7.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	81
	CONCLUSÃO.....	82
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
	ANEXO 1.....	95

1. INTRODUÇÃO

A doença diarreica é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Em 2015, sua estimativa foi de 1,31 milhão de mortes em pessoas de todas as idades (TROEGER *et al.*, 2017). Já entre crianças, existem aproximadamente 1,7 bilhão de casos a cada ano, sendo que entre as menores de cinco anos, ocorre cerca de 525.000 mortes anualmente (OMS, 2017). Entre os grupos de microrganismos potencialmente causadores dessa doença, *Shigella* sp. é descrita como um importante agente etiológico. Em 2015, foi classificada como a segunda principal causa de morte, com 164.300 óbitos (TROEGER *et al.*, 2017).

A ação desse patógeno no organismo refere-se a sua capacidade de invadir e se multiplicar dentro das células epiteliais da mucosa do cólon, o que resulta em uma resposta inflamatória intensa caracterizada por abscessos e ulcerações (PARSOT *et al.*, 2005). Assim, *Shigella* sp. pode sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos, escapar de vacúolos fagocíticos e ainda induzir a apoptose (KUBOTA, 2006). Devido a estes fatores, ela causa uma doença denominada shigelose ou disenteria bacilar. Os sintomas desta infecção incluem: dor abdominal, febre, cólicas intestinais e diarreia aquosa ou sanguinolenta, com ou sem muco (NUNES *et al.*, 2012).

Quanto às suas características fundamentais, *Shigella* sp. é descrita como uma bactéria Gram-negativa, não-móvel e enteroinvasiva (SANSONETTI, 2001). Existem quatro espécies deste gênero, denominadas como: *S. dysenteriae* - sorogrupo A, *S. flexneri* - sorogrupo B, *S. boydii* - sorogrupo C, e *S. sonnei* - sorogrupo D (BASTOS; LOUREIRO, 2011), cada uma com seus respectivos sorotipos. A sorotipagem é eficiente para distinguir as diferentes espécies, sendo que tais sorotipos são caracterizados pelo antígeno “O” da parede celular, codificado geralmente por genes cromossômicos (BOOP *et al.*, 2003).

Diante das consequências de longa duração que os episódios de diarreia consecutivos causam no desenvolvimento e crescimento infantil, como de afetar a absorção de nutrientes (PATH, 2015), a Organização Mundial de Saúde tem dado prioridade para o desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva contra shigelose (OMS, 2017). Vale ressaltar que uma vacina adequada deve cumprir certos requisitos, tais como: o sistema imune deve ser ativado e a vacina deve induzir o mínimo de efeitos secundários, além de ser simples de administrar (JENNISON; VERMA, 2004), pois crianças nos países em

desenvolvimento serão os principais destinatários, haja vista que são as mais afetadas. Infelizmente, nenhuma vacina está disponível até o momento, apesar das tentativas para este fim (MANI; WIERZBA; WALKER, 2016).

Tendo em vista a determinada situação crítica apresentada, tem sido proposto as vacinas de peptídeos sintéticos, que são produzidas a partir de sequências de aminoácidos de proteínas do patógeno e são sintetizadas em laboratório (KALIL; CUNHANETO; GUILHERME, 2008). O projeto de uma vacina de peptídeos eficaz exige a identificação de epítomos específicos no antígeno de proteínas, capazes de induzir a resposta imunológica esperada (SESARDIC, 1993).

No caso da *Shigella* sp., as proteínas de superfície da membrana externa (OMPs) têm sido mostradas como um importante alvo para um antígeno vacinal. Isto porque elas são as primeiras a serem reconhecidas pelo sistema imune das células B e T do hospedeiro, tornando-se assim um alvo significativo para o desenvolvimento de uma vacina isenta de células (JARZAB *et al.*, 2013). Além das OMPs, outra proteína presente na membrana externa das bactérias Gram-negativas, denominada FimH, também tem sido alvo de pesquisa como antígeno vacinal (KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2016).

As vantagens de utilizar os peptídeos sintéticos são diversas, pois eles não carregam material infeccioso, podem induzir anticorpos específicos no local, são quimicamente definidos podendo assim ser modificados, e ainda permitem a fabricação em grande escala rápida e armazenamento a longo prazo em caso de pandemia (FUJITA; TAGUCHI, 2011). A principal função deles é que podem ser reconhecidos e processados pelo complexo principal de histocompatibilidade II (MHC II), como normalmente ocorreria com outro antígeno do tipo proteico (ABBAS, 2012). As vacinas de peptídeos sintéticos podem ser assim úteis, tanto na prevenção como na terapia de doenças infecciosas.

Portanto, a avaliação do potencial vacinal de peptídeos de antígenos contra infecções por *Shigella* spp. torna-se essencial no contexto apresentado, pelo fato de contribuir para o desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra shigelose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Shigella* spp.

As bactérias do gênero *Shigella* estão entre os agentes patogênicos causadores da disenteria bacilar, reconhecida pela Organização Mundial de Saúde como uma das maiores preocupações de saúde pública global. Elas apresentam a seguinte classificação taxonômica: pertencem ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales e família Enterobacteriaceae (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2015).

No que tange às suas características celulares, são bactérias Gram-negativas, imóveis, com forma de bastonete, não esporuladas, enteroinvasivas, anaeróbias facultativas, não capsuladas e incapazes de fermentar a lactose (PHALIPON; SANSONETTI, 2007). Além disso, não expressam adesinas conhecidas e não formam biofilme (CARAYOL; NHIEU, 2013).

Shigella compartilha ainda várias características com o patótipo enteroinvasor de *Escherichia coli* (EIEC). Tal semelhança é comprovada por estudos genéticos e seria suficiente para agrupar as amostras em um mesmo gênero. Entretanto, diferenças na motilidade, perfil metabólico e manifestações clínicas dão suporte à decisão de manter estas bactérias em gêneros distintos (BELD; REUBSAET, 2012).

