



**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<sup>a</sup>. Patrícia Puccinelli Orlandi

MANAUS  
2018

## Ficha Catalográfica

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

S729a	<p>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.</p> <p>Orientadora: Patricia Puccinelli Orlandi Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Shigella. 2. peptídeo sintético. 3. imunização. 4. vacina. I. Orlandi, Patricia Puccinelli II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	--

**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

<b>Figura 01</b> - Incidência de Shigelose por região geográfica (2012-2017).....	21
<b>Figura 02</b> - Mecanismo de patogenicidade de <i>Shigella</i> : Invasão e inflamação provocada pelo microrganismo.....	27
<b>Figura 03</b> – Estrutura de OmpC, OmpA e FimH.....	32
<b>Figura 04</b> - Esquematização demonstrando as imunizações em camundongos Balb/c.....	41
<b>Figura 05</b> – ELISA Indireto da produção de anticorpos específicos IgG total contra <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T.....	50
<b>Figura 06</b> – 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
<b>Figura 07</b> – ELISA da triagem dos peptídeos sintéticos.....	53
<b>Figura 08</b> - 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
<b>Figura 09</b> - 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
<b>Figura 10</b> – 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
<b>Figura 11</b> – 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
<b>Figura 12</b> – ELISA Indireto da produção de anticorpos IgG anti-peptídeos.....	58
<b>Figura 13</b> – ELISA Indireto da dosagem dos soros anti-peptídeos.....	59
<b>Figura 14</b> – 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

<b>Figura 15</b> – Taxa de sobrevivência dos camundongos após infecção-desafio com <i>S. flexneri</i> M90T.....	63
<b>Figura 16</b> – 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
<b>Figura 17</b> – Mensuração do peso dos camundongos por grupo de peptídeo após desafio com <i>S. flexneri</i> M90T.....	66
<b>Figura 18</b> – 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
<b>Figura 19</b> – 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
<b>Figura 20</b> – Dosagem das Citocinas IL-4, IL-10, TNF, IL-6, IFN- $\gamma$ , L-17 A e IL-2 por CBA ( <i>Cytometric Bead Array</i> ) com os soros dos camundongos pós-desafio de cada grupo de peptídeo e do grupo controle.....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Cepas de bactérias <i>Shigella</i> spp., com suas respectivas numerações.....	37
<b>Tabela 2</b> - Informações das sequências peptídicas preditas pela ferramenta IEDB correspondentes aos epítomos lineares.....	38
<b>Tabela 3</b> – 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- $\beta$**  - 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

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>19</b>
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
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Objetivo Geral.....	35
4.2 Objetivos Específicos.....	35
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
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
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
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
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>81</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>95</b>

## 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.

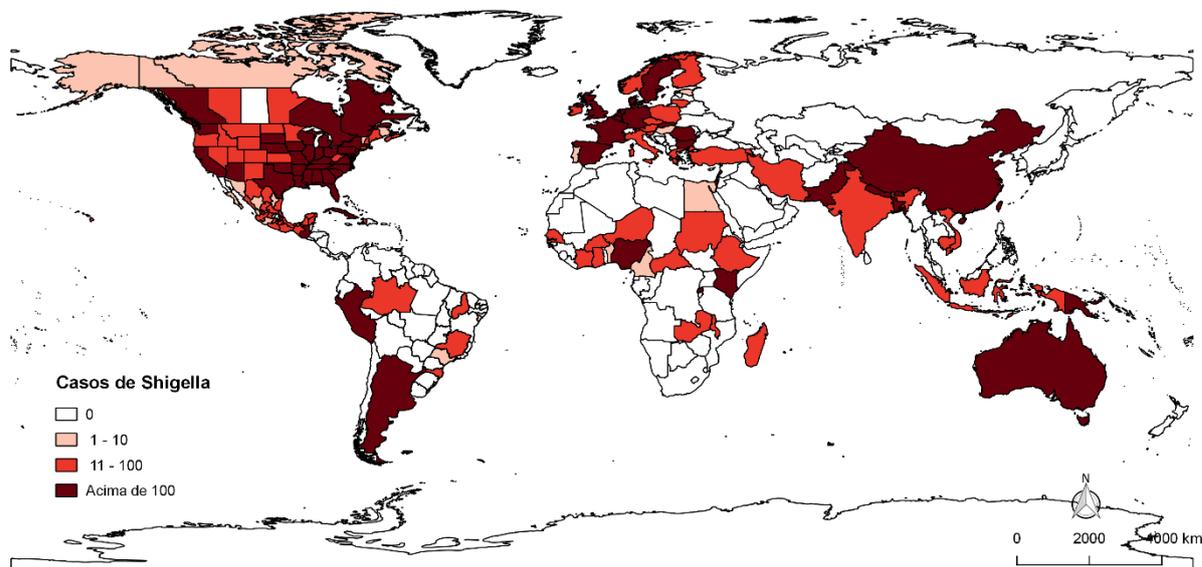
Em relação à quantidade de sorotipos presentes em cada espécie, pode-se inferir que: *S. dysenteriae* abrange 15 sorotipos, *S. flexneri* possui 14 sorotipos e subtipos (os quais são *S. flexneri* 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, X, e Y, incluído 2 novos subsorotipos: 7a e 7b), *S. boydii* 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  $\beta$ -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 (TRÉPANIÉ *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 diarreogênicas (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 seqüência 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.