Quanto ao descobrimento de *Shigella*, pode-se inferir que a mesma foi identificada pela primeira vez em 1898 pelo Dr. Kiyoshi Shiga, ao trabalhar em um surto de disenteria que estava ocorrendo no Japão (NYOGI, 2005). Primeiramente a bactéria descoberta causadora da doença foi nomeada *Bacillus dysenteriae*, pois se acreditava ter relação com o *Bacillus coli* (hoje, *Escherichia coli*), sendo publicada no Journal of Bacteriology (YABUUCHI, 2002). Esse patógeno é conhecido hoje como *Shigella dysenteriae* 1, sendo o primeiro membro identificado do gênero *Shigella* (LEVINE *et al.*, 2007).

Posteriormente, os pesquisadores Simon Flexner, Mark Boyd e Carl Sonne observaram bactérias similares nos anos 1900, 1915 e 1931, respectivamente. Então, na edição do “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*”, o gênero foi nomeado *Shigella* – em homenagem ao seu descobridor (SASAKAWA, 2010).

Assim, a taxonomia oficial do gênero engloba quatro espécies, e consequentemente, quatro sorogrupos, denominadas: *S. dysenteriae* (sorogrupo A), *S. flexneri* (sorogrupo B), *S. boydii* (sorogrupo C) e *S. sonnei* (sorogrupo D) (BELD; REUBSAET, 2012). Tais espécies podem ser distinguidas com base em provas bioquímicas e sorológicas.

Em relação à quantidade de sorotipos presentes em cada espécie, pode-se inferir que: *S. dysenteriae* abrange 15 sorotipos, *S. flexneri* possui 14 sorotipos e subtipos (os quais são *S. flexneri* 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, X, e Y, incluído 2 novos subsorotipos: 7a e 7b), *S. boydii* com 20 sorotipos e *S. sonnei* a um único sorotipo (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2015).

Tais sorotipos são identificados com base em componentes da cadeia lateral específica do antígeno O, que é parte do polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), encontrado em todas as bactérias Gram-negativas nas suas membranas externas (PHALIPON; SANSONETTI, 2007). *S. sonnei* apresenta reação positiva para β -D-galactosidase e ornitina descarboxilase, o que a difere das demais espécies do gênero (MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2015; KHAN *et al.*, 2014).

2.2 Epidemiologia de *Shigella* spp.

A doença ocasionada por *Shigella* spp. é um notório problema de saúde pública por constituir-se como uma das principais doenças diarreicas bacterianas. Anualmente, tal patologia acomete cerca de 165 milhões de indivíduos mundialmente, com uma taxa de 14.000 óbitos, a maioria crianças (JOH *et al.*, 2013; KHAN *et al.*, 2014).

Em uma revisão epidemiológica realizada pelo Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA, 2017), foi elaborado um levantamento sobre a incidência mundial de *Shigella*, em casos ocorridos entre os anos 2012 a 2017. O estudo abordou casos nos continentes americano, africano, europeu, asiático e na Oceania (Figura 01).

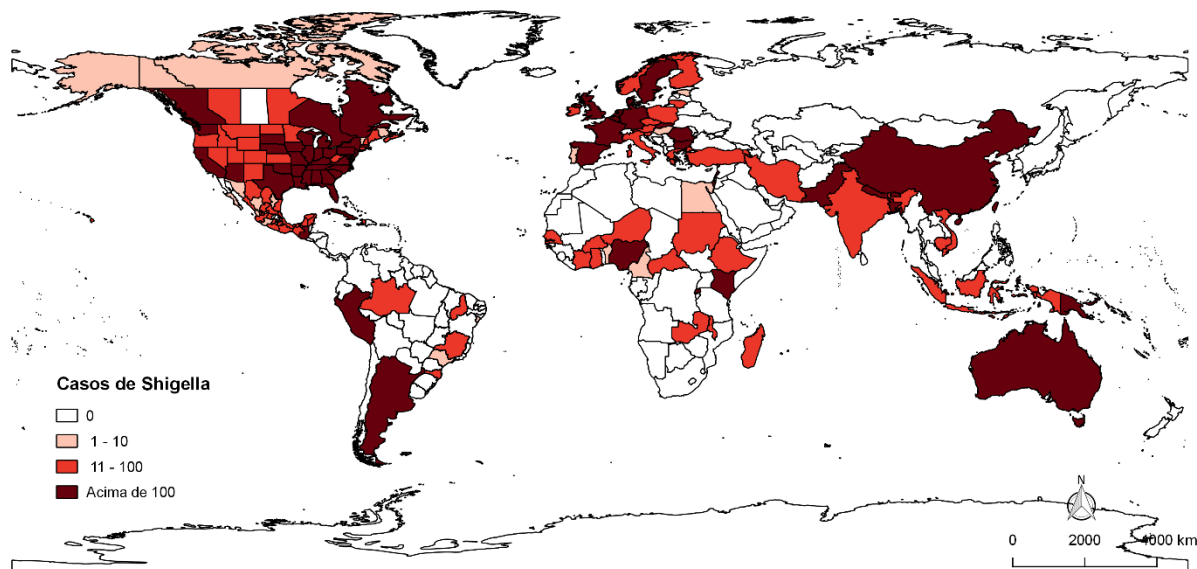


Figura 01: Incidência de Shigelose por região geográfica (2012-2017). Continentes que contribuíram para os dados de incidência: americano, africano, europeu, asiático e Oceania. **Fonte:** DCDIA, 2017.

Neste estudo, o Brasil foi caracterizado como uma região de 11 a 100 casos de *Shigella* sp. a cada 100.000 habitantes nos estados do Amazonas, Piauí, Minas Gerais e Santa Catarina. Já em São Paulo, o número de casos foi de 1 a 10 (DCDIA, 2017).