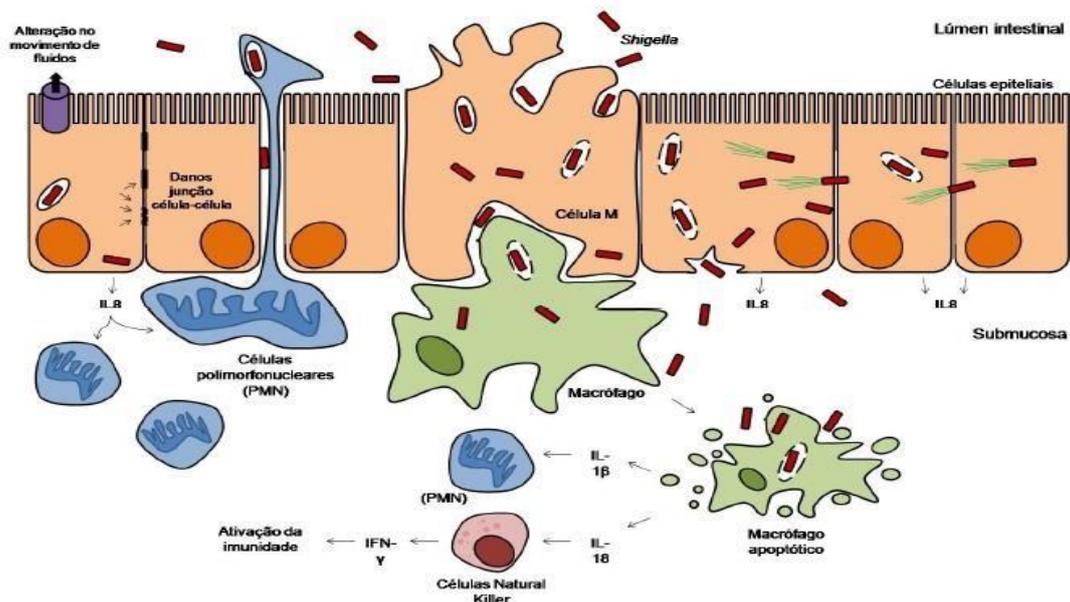
*Shigella* apresenta tropismo pelo epitélio do cólon e do reto, infectando, assim, o intestino grosso (REIS; HORN, 2010). O início do processo de sua patogênese no organismo constitui-se pela sua penetração no epitélio intestinal através das células M – células epiteliais membranosas, especializadas 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 $\beta$  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 $\beta$  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- $\gamma$ , 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 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ; e anti-inflamatórios, como: IL-10 e TGF- $\beta$  (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 seqüências 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 estrogiloidíase, 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  $\beta$  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).

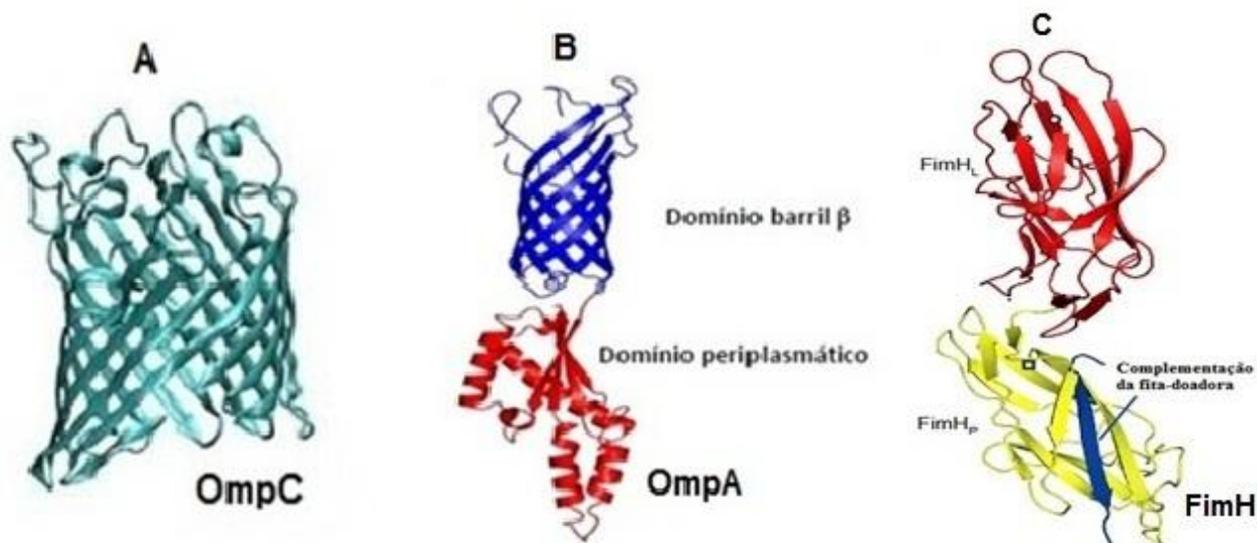
A proteína A da membrana externa (OmpA) foi originalmente purificada em 1977, e estudos identificaram sua massa molecular na faixa de 28 a 36 kDa (CHAI; FOULDS, 1977). Possui em sua estrutura dois domínios: um domínio N-terminal, formado por um cilindro denominado barril  $\beta$  de oito filamentos (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<sub>L</sub>) e um domínio de pilina C-terminal (FimH<sub>P</sub>). A FimH<sub>P</sub> 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  $\beta$  (em azul) e do domínio periplasmático de OmpA (em vermelho). (C) FimH: Domínio de lectina (FimH<sub>L</sub>) em vermelho; domínio de pilina (FimH<sub>P</sub>), 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.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito protetor de peptídeos de antígenos OmpC, OmpA e FimH contra infecções por *Shigella* sp., em modelo murino.

### 4.2 Objetivos específicos

- Estabelecer um modelo de imunização murino com a bactéria *Shigella flexneri* 5a M90T inativada para produção de anticorpos específicos IgG total e para avaliação dos epítomos de proteínas de superfície da membrana externa de *Shigella* sp.;
- Avaliar a resposta dos anticorpos sistêmicos específicos contra os peptídeos nos camundongos imunizados e o reconhecimento desses anticorpos contra diferentes cepas de *Shigella* spp.;
- Avaliar a capacidade protetora da resposta imune gerada pelos peptídeos sintéticos;
- Avaliar o perfil de citocinas (Th1/Th2/Th17) no soro dos camundongos pós-desafio.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Nesta pesquisa, foram utilizados camundongos da linhagem Balb/c de ambos os sexos, entre 6-8 semanas de idade, obtidos e mantidos em condições convencionais no Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Antes dos procedimentos experimentais, os animais foram transferidos para a sala de experimentação e mantidos em isolamento por um período de duas semanas, para que houvesse adaptação da microflora dos animais de acordo com o ambiente a qual estiveram expostos. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em microisoladores autoclaváveis, e alimentados com ração e água esterilizadas (por autoclave a 121°C). Foram mantidos até 5 animais por microisolador. A limpeza ocorreu com uma frequência de 2 vezes na semana com a troca da maravalha e microisoladores por outros previamente esterilizados. A autorização para o uso de animais neste trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) do INPA sob o número 059/2016 conforme o documento no anexo 1.

Todos os procedimentos experimentais com os animais seguiram as normas relativas à utilização humanitária de animais com a finalidade em pesquisa, regulamentado pelo inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais.

### 5.2 Cepas de bactérias de *Shigella* spp.

A cepa de bactéria padrão utilizada nesta pesquisa foi a *Shigella flexneri* 5a M90T. Também foram utilizadas 8 cepas clínicas de *Shigella flexneri*, 4 de *Shigella boydii* e 2 de *Shigella dysenteriae* (Tabela 1), isoladas de pacientes de hospitais da periferia de Manaus-AM, coletadas anteriormente em um trabalho realizado por CRUZ *et al.* (2014) e que pertence a coleção de microorganismos do Instituto Leônidas & Maria Deane, Fiocruz Amazônia (ILMD-FIOCRUZ Amazônia). As bactérias foram cultivadas sob as condições convencionais para crescimento, em meio líquido Luria Bertani (LB) à 37°C.

**Tabela 1** - Cepas de bactérias *Shigella* spp, com suas respectivas numerações.

Numeração	Espécie
M90T	<i>S. flexneri</i> 5a
2	<i>S. flexneri</i>
5	<i>S. flexneri</i>
7	<i>S. flexneri</i>
9	<i>S. flexneri</i>
15	<i>S. flexneri</i>
27	<i>S. flexneri</i>
30	<i>S. flexneri</i>
36	<i>S. flexneri</i>
11	<i>S. boydii</i>
13	<i>S. boydii</i>
14	<i>S. boydii</i>
25	<i>S. boydii</i>
4	<i>S. dysenteriae</i>
18	<i>S. dysenteriae</i>

**Fonte:** Coleção de microorganismos do Instituto Leônidas & Maria Deane, Fiocruz Amazônia (ILMD-FIOCRUZ Amazônia).

### 5.3 Peptídeos Sintéticos

Neste trabalho, foi feita a análise da capacidade protetora de antígenos de *Shigella* spp. Para isso, foram delineados doze peptídeos sintéticos com possível potencial vacinal, em um estudo anterior (PARDO, 2016). A imunogenicidade desses peptídeos foi testada primeiramente, para que dentre os doze, fossem selecionados apenas os peptídeos mais reativos, isto é, aqueles que fossem capazes de serem reconhecidos em maior quantidade por anticorpos anti-*Shigella* presente no antissoro dos camundongos.

As sequências de aminoácidos dos antígenos de *Shigella* adquiridos foram analisadas no estudo anterior para a identificação dos epítomos imunogênicos. As moléculas escolhidas foram as proteínas de membrana externa caracterizadas como receptores e canais seletores de pequenas moléculas, denominadas OmpC e a OmpA, e

também uma proteína componente do *pili* tipo 1 na membrana externa de um subconjunto de bactérias Gram-negativas, denominada FimH (PARDO, 2016).

O antígeno OmpC de *Shigella flexneri* 2a str. 301 já possui uma sequência peptídica predita em um estudo realizado anteriormente por Jarzab *et al.* (2013). Este peptídeo foi sintetizado e utilizado então como um controle positivo para comparação com os outros peptídeos desenhados (Tabela 2). Sendo assim, a metodologia de predição dos epítomos imunogênicos de *Shigella* feita no estudo anterior foram aplicadas somente para os antígenos OmpA e FimH (PARDO, 2016), e as sequências dos epítomos escolhidas para esses antígenos também estão descritas na Tabela 2.

A predição dos epítomos lineares resultou assim em 11 sequências peptídicas, sendo que o tamanho destas sequências variou de 6 a 13 aminoácidos. Outras informações também foram obtidas, como a posição do epítomo na sequência da proteína, peso molecular (P.M.) e a carga atribuída. As sequências desses peptídeos foram sintetizadas pela empresa Peptide 2.0, Chantilly, Virginia, EUA (PARDO, 2016).

**Tabela 2** - Informações das sequências peptídicas preditas pela ferramenta IEDB correspondentes aos epítomos lineares.

Código	Antígeno	Sequência Peptídica	Posição	Tamanho	*P. M.	Carga	Atributo
P1	OmpC	LNRYDERYIG	227-236	10	1298,41	0	Neutro
P2	OmpA	AQAAPKDNTWYT	19-30	12	1365,45	0	Neutro
P3	OmpA	GAFGGYQVNPY	59-69	11	1172,25	0	Neutro
P4	OmpA	PYKGDNINGAYKA	83-95	13	1410,54	1	Básico
P5	OmpA	TGVSPVFAGGVEYAITPE	142-159	18	1793,97	-2	Ácido
P6	OmpA	PITDDLDIYTR	107-117	11	1321,44	-2	Ácido
P7	FimH	GSAYGGVLSN	82-91	10	923,97	0	Neutro
P8	FimH	TVKYSGSSYP	95-104	10	1088,17	1	Básico
P9	FimH	VSSAGGVA	133-140	8	646,69	0	Neutro
P10	FimH	NNYNSD	156-161	6	725,66	-1	Ácido
P11	FimH	ANNDVVVPTG	171-180	10	985,05	-1	Ácido
P12	FimH	SLGAVGTSAV	260-269	10	860,96	0	Neutro

\*P.M.=Peso Molecular

Fonte: PARDO, 2016.

## 5.4 Desenho Experimental e Protocolo de Imunização

A primeira etapa dos experimentos com os camundongos referiu-se à imunização deles com a bactéria *Shigella flexneri* 5a M90T inativada na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC/mL (conforme protocolo descrito em 5.5), para obtenção de anticorpos específicos IgG total contra essa bactéria. Foram selecionados 24 camundongos (oito grupos de três camundongos cada), onde 12 foram imunizados com a bactéria inativada (cada um com 0,1mL do inóculo) e os outros 12 foram inoculados apenas com solução salina, para controle negativo. A via de administração foi intraperitoneal. Foram realizadas três imunizações, com intervalos de quinze dias em cada uma delas. Os animais foram devidamente anestesiados antes dos procedimentos, de acordo com o que preconiza as diretrizes estabelecidas pelo CEUA.