Diversas investigações epidemiológicas concluíram que as espécies de *Shigella* são geograficamente estratificadas com base no nível de desenvolvimento econômico em um determinado país. O principal sorogrupo encontrado em países em desenvolvimento é *S. flexneri* (60%) enquanto que as taxas de *S. sonnei* aumentam com o desenvolvimento econômico (15%) (LIMA; HAVT; LIMA, 2015). Isto também pôde ser observado recentemente através do estudo multicêntrico entérico global controlado por caso (GEMS), o qual demonstrou a predominância de *S. flexneri* (65,9%), seguido de *S. sonnei* (23,7%) na distribuição de 1.130 casos isolados de espécies de *Shigella* ocorridos em sete países em desenvolvimento na África subsaariana e no sul da Ásia (LIVIO; STROCKBINE; PANCHALINGAM, 2014).

As razões para o predomínio de *S. sonnei* e *S. flexneri* em regiões mais e menos desenvolvidas, respectivamente, ainda não são completamente esclarecidas. Uma possível explicação para a baixa frequência de diarreia associada a *S. sonnei* em regiões menos desenvolvidas é a possibilidade do LPS de *Plesiomonas shigelloides* sorotipo 17, idêntico ao de *S. sonnei*, conferir imunização cruzada contra *S. sonnei*. *P. shigelloides* também é uma enterobactéria, encontrada principalmente em águas não tratadas de ambientes

tropicais. Como o consumo de água não tratada é relativamente comum em países com baixo desenvolvimento econômico, a ingestão de *P. shigelloides* poderia conferir proteção contra infecção por *S. sonnei* ao atuar como uma vacina natural (SACK *et al.*, 1994).

No entanto, a medida que há uma melhoria na qualidade de vida das populações das regiões menos desenvolvidas, assim como a ocorrência de avanços socioeconômicos, estudos relatam um aumento na proporção de *S. sonnei* isolados em comparação com *S. flexneri* (HOLT *et al.*, 2012). Isto pode ser claramente observado a partir de investigações de vigilância clínica realizadas na China, as quais apontam um aumento de isolados de *S. sonnei* de 17,4 % em 2003-2004 para 58,2% menos do que uma década depois, em razão da rápida industrialização neste país (QIU *et al.*, 2015). De acordo com Hulland (*et al.*, 2013), o aumento dos casos de *S. sonnei* também foi detectado em Bangladesh, onde a proporção de infecções por este sorogrupo aumentou de 7 para 25% em casos ocorridos entre 2001 e 2011, o que corresponde a esforços de saneamento e água potável no país.

A quantificação clássica mundial para infecções por *Shigella* mostra que *S. flexneri* e *S. sonnei* respondem pela maioria dos casos de shigelose. *S. dysenteriae* é menos comum nos países desenvolvidos, no entanto, é frequentemente uma causa de surtos na África subsaariana e no sul da Ásia (NYGREN *et al.*, 2013). Infecções causadas por *S. boydii* são relativamente incomuns em todo o mundo por este sorotipo estar raramente associado a doenças diarreicas. Esta espécie foi detectada pela primeira vez na Índia e até agora tem sido pouco encontrada, exceto no subcontinente indiano (NIYOGI, 2005).

Nos Estados Unidos, estudos demonstram que *S. sonnei* é o agente de mais de 70% dos casos de shigelose. Há padrão sazonal, com maior número de casos de junho a outubro (verão-outono) e menor número de dezembro a janeiro (inverno) (JOH *et al.*, 2013). Na Coreia, a frequência da espécie é de 65% e o período de maior incidência é o verão (KIM *et al.*, 2013).

S. dysenteriae tipo 1 é mais comum no sul da Ásia e no sul do Saara. Além disso, é considerada a espécie mais virulenta devido à sua capacidade de produzir uma potente citotoxina denominada Shiga (STX), que pode causar doença clínica grave com complicações e, historicamente, tem levado a epidemias e pandemias devastadoras com alto índice de letalidade em todo o mundo (NIYOGI, 2005).

Já no Brasil, há maior prevalência de *S. sonnei* no Sudeste, enquanto *S. flexneri* é mais frequente no Norte e Nordeste do país (SOUSA *et al.*, 2010).

Em Belo Horizonte (Minas Gerais), *S. sonnei* é responsável por quase 90% dos casos da doença, observada principalmente no verão e no outono. Já em Teresina (Piauí), o agente etiológico predominante é *S. flexneri* (cerca de 80%), com maior prevalência nos meses chuvosos. Isto pôde ser comprovado por um estudo brasileiro realizado neste local entre janeiro de 2004 e agosto de 2007, onde espécies de *Shigella* foram isoladas de 400 crianças com diarreia aguda e sem diarreia, com idade de até 60 meses. Dentre as estirpes isoladas de 26 crianças com diarreia aguda (10,4%), observou-se a ocorrência de *S. flexneri* em 21 casos (80,8%) e *S. sonnei* em 5 casos (19,2%). Além disso, a shigelose foi mais comum em crianças com até 24 meses de idade, pois aproximadamente 70% de *S. flexneri* foram isoladas de crianças com idade inferior a 2 anos, enquanto que *S. sonnei* foram apenas para aquelas com mais de 2 anos de idade (NUNES *et al.*, 2012).

Em Manaus, também há prevalência de *S. flexneri* como agente etiológico de isolados em crianças que sofrem de diarreia. Isto foi evidenciado através de um estudo realizado com 1.339 crianças de 0-10 anos e pertencentes à população da periferia de Manaus. Dentre elas, foram identificados 30 isolados de *Shigella*, com variação na proporção dos sorogrupos: 60% de *S. flexneri*, 22,2% de *S. sonnei* e 6,6% de ambos sorogrupos, *S. dysenteriae* e *S. boydii* (CRUZ *et al.*, 2014).