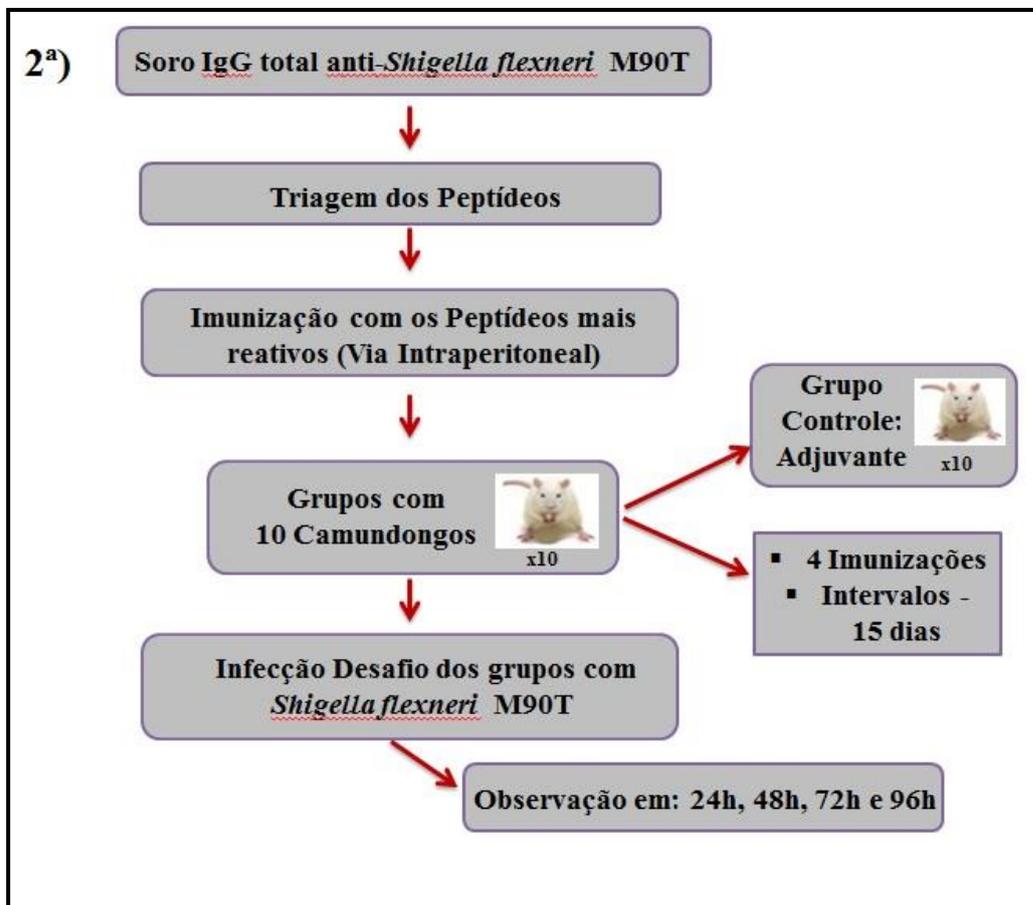
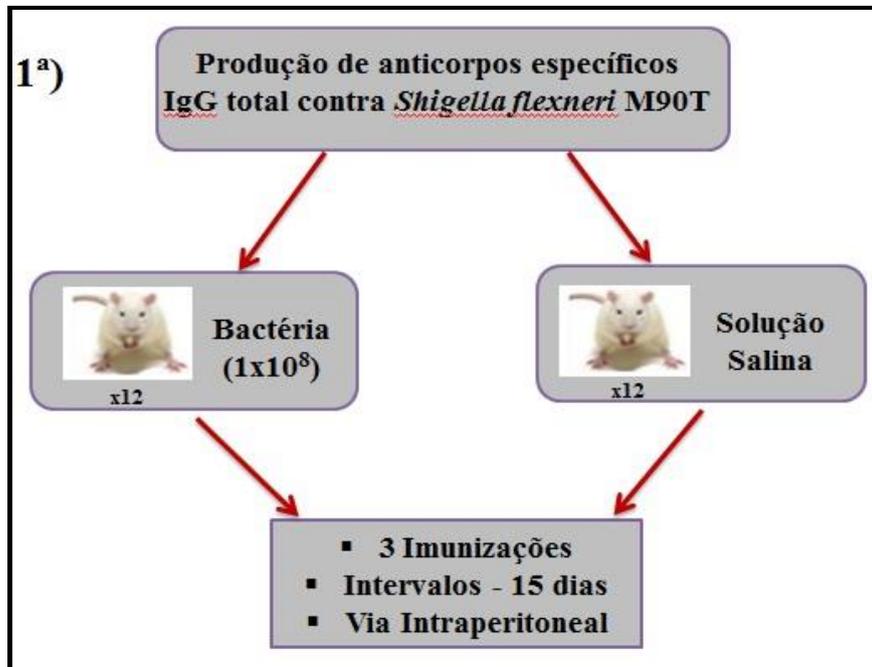
As amostras sanguíneas foram coletadas por corte na calda entre as imunizações e por punção cardíaca antes dos animais serem sacrificados. A eutanásia foi feita por meio da anestesia dos camundongos seguida de deslocamento cervical. O descarte das carcaças ficou a cargo da equipe técnica do Biotério Central do INPA. As amostras sanguíneas foram devidamente transportadas para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas & Maria Deane - FIOCRUZ Amazônia, onde foram processadas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro foi retirado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a dosagem dos anticorpos específicos contra *Shigella flexneri* 5a M90T por ELISA Indireto. Com a obtenção deste soro, foi realizada uma triagem dos doze peptídeos sintetizados anteriormente, para seleção daqueles mais imunogênicos, através da técnica de ELISA Indireto.

A partir dessa seleção, ocorreu a segunda etapa dos experimentos com os camundongos, referente à imunização deles com os grupos de peptídeos mais reativos após a triagem. Vale ressaltar que antes de cada uma das imunizações foi feito o acoplamento desses peptídeos com a proteína carreadora KLH. A solução de acoplamento ocorreu por meio da ligação covalente promovida pelos agentes químicos EDAC [cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] em concentração de  $11\mu\text{L}$  e NHS (N-hidroxissuccinimida) em concentração de  $11\mu\text{L}$ , adicionados a  $110\mu\text{L}$  de tampão MOPS [ácido 3-(N-mofolino)propanesulfônico],  $280,5\mu\text{L}$  de água Milli-Q,  $27,5\mu\text{L}$  de KLH e  $110\mu\text{L}$  de cada um dos peptídeos sintéticos. Essa solução de acoplamento foi preparada

em eppendorf's de 1,5mL para cada grupo de peptídeo, e deixou-se incubando em temperatura ambiente por 2 horas. Após tal procedimento, foi adicionado em cada eppendorf o Adjuvante de Freund (1:1), que funcionou como emulsificante da solução, e depois utilizou-se o vortex para mistura por 3 minutos. As soluções de acoplamento contidas nos eppendorf's foram então aspiradas em seringas de 1mL e sonicadas na amplitude 100 por 5 minutos. Por fim, aplicou-se 0,1mL da solução de cada grupo de peptídeo em cada camundongo contido nos grupos selecionados (adaptado do protocolo LATEEF *et al.*, 2007).

Foram selecionados nesta etapa da imunização com os peptídeos sintéticos 70 camundongos (sete grupos de dez camundongos cada). Utilizou-se como controle um grupo de camundongos imunizados apenas com Adjuvante de Freund. A via de administração foi intraperitoneal e foram realizadas quatro imunizações, com intervalos de quinze dias em cada uma delas. Assim, a coleta de sangue ocorreu nos dias 0°, 15°, 30°, 45°, 60°, através de corte caudal durante as imunizações. Após a coleta, as amostras foram devidamente transportadas para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas & Maria Deane – FIOCRUZ-Amazonia, onde foram processadas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. Os soros foram retirados e armazenados a -20°C até a dosagem dos anticorpos específicos contra os peptídeos por ELISA Indireto e até a avaliação do reconhecimento desses anticorpos por Citometria de Fluxo.

Após essa etapa, os 70 camundongos foram submetidos a uma infecção-desafio pela via intraperitoneal com a cepa padrão de invasão *Shigella flexneri* 5a M90T, para avaliação da capacidade protetora da resposta imune gerada pelos peptídeos sintéticos. Os camundongos foram observados durante 4 dias, em 24h, 48h, 72h e 96h após o desafio, com medição do peso em cada dia para comparação posterior com o peso inicial. No último dia (96h), foi retirado o sangue total de todos os camundongos por punção cardíaca. A eutanásia foi feita por meio da anestesia dos camundongos seguida de deslocamento cervical. O descarte das carcaças ficou a cargo da equipe técnica do Biotério Central do INPA. As amostras sanguíneas coletadas foram devidamente transportadas para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas & Maria Deane - FIOCRUZ Amazonia, onde foram processadas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos. O soro foi retirado e armazenado a -20°C para o uso em testes posteriores. A esquematização de todos esses procedimentos encontra-se na figura 04.



**Figura 04 - Esquemática demonstrando as imunizações em camundongos Balb/c. 1ª)** Imunização dos camundongos com a *Shigella flexneri* M90T inativada, para obtenção de anticorpos específicos IgG total contra essa bactéria. **2ª)** Imunização dos camundongos com os grupos de peptídeos mais reativos após a triagem, seguido da infecção desafio de todos esses grupos com *S. flexneri* M90T.

## **5.5 Produção de anticorpos específicos IgG total contra *Shigella flexneri* 5a M90T e Protocolo *Heat-Killed***

Os anticorpos contra a bactéria *Shigella flexneri* 5a M90T foram produzidos primeiramente, conforme mencionado no desenho experimental. Para a bactéria ter sido inoculada nos camundongos de forma inativada, utilizou-se o protocolo denominado *Heat-Killed* (adaptado de BARMAN *et al.*, 2013), específico para *Shigella* e imunização em camundongos Balb/C.

Quanto aos procedimentos dessa técnica, pode-se inferir que: as colônias de bactérias *Shigella flexneri* 5a M90T foram colocadas primeiramente em meio líquido LB (Luria Bertani) por 16 horas para crescimento. Após isso, as bactérias foram colocadas para crescer novamente em meio LB ágar. Com o crescimento em placa de colônias separadas, foi colocado para crescer novamente em meio líquido LB apenas uma colônia. Foi feita então a diluição da cultura bacteriana de 1: 100 no meio LB, e esperado ela crescer até atingir a D.O 600 = 0,6. Após esse alcance da D.O, as células foram centrifugadas a 600 rpm por 10 minutos, em eppendorf de 1,5 mL. O pellet foi congelado então a -80°C.

Após isso, foi feita a ressuspensão de 1,5 mL de sedimento de cultura das células bacterianas em 0,75 mL de um tampão de lise específico para bactérias, e depois tais células foram incubadas por 30 minutos no gelo. Feito isso, a amostra foi sonicada 3 vezes por 20 segundos cada, até a mesma não ser mais viscosa. Ela foi centrifugada mais uma vez a 12.000 rpm por 20 min, em 4 °C. Depois foi lavada com PBS 1X por 3 vezes. Após todos esses procedimentos, a amostra bacteriana foi aquecida em banho seco a 60°C por uma hora. Posteriormente foi lavada 3 vezes com PBS 1x por centrifugação de 5.000 rpm de 10 minutos. Após isso, ocorreu a ressuspensão de 250 µL da bactéria com PBS 1x. Por fim, ela foi homogenizada com 250 µL de Adjuvante de Freund (1:1) e inoculada nos camundongos na concentração de 0,1 mL, em seringa de insulina (1mL).