Ainda na região Norte, vale ressaltar um estudo realizado no Pará, onde houve a frequência de sorotipos de *S. flexneri* isolados de 1979 a 2009, sendo a *S. flexneri* 2a classificada como a mais frequentemente isolada (BASTOS; LOUREIRO; HOFER, 2012). Outro estudo que merece destaque foi feito em Porto Velho, onde o gênero *Shigella* foi descrito como sendo o terceiro agente etiológico de diarreia infantil com uma frequência em torno de 8% dos casos nas populações infantis periféricas (ORLANDI *et al.*, 2001).

2.3 Shigelose

A manifestação clínica de *Shigella* em hospedeiros humanos ou primatas, denominada de shigelose, gera uma infecção intestinal aguda, com início dentro de 24 a 48 horas e duração normalmente de 5 a 7 dias (TRÉPANIER *et al.*, 2014). A doença geralmente é

autolimitada, mas pode tornar-se risco de morte se os pacientes forem imunocomprometidos (como por exemplo pacientes portadores do vírus HIV e crianças desnutridas) ou se o tratamento médico adequado não estiver disponível, devido a fatores econômicos (MANI; WIERZBA; WALKER, 2016).

Os sintomas incluem: fortes cólicas abdominais, febre e fezes contendo sangue e muco. Pode ocorrer, inicialmente, eliminação de fezes aquosas e volumosas, com evolução para eliminação frequente de fezes com sangue e pouco volumosas (KOTLOFF *et al.*, 1999). Assim, tais sintomas podem variar desde uma leve diarreia aquosa a uma disenteria bacilar grave e inflamatória. Em geral, *S. sonnei* e *S. boydii* causam uma diarreia mais branda que as espécies de *S. flexneri* e *S. dysenteriae* (RAM *et al.*, 2008).

Quanto à transmissão das bactérias, vale ressaltar que a mesma ocorre de um indivíduo para outro através da via fecal-oral, por alimentos e água contaminados, além de moscas já terem sido relatadas como vetores também (OJHA *et al.*, 2013). A dose infecciosa de *Shigella* é tão baixa quanto 10 células bacterianas (GERMANI; SANSONETTI, 2006). De acordo com Navia e Gascón (2005), surtos de origem alimentar ocorrem devido à propagação clonal de uma ou poucas estirpes de *Shigella*. Além disso, a shigelose é mais comum no verão, em decorrência do maior uso recreacional da água e aos hábitos precários de higiene que favorecem a transmissão de bactérias diarreiogênicas (NAUMOVA *et al.*, 2007).

Em relação ao tratamento de pacientes infectados por *Shigella* spp., pode-se inferir que o uso indiscriminado de drogas e a transferência horizontal de genes fez com que essas bactérias se tornassem resistentes aos antibióticos comumente utilizados, tais como: ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim (ASHKENAZI *et al.*, 2003). Um exemplo que merece destaque é referente a *S. sonnei*, que pode adquirir genes de resistência diretamente a partir de *E. coli* através da transferência horizontal de genes. Afinal, vários relatos sugerem que *S. sonnei* é capaz de compartilhar plasmídeos resistentes por conjugação com *E. coli* comensais (QU *et al.*, 2014; RASHID; RAHMAN, 2015). Os padrões de resistência das bactérias são influenciados por diversos fatores, tais como: localização geográfica, ano em que os isolados foram obtidos, classes de agentes antimicrobianos e pressão exercida pelo uso de antimicrobianos (PEIRANO; SOUZA; RODRIGUES, 2006). Com isso, torna-se necessário desenvolver estratégias de prevenção e de tratamento alternativos para pacientes com *Shigella* spp.

2.4 Mecanismos de virulência de *Shigella* spp. e respostas imunológicas do hospedeiro

Os avanços dos estudos recentes sobre *Shigella* conduziram a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à invasão de células epiteliais hospedeiras, utilizando principalmente *S. flexneri* como modelo. Vale ressaltar que a estratégia de virulência da bactéria depende da sua capacidade de sobreviver a condições hostis durante a sua viagem através do trato gastrointestinal, para competir com a microbiota hospedeira e atravessar a camada de muco intestinal (ANDERSON; SANSONETTI; MARTEYN, 2016).

Dessa forma, o conhecimento dos diversos mecanismos de virulência existentes entre as diferentes espécies de *Shigella*, juntamente com as respostas imunológicas do hospedeiro frente a eles, torna-se essencial para a compreensão da sequência de eventos celulares que ocorrem a partir do momento que o indivíduo entra em contato com este agente patogênico, até a expressão final da doença ocasionada por ele.

Para conseguir estabelecer a infecção sobrevivendo às condições variadas de temperatura, osmolaridade, pH e tensão de oxigênio, *Shigella* dispõe de um grande plasmídeo de virulência de 230 kb, que a auxilia na adaptação fisiológica, no processo de invasão e na disseminação (CARAYOL; NHIEUC, 2013). As bactérias sem este plasmídeo são avirulentas, isto é, não penetram em células epiteliais e não causam ceratoconjuntivite em cobaias (MÉNARD; DEHIO; SANSONETTI, 1996). Este plasmídeo possui uma região de 31 kb que contém 32 genes específicos para a invasão, sendo assim essenciais para a penetração da bactéria nas células hospedeiras (CARAYOL; NHIEUC, 2013).

O SST3 (Sistema de Secreção do Tipo 3) é um sistema descrito para bactérias Gram-negativas, com estrutura em forma de seringa, resultante da interação delas com as células do hospedeiro humano. Apresenta mais de 20 proteínas, denominadas proteínas efetoras. Dentre essas proteínas, as Ipas (proteínas de invasão) tem um papel importante na internalização nas células eucarióticas. Assim, o SST3 é responsável por transladar as proteínas bacterianas para o interior das células hospedeiras, e com isso modula diversas funções bioquímicas do hospedeiro, como a estrutura do citoesqueleto e a morte celular

programada (BOHN, 2011) - ações estas que a *Shigella* utiliza para a sua disseminação no organismo.