### **5.5.1 ELISA Indireto para detecção de anticorpos contra *Shigella flexneri* 5a M90T**

A análise quantitativa dos anticorpos contra a bactéria *Shigella flexneri* 5a M90T que estiveram presentes no soro dos camundongos infectados foi avaliada por meio do método imunoenzimático Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), especificamente o ELISA Indireto. O princípio básico dessa técnica consiste na imobilização do antígeno em

uma fase sólida. Após a adição da amostra, o outro reagente ligado a uma enzima reagirá com o complexo antígeno-anticorpo. Os imunocomplexos são revelados ao adicionar-se o substrato da enzima e um cromógeno formando um produto colorido. Os resultados do ELISA são expressos objetivamente pelas absorvâncias obtidas de espectrofotômetros, não dependendo de leituras subjetivas (PAIVA; LORENA; GOMES, 2008).

A primeira etapa dessa técnica, chamada de sensibilização, foi feita adsorvendo-se em uma placa de poliestireno com 96 poços de microtitulação (marca KARTELL) a bactéria *Shigella flexneri* 5a M90T inativada, seguido o protocolo *Heat-Killed* (adaptado de BARMAN *et al.*, 2013), concentrada a 4 µg e diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9.6. Após esse procedimento, a placa de ELISA foi deixada em *over-night* a 4°C por 16 horas, para permitir a ligação da bactéria na placa. No dia seguinte, a placa foi lavada seis vezes com PBS 1X + TWEEN 20 (0,05%) e foi realizada a etapa de bloqueio, onde foi adicionado aos poços o BSA (albumina sérica bovina), para preencher as áreas onde não houve a ligação da bactéria, evitando reações inespecíficas. Após o bloqueio, a placa foi incubada a 37°C por 2 horas na estufa. Após o término das 2 horas, foi realizada nova lavagem da placa e adicionado aos poços o anticorpo primário (soro anti-*Shigella*) diluído a 1: 100 em PBS1X/BSA 3%, e foram adicionados 50µL da diluição em cada um dos poços, deixando-se novamente na estufa a 37°C por 1 hora. Após o tempo de 1 hora, foi realizada novamente a lavagem para retirada dos anticorpos não ligados, e adicionado aos poços 50 µL do anticorpo secundário conjugado anti-mouse marcado com peroxidase, diluído a 1: 1.000, incubando-se na estufa por mais 1 hora a 37°C. Após o término do tempo, foi realizada a etapa de revelação, onde foram adicionados em cada poço 50µL do substrato para ocorrer a reação cromogênica contendo ácido cítrico 0.1M, fosfato de sódio 0.2M, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio) e TMB 1M (Tetrametilbenzidina). Após deixar reagir por 5 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2M (ácido sulfúrico). A leitura da densidade óptica foi realizada pela leitora de ELISA (*Thermo*®) a 450nm.

#### 5.5.2 ELISA Indireto para a dosagem do soro anti-*Shigella flexneri* 5a M90T

Para utilização do soro anti-*Shigella* como anticorpo primário no teste de ELISA Indireto, é de vital importância o conhecimento da sua concentração de diluição ideal a ser utilizada no teste. Para isso, foi feita uma diluição seriada deste soro em diferentes

concentrações, a saber: 1/100, 1/500, 1/1000 e 1/2000. A sensibilização da placa foi feita com a bactéria em *Shigella flexneri* 5a M90T 10<sup>8</sup>, e posteriormente foi adicionado o soro nas respectivas concentrações, seguindo o protocolo de ELISA descrito em 5.5.1.

## **5.6 Triagem dos Peptídeos**

### **5.6.1 ELISA Indireto para determinação dos peptídeos mais imunogênicos**

A seleção dos peptídeos sintéticos possivelmente mais imunogênicos foi realizada através da técnica de ELISA Indireto, seguindo o protocolo descrito em 5.5.1., porém com algumas modificações.

Neste caso, na sensibilização da placa os antígenos foram os doze peptídeos sintéticos, na solução de 50µL cada um, em duplicata (concentração de 4µg/mL). O anticorpo primário permaneceu sendo o soro anti-*Shigella*. Foi utilizado como controle negativo o soro dos camundongos inoculados apenas com solução salina.

Assim, por meio deste ELISA, os peptídeos sintéticos reconhecidos em maior quantidade pelos anticorpos anti-*Shigella* foram considerados mais imunogênicos, e por conta disso, foram selecionados para imunização nos camundongos, na próxima etapa. Além disso, foi delineado também dois grupos para a imunização nos camundongos: um grupo com todos esses peptídeos mais reativos juntos, denominado Pool +, e outro grupo com todos os outros peptídeos que foram menos reativos juntos, denominado Pool -.

## **5.7 Alinhamento múltiplo das sequências peptídicas com proteínas das espécies de *Shigella* spp.**

Com a seleção dos peptídeos mais reativos após a triagem, foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências de cada um desses peptídeos com as proteínas OmpC, OmpA e FimH presentes nas espécies de *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae*, para conhecimento das especificidades dos peptídeos. O programa utilizado foi o Clustal Ômega, que constitui-se em um programa de alinhamento de múltiplas sequências para alinhar três ou mais sequências de maneira computacionalmente eficiente e precisa (disponível no endereço <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

O tamanho das proteínas em aminoácidos (aa) de OmpC, OmpA e FimH das cepas de *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *S. dysenteriae*, bem como seus respectivos números de acesso que foram utilizados para fazer o alinhamento estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3** – Informações sobre o tamanho das proteínas em aminoácidos de OmpC, OmpA e FimH de *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. flexneri* e *S. dysenteriae* e seus respectivos números de acesso utilizados no programa Clustal Ômega.

Espécie	Tamanho da Proteína/Número de Acesso		
	Ompc	OmpA	FimH
<i>S. sonnei</i>	347aa/WP_052994219.1	346aa/WP_052978913.1	300aa/CSR34683.1
<i>S. boydii</i>	347aa/WP_049284043.1	346aa/WP_039065037.1	300aa/ACD10421.1
<i>S. flexneri</i>	373aa/NP_708110.1	348aa/EID61499.1	300aa/ABF06190.1
<i>S. dysenteriae</i>	375aa/YP_402530.1	350aa/YP_402596.1	300aa/AHA65045.1

## 5.8 Imunização com os Peptídeos Sintéticos

### 5.8.1 ELISA Indireto para avaliação da produção de anticorpos IgG anti-peptídeos

Os soros dos camundongos obtidos após todas as imunizações com os grupos de peptídeos da etapa anterior foram avaliados quanto a produção de anticorpos IgG anti-peptídeos através da técnica de ELISA Indireto, seguindo o protocolo como descrito em 5.5.1., porém com algumas modificações.

Na sensibilização da placa os antígenos foram os peptídeos sintéticos mais imunogênicos e o pool de peptídeos + e -, e como anticorpo primário foram os soros anti-peptídeos de cada grupo. Foi utilizado como controle negativo os soros dos camundongos imunizados apenas com Adjuvante de Freund.

### 5.8.2 ELISA Indireto para a dosagem dos soros anti-peptídeos

Para utilização dos soros anti-peptídeos como anticorpo primário no teste de ELISA Indireto, é de vital importância o conhecimento da sua concentração de diluição ideal a ser utilizada no teste. Para isso, foi feita uma diluição seriada dos soros em diferentes concentrações, a saber: 1/100, 1/200, 1/500, 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1600, 1/1800 e 1/2000. A sensibilização da placa foi feita com os peptídeos sintéticos

mais imunogênicos e o pool de peptídeos + e -, e posteriormente foi adicionado os soros nas respectivas concentrações, seguindo o protocolo de ELISA descrito em 5.5.1.

### **5.9 Avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos por Citometria de Fluxo**

A avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos foi testada contra 15 cepas de *Shigella* spp. (descritas na Tabela 1), por citometria de fluxo. Essa técnica foi utilizada para que se pudesse estabelecer a especificidade da ligação antígeno-anticorpo no soro dos camundongos imunizados com os peptídeos contra as proteínas nativas contidas nas várias cepas de *Shigella* spp.

Dessa forma, o procedimento que foi utilizado para marcação das cepas de bactérias para a análise por citometria de fluxo ocorreu da seguinte forma: as cepas utilizadas foram pré-inoculadas em meio líquido LB a 37 °C sob agitação no dia anterior, e mantidas para crescimento por 18 horas. No dia seguinte, foi reinoculada e mantida para crescimento sob as mesmas condições por no máximo 5 horas. Após o crescimento das bactérias, foi realizada a leitura em espectrofotômetro utilizando o filtro de 600nm para preparar uma suspensão de bactérias ajustando a concentração para  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida a suspensão de bactérias nessa concentração foi lavada duas vezes com PBS 1x (filtrado) e centrifugado a 14000 rpm por 10 min, posteriormente foi feita a marcação com Brometo de Etídio durante 30 minutos. Após o tempo da marcação das bactérias com Brometo de Etídio, foi realizada a lavagem duas vezes com PBS 1x (filtrado), e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. Os soros anti-peptídeos específicos foram previamente alicotados. Em seguida as bactérias que foram lavadas e centrifugadas em microtubos de 1,5 mL, foram colocadas em contato com 100 µL da solução de soros anti-peptídeos na diluição de (1:100) e incubadas em temperatura ambiente por 60 minutos. Após o tempo de incubação, os microtubos contendo as bactérias e os soros anti-peptídeos foram lavados 2 vezes com PBS 1x (filtrado), e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos. Na última lavagem foi descartado o sobrenadante, e o pellet com as bactérias foi mantido. Em seguida foi adicionado o anticorpo secundário conjugado anti-mouse IgG Alexa flúor 488 (Invitrogen, Oregon, USA), diluído em PBS 1x na concentração de 1:200 e incubado por 30 minutos no escuro. Posteriormente as bactérias foram lavadas 3 vezes com PBS 1x (filtrado), e centrifugado a 14000 rpm por 10 minutos, e ressuspensas em 200 µL de PBS 1x para leitura em citômetro de fluxo.

A avaliação da capacidade opsonizante dos anticorpos IgG anti-peptídeos foi avaliada pelas análises com o equipamento de citometria de fluxo FACS canto II (BD Biosciences), da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Leônidas e Maria Deane FIOCRUZ-Amazônia, utilizando os programas FACS Diva Software versão 6.1.2. Para obtenção dos dados brutos e a análise da porcentagem de eventos foi utilizado o programa Flow-Jo versão 5.6.7.

#### **5.10 Infecção desafio com *S. flexneri* 5a M90T e Estudo de Proteção**

Para avaliar a capacidade protetora dos peptídeos, os camundongos foram submetidos à infecção desafio com a cepa padrão de invasão *Shigella flexneri* 5a M90T pela via intraperitoneal, na concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, após o término do protocolo de imunização com os peptídeos sintéticos.

Após o desafio, os camundongos foram observados em 24h, 48h, 72h e 96h, durante os períodos da manhã (9h) e tarde (16h), levando em conta o número de sobreviventes e o peso de cada um dos camundongos, comparado com o peso inicial (antes de serem desafiados). Os soros dos camundongos pós-desafio foram utilizados para os testes de Citometria de Fluxo e Dosagem de Citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*).

#### **5.11 Avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos pós-desafio por Citometria de Fluxo**

A avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos pós-desafio foi testada contra 15 cepas de *Shigella* spp. (descritas na Tabela 1), por citometria de fluxo. Essa técnica foi utilizada conforme protocolo descrito em 5.8, porém com uma modificação no soro anti-peptídeos pós-desafio que foram previamente alicotados. A avaliação da capacidade opsonizante dos anticorpos IgG anti-peptídeos foi avaliada pelas análises com o equipamento de citometria de fluxo FACS canto II (BD Biosciences), da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Leônidas e Maria Deane FIOCRUZ-Amazônia, utilizando os programas FACS Diva Software versão 6.1.2.