Shigella apresenta tropismo pelo epitélio do cólon e do reto, infectando, assim, o intestino grosso (REIS; HORN, 2010). O início do processo de sua patogênese no organismo constitui-se pela sua penetração no epitélio intestinal através das células M – células epiteliais membranosas, especializadas em apresentar antígenos do lúmen intestinal ao tecido linfóide adjacente, onde a resposta imune pode ser iniciada, através de linfócitos e macrófagos que reconhecem esses antígenos (SCHROEDER; HIBLI, 2008). Logo após a translocação por essas células, as bactérias são então fagocitadas por macrófagos residentes (SANSONETTI *et al.*, 1996).

Dentro do macrófago, estudos *in vitro* mostraram que após a entrada, a bactéria consegue lisar a membrana do fagossomo e observa-se a morte celular por indução de apoptose (SUZUKI *et al.*, 2005). Esse processo de morte ocorre, em média, quatro horas após a infecção. Como resposta, os macrófagos liberam uma variedade de mediadores, tais como citocinas e quimiocinas, que recrutam células do sistema imune e induzem a inflamação. Dessa forma, ao invadir o macrófago, há ativação da caspase-1, que é responsável pelo processamento e liberação de IL-1 β e IL-18, citocinas que promovem o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares para o local da inflamação (SANSONETTI *et al.*, 2001, KUBOTA, 2006).

Ambas as citocinas são mediadores críticos para a resposta inflamatória massiva e aguda, pois desestabilizam a integridade da parede intestinal, permitindo assim que as bactérias alcancem as células epiteliais localizadas em camadas mais profundas. Enquanto IL-1 β desencadeia a forte inflamação intestinal característica da shigelose, IL-18 está envolvida na geração de uma resposta inflamatória efetiva, ativando células *natural killer* e promovendo a produção de IFN- γ , amplificando, assim, a resposta imune inata (SCHROEDER; HILBI, 2008). Entre as proteínas envolvidas nesta primeira etapa, vale ressaltar as IpaB, IpaC e IpaD, pois o escape bacteriano do vacúolo fagocítico é mediado por essas proteínas. Por sua vez, IpaB sozinha é suficiente para ativar a apoptose do macrófago (CHEN *et al.*, 1996).

Após o escape dos macrófagos, *Shigella* invade os enterócitos pela superfície basolateral. Uma vez no citoplasma da célula, o microrganismo rompe o fagossomo

novamente e é capaz de se multiplicar e se disseminar horizontalmente, invadindo as células epiteliais adjacentes. Com essa disseminação lateral, a bactéria fica protegida das defesas extracelulares do hospedeiro, mostrando que este tipo de disseminação é um importante mecanismo de patogênese da mesma (Figura 02) (OLIVEIRA, 2013).

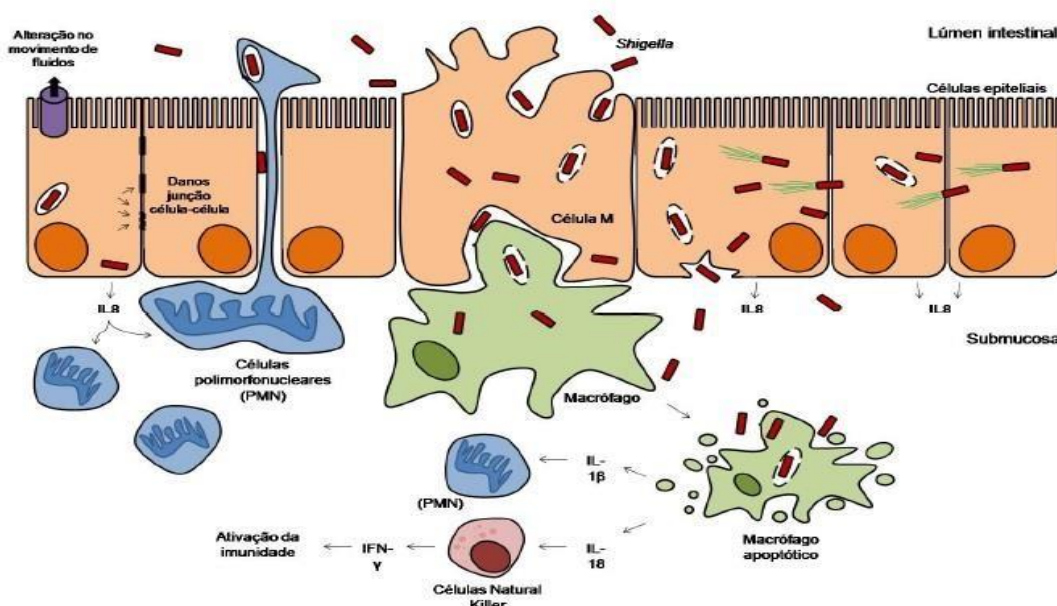


Figura 02 - Mecanismo de patogenicidade de *Shigella*: Invasão e inflamação provocada pelo microrganismo. Fonte: SCHROEDER; HILBI, 2008.

Para isto, ela acumula actina polimerizada em um de seus polos, formando uma espécie de cauda, que a propulsiona através do citoplasma. A proteína atuante neste processo é a IpaA, pois ao interagir com a vinculina, modifica sua estrutura. Este complexo liga-se aos filamentos de actina livres no citoplasma da célula, levando a um rearranjo do citoesqueleto (BOURDET-SICARD *et al.*, 1999). Desta forma, a bactéria regula a formação de projeções necessárias para sua invasão.

Assim, com a formação da cauda de actina, a bactéria é impulsionada até a borda da célula, onde irá induzir a formação de protrusões, propiciando assim a penetração da célula adjacente. O ciclo da infecção é então completado pela lise da dupla membrana formada pela protrusão, a fim de liberar o patógeno no citoplasma da célula vizinha. Este processo se repete até a destruição total da monocamada do epitélio intestinal (PARSOT, 2005).

A invasão das células epiteliais também estimula uma forte resposta inflamatória. Assim, essas células secretam uma série de citocinas, como IL-8, que, juntamente com a

resposta desencadeada pela presença da bactéria, atraem mais leucócitos polimorfonucleares da camada subepitelial para o lúmen intestinal (OLIVEIRA, 2013). Este grande recrutamento neutrofílico pode persistir por meses no organismo do hospedeiro. Em humanos infectados por *Shigella*, a análise de expressão de citocinas em fase aguda demonstrou grande regulação de pró-inflamatórios, como: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α e TNF- β ; e anti-inflamatórios, como: IL-10 e TGF- β (RAQUIB *et al.*, 1995).

Desta forma, todos os processos celulares ocasionados pela invasão e disseminação de *Shigella* – como morte dos macrófagos, destruição da camada epitelial e grande fluxo de células polimorfonucleares (PMN) - exacerbam a infecção bacteriana e a lesão tecidual (HODGES; GILL, 2010). O influxo das PMN está envolvido por romper as junções intracelulares existentes entre os enterócitos, comprometendo assim a integridade do epitélio e, conseqüentemente, favorecendo a entrada da bactéria do lúmen para a submucosa e vice-versa. Como decorrência desta grave destruição tecidual, os processos de absorção de água, nutrientes e solutos são interferidos, o que causa diarreia relativamente aquosa, assim como a presença de sangue e muco nas fezes - característica típica da shigelose (SASAKAWA, 2010).

2.5 Vacinas de peptídeos sintéticos e antígenos candidatos para *Shigella* spp.

Diversas abordagens de vacinas para *Shigella* sp. têm sido propostas, diante dos efeitos negativos de longa duração que os episódios de diarreia consecutivos ocasionados por essa bactéria causam no desenvolvimento e crescimento infantil. Esses episódios afetam a absorção de nutrientes no organismo da criança, o que leva a sua desnutrição, baixa estatura e conseqüentemente deficiências no seu aprendizado. Isso faz com que elas sejam impedidas de atingirem seu potencial cognitivo e estejam mais propensas a desenvolverem doenças crônicas (PATH, 2015). Porém, mesmo a *Shigella* sp. sendo responsável por essas conseqüências graves nas crianças, nenhuma vacina está disponível atualmente (MANI; WIERZBA; WALKER, 2016), demonstrando assim a vital importância de um modelo vacinal apropriado para o controle da shigelose.

Como alternativa para a referente questão, propõe-se vacinas produzidas a partir de sequências de aminoácidos de proteínas da bactéria, que são sintetizadas em laboratório, denominadas como vacinas de peptídeos sintéticos (KALIL; CUNHA-NETO; GUILHERME, 2008). O conceito de que peptídeos podem induzir imunidade protetora

contra doenças infecciosas surgiu em 1963, a partir da observação de que esses pequenos fragmentos de uma proteína do vírus do mosaico do tabaco induziram anticorpos neutralizantes em coelhos (ANDERER, 1963). Assim, é possível formular uma vacina que seja constituída apenas dos epítomos relevantes (capazes de induzir uma resposta imunológica) nos antígenos de proteínas de um determinado patógeno, pois os peptídeos sintéticos imitam tais epítomos (GOMARA; HARO, 2007).

As vantagens da utilização desse tipo de vacina são diversas, tais como: alto grau de pureza, completa caracterização química, ausência de contaminantes, completa reprodutibilidade, baixo custo de produção, estabilidade e ausência de mecanismos supressores, alérgicos ou autoimunes e de evasão, típicos de microrganismos (NEURATH *et al.*, 1986). Quanto às suas aplicações, pode-se inferir que tentativas em doenças humanas, como por exemplo na dengue e na esrongiloidíase, já têm sido realizadas para que se obtenha uma vacina baseada em peptídeo sintético (CHAKRABORTY *et al.*, 2010; FELICIANO; RIBEIRO; GONZAGA, 2016).

Vale ressaltar que tais peptídeos não estimulam facilmente as células T, e por causa de seu tamanho pequeno podem se comportar como haptenos, exigindo assim o acoplamento a um carreador de proteína adequado (JARZAB *et al.*, 2013).

Um exemplo de proteína carreadora é a hemocianina de lapa (KLH - *Keyhole Limpet Hemocyanin*), que é derivada da hemolinfa do molusco marinho não comestível *Megathura crenulata*, espécie nativa das águas costeiras do Pacífico da Califórnia e do México (HARRIS; MARKL, 1999). Quanto à sua função, a hemocianina atua como uma proteína transportadora de oxigênio para muitas espécies de moluscos, artrópodes e outros invertebrados (SWAMINATHAN *et al.*, 2014), sendo assim útil para as trocas gasosas na respiração celular. Quanto à sua estrutura, constitui-se como uma glicoproteína oligomérica extensa (~ 8.000 kDa) (HARRIS; MARKL, 1999), possuindo cobre em sua composição (SALVATO, 1990).

A KLH é considerada uma proteína transportadora altamente eficaz quando acoplada aos peptídeos sintéticos devido às suas propriedades imunoestimuladoras, tão potentes que já são conhecidas há mais de 45 anos (WEIGLE, 1964; CURTIS *et al.*, 1970). Por conta disso, essa proteína já foi amplamente utilizada em estudos imunotoxicológicos envolvendo animais, tais como macacos rhesus, coelhos e ratos (MEYER *et al.*, 1998; VOLKOVA *et al.*, 1998).

Quanto aos antígenos candidatos às vacinas de peptídeos sintéticos para *Shigella* spp., destacam-se as OMPs (proteínas de membrana externa) da mesma. Isso porque as OMPs contribuem marcadamente para os mecanismos de patogenicidade da bactéria, progressão da infecção e para o desenvolvimento da resposta inflamatória (BISWAS, 2000; SANSONETTI, 2001). Essas proteínas participam assim da manutenção da integridade celular, adaptação de patógenos ao ambiente e interação com as células hospedeiras (KOEBIK; LOCHER; VAN GELDER, 2000; LIN; HUANG; ZHANG, 2002).

Dentre as OMPs de *Shigella* sp. classificadas como antígenos imunodominantes, estão a OmpA (PORE *et al.*, 2011) e OmpC (JARZAB *et al.*, 2013), ambas conservadas entre as cepas de *Shigella* spp. e com epítipo exposto na superfície da célula (JARZAB *et al.*, 2013; PORE *et al.*, 2011) – o que favorece para serem candidatas a antígenos vacinais.

A proteína C da membrana externa (OmpC) constitui-se como uma das principais proteínas formadoras de poros das bactérias, as porinas (IYER; DELCOUR, 1997). Possui em sua estrutura canais triméricos caracterizados extensivamente nos níveis bioquímico, estrutural e genético (NIKAIDO, 1996) (Figura 03-A), cuja função é facilitar o transporte de nutrientes dentro da célula. Cada monômero é um barril de 16 β com um poro que permite a passagem de compostos solúveis em água de massa molecular até 600 Da. OmpC é ainda seletiva de cátions e compartilha um alto grau de homologia com OmpF (~60%) (IYER; DELCOUR, 1997).

A proteína A da membrana externa (OmpA) foi originalmente purificada em 1977, e estudos identificaram sua massa molecular na faixa de 28 a 36 kDa (CHAI; FOULDS, 1977). Possui em sua estrutura dois domínios: um domínio N-terminal, formado por um cilindro denominado barril β de oito filamentos (originado das folhas-beta pregueadas antiparalelas), que está incorporado na membrana externa, e um domínio C-terminal, que é globular e está localizado no espaço periplasmático (Figura 03-B) (CONFER; AYALEW, 2013).

Quanto às suas funções, pode-se afirmar que OmpA, assim como OmpC, possui atividade de porina, por não estar ancorada de forma covalente ao peptidoglicano (FINDLAY; MCCLAFFERTY; ASHLEY, 2005). Além disso, essa proteína também funciona como um receptor para vários bacteriófagos através de alças hidrofílicas expostas à superfície (FOULDS; CHAI, 1978). Essas alças extracelulares de OmpA interagem com

uma variedade de tecidos hospedeiros para adesão e invasão da célula, além de contribuir para a evasão de mecanismos de defesa do hospedeiro quando dentro da célula (KRISHNAN; PRASADARAO, 2012). A ativação de células dendríticas e a produção de citocinas também foram encontradas por OmpA de *Escherichia coli* (TORRES *et al.*, 2006).

Além das OMPs, outra proteína presente na membrana externa de um subconjunto de bactérias Gram-negativas, denominada FimH, também tem sido alvo de pesquisa como antígeno vacinal (KARAM; HABIBI; BOUZARI, 2016; SINGARAVELUA; SELVANA; ANISHETTY, 2014). O *pili* tipo 1 é composto por filamentos proteicos de 0,1 a 2 mm de comprimento na superfície das bactérias, e a adesão bacteriana no organismo do hospedeiro é mediada por eles (JONES *et al.*, 1995; HAHN *et al.*, 2002). A FimH é uma das subunidades que compõe esse *pili*, localizada na ponta distal do mesmo, funcionando assim como uma adesina fimbrial (WAKSMAN; HULTGREN, 2009).

Essa proteína possui em sua estrutura dois domínios: um domínio de lectina N-terminal (FimH_L) e um domínio de pilina C-terminal (FimH_P). A FimH_P possui uma dobra semelhante a imunoglobulina incompleta, e por conta disso, ela é completada pela inserção de uma fita doadora N-terminal da FimG, que é uma subunidade subsequente na montagem do pilus (Figura 03-C) (WAKSMAN; HULTGREN, 2009). FimH reconhece as manoses nas glicoproteínas epiteliais do hospedeiro, e por mediar a aderência das bactérias Gram-negativas nas membranas de mucosas, possui um papel importante no estabelecimento da infecção por *Shigella* sp. (SAUER *et al.*, 2016).

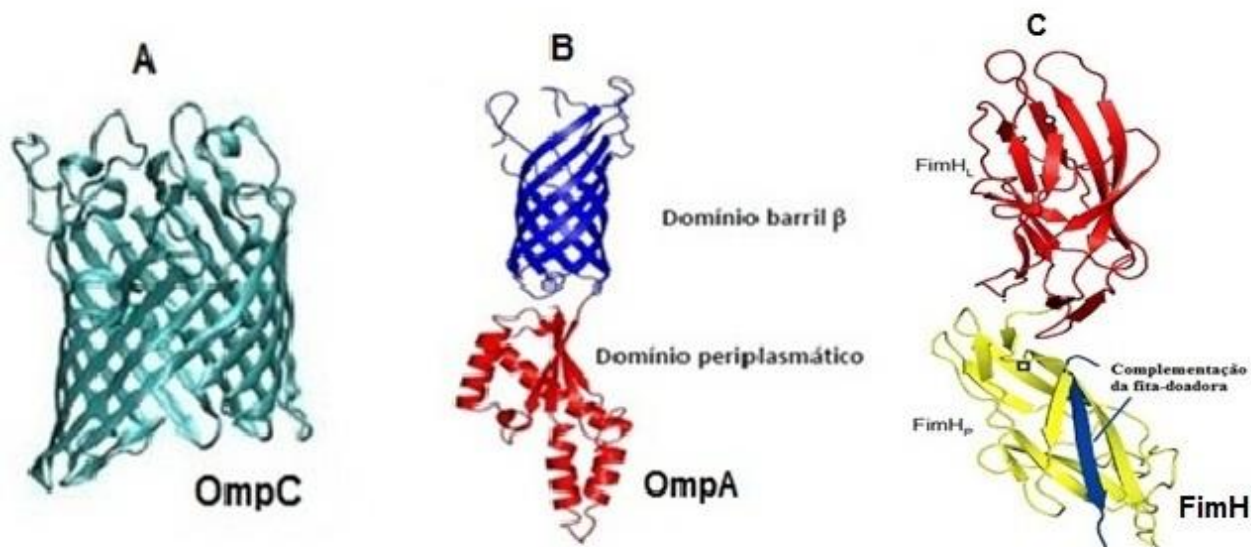


Figura 03 – Estrutura de OmpC, OmpA e FimH. (A) OmpC. (B) Estrutura do domínio barril β (em azul) e do domínio periplasmático de OmpA (em vermelho). (C) FimH: Domínio de lectina (FimH_L) em vermelho; domínio de pilina (FimH_P), em amarelo; complementação da fita-doadora N-terminal de FimG (em azul); círculo e quadrado indicam os terminais N e C, respectivamente. **Fonte:** LYU *et al.*, 2012; Adaptado de WALTON *et al.*, 2009; Adaptado de SAUER *et al.*, 2016.

2.6 Camundongo como modelo experimental para estudos imunológicos com *Shigella* spp.

Diversos modelos animais já foram utilizados para avaliar a imunogenicidade e a eficácia protetora de vacinas candidatas contra *Shigella* (GREGORY *et al.*, 2014; RABBANI *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 2013). Entretanto, a maioria deles não reproduz fielmente a disenteria bacilar humana, apenas os macacos conseguem representar tal infecção por inoculação oral (FORMAL *et al.*, 1984). Apesar disso, alguns modelos animais já provaram ser úteis por conseguirem imitar o processo invasivo que ocorre no epitélio da mucosa, tais como: o modelo de infecção pulmonar murino, a inoculação oral em camundongos recém-nascidos, a ceratoconjuntivite por infecção ocular em porquinhos-da-índia e a inflamação intestinal em coelhos (LIN; YANG; WU, 1964; HARTMAN *et al.*, 1991).

Os camundongos estão entre os modelos experimentais de laboratório mais utilizados em testes científicos, sendo assim úteis para mimetizar a disenteria bacilar ocasionada por *Shigella* sp. (YANG *et al.*, 2013). A linhagem de camundongos albinos Balb/c (espécie *Mus musculus*), em específico, é amplamente utilizada em diversas áreas da pesquisa pela sua particularidade na produção de anticorpos monoclonais (PAIGEN,

1995). Tal linhagem foi originalmente produzida em 1923 por MacDowell (MACDOWELL; LORD, 1927).

Para imitarem o processo invasivo que *Shigella* sp. causa no epitélio da mucosa intestinal em humanos, os camundongos da raça Balb/c podem ser infectados pela via intraperitoneal, a qual já foi relatada pela primeira vez há mais de 50 anos (MCGUIRE; FLOYD, 1958). Em um estudo realizado com camundongos que foram infectados por essa via com *Shigella flexneri* 2a, foi observado que o desafio provocou diarreia aguda e grave que imitava a shigelose humana, com sintomas que incluíam: perda de peso corporal, diminuição do comprimento do cólon, excesso de secreção de muco e aumento da liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas. A infecção ocorreu tanto nos compartimentos sistêmicos como nas mucosas (especialmente o cólon), em pontos de tempo precoces, sendo que as bactérias foram localizadas nos tecidos até à morte (YANG *et al.*, 2013). Assim, a via intraperitoneal constitui-se como um local de entrada promissor para a *Shigella* tanto no tecido sistêmico como no mucoso, pois resulta em sintomas e características semelhantes à shigelose em camundongos adultos.

3. JUSTIFICATIVA

A shigelose é uma doença diarreica de ocorrência mundial e problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Constitui-se assim como uma das maiores causas de morbidade, principalmente em crianças menores de 5 anos.

Apesar de cada vez menos crianças morrerem por infecções diarreicas pelo uso dos antibióticos de amplo espectro nos últimos anos, muitos sobreviventes enfrentam consequências de longa duração no seu desenvolvimento e crescimento devido aos episódios de diarreia consecutivos que adquirem durante o processo de infecção por *Shigella* spp. Isto porque esses episódios afetam a absorção de nutrientes no organismo da criança, o que leva a sua desnutrição, baixa estatura e deficiências no seu aprendizado. Assim, a criança fica impedida de atingir seu potencial cognitivo, além de estar mais propensa a desenvolver doenças crônicas. Todos estes efeitos perpetuam a exposição contínua das crianças às doenças diarreicas, e por esse motivo, faz-se necessário o desenvolvimento de uma vacina segura e eficaz contra shigelose.

Vale ressaltar que desde 1940 vem sendo desenvolvidas estratégias de vacina contra shigelose, porém nenhuma ainda é eficaz para a prevenção da infecção. Propõe assim as vacinas de peptídeos sintéticos, que por serem produzidas a partir de epítomos de proteínas de superfície da membrana externa de *Shigella* sp., podem induzir anticorpos específicos no local da infecção. Portanto, a avaliação do potencial imunogênico desses peptídeos de antígenos pode favorecer o desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra *Shigella* spp., minimizando assim sua disseminação de forma satisfatória.