## **5.12 Dosagem de Citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*), adaptado do protocolo da BD Biosciences CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit**

O padrão de secreção das citocinas IL-4, IL-6, IL-2, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17 A no soro dos camundongos pós-desafio foi avaliado. Para a dosagem dessas citocinas por CBA foi realizado primeiramente o preparo das amostras e dos reagentes, iniciando assim o experimento. As amostras foram separadas e descongeladas em banho-maria a 37° C, e centrifugadas por 14.000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e colocado em novos tubos, e tanto as amostras quanto os reagentes G (reagente de diluição) e F (tampão de lavagem) foram alicotados em fluxo laminar para não ocorrer nenhum tipo de contaminação. O padrão do kit foi reconstituído com 2,0 mL do reagente G durante 15 minutos, antes de ser iniciado o experimento com os outros reagentes do kit. Após abrir o padrão, foi adicionado 500 uL do mesmo reagente e homogeneizado lentamente e com movimentos circulares durante 5 minutos. Posteriormente adicionou-se mais 500 uL do mesmo reagente com movimentos suaves. Com uma pipeta, o padrão foi transferido para um novo tubo, e adicionou-se mais 500  $\mu$ L do mesmo reagente utilizado homogeneizando durante 15 minutos suavemente de tempo em tempo para ficar bem solubilizado, assim o padrão não foi vortetizado e nem agitado fortemente. Ao final adicionou-se 300 uL do reagente G em cada tubo da curva de diluição, exceto no tubo que já estava o padrão. No tubo do controle negativo também adicionou-se o reagente G. O preparo do pool de Beads foi realizado conforme o cálculo do quanto foi utilizado das Beads pelas amostras. Foi adicionado 315  $\mu$ L de cada beads no tubo dos reagentes de A1 até A7 conforme as especificações do kit. As beads foram bastante vortetizadas em todas as vezes que eram retiradas. Utilizou-se 25  $\mu$ L do pool de beads para cada tubo amostral, na curva de diluição dois e no controle negativo. O início da reação foi realizada adicionando 25  $\mu$ L do pool de beads em cada tubo que já estava identificado da curva de diluição dois, e também foi adicionado o mesmo quantitativo nos tubos das amostras e no tubo do controle negativo, sempre vortetizando as beads. Foi adicionado 25  $\mu$ L do padrão nos tubos da curva de diluição um e nos tubos da curva de diluição dois, sempre respeitando as respectivas diluições. Adicionou-se 25  $\mu$ L de amostra nos respectivos tubos, foi pipetado somente o sobrenadante dos tubos. No tubo do controle negativo adicionou-se 25  $\mu$ L do reagente G (reagente de diluição). Foi adicionado 25  $\mu$ L do reagente B (reagente de detecção PE) em cada tubo, tanto nos tubos da curva de diluição dois, quanto nas amostras e no controle

negativo. Todos os tubos foram vortetizados, e incubados durante três horas em temperatura ambiente, ao abrigo de luz. Após passado o tempo de incubação, adicionou-se 500 µL do reagente F (Tampão de Lavagem) em cada tubo. Os tubos foram centrifugados durante 5 minutos em 1500 rpm a 18°C. Foi pipetado o sobrenadante deixando aproximadamente 150 µL em cada tubo. Todos estes tubos foram vortetizados para assim serem levados a leitura no citômetro de fluxo FACS Canto II da plataforma da FIOCRUZ-Amazônia.

### 5.13 Análise Estatística

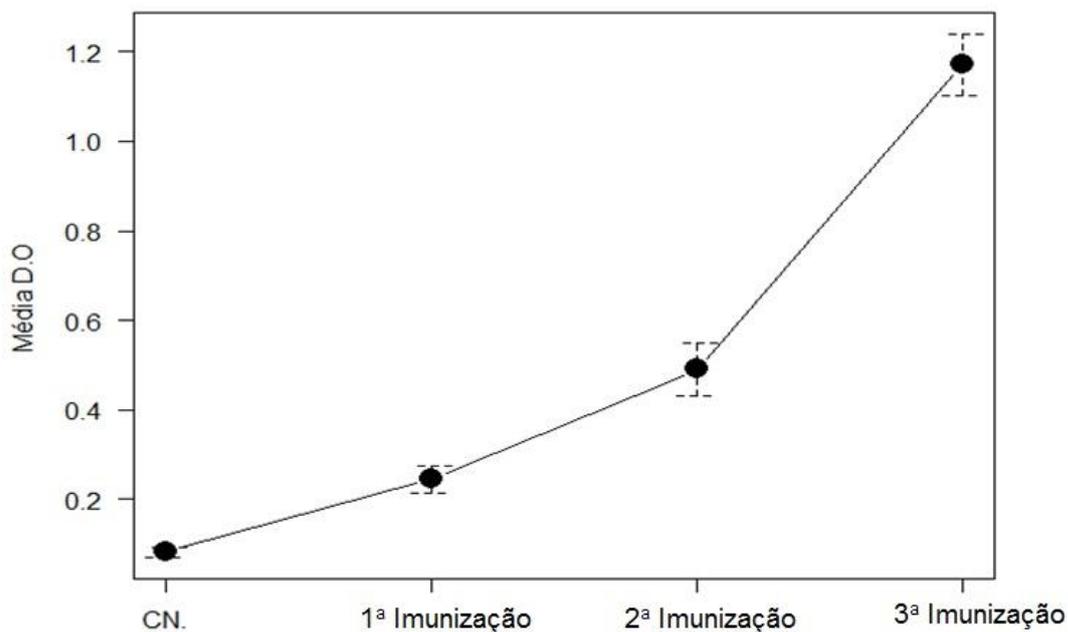
A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa “R” (R Development Core Team) e o software Graph Pad Prism 5.0. A diferença entre os grupos de testes foi analisada por métodos de análise descritiva de variáveis, como média, desvio padrão, coeficiente de variação e análise de variação (ANOVA). Os resultados paramétricos foram submetidos ao teste *Newman-Keuls Multiple Comparison Test* e os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste *Mann Whitney Test*. As diferenças estatísticas significativas foram indicadas por asteriscos: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*  $p < 0,0005$ .

## 6. RESULTADOS e DISCUSSÃO

### 6.1 ELISA Indireto da produção de anticorpos contra *Shigella flexneri* 5a M90T

Os anticorpos específicos contra *Shigella flexneri* 5a M90T foram produzidos no soro dos camundongos com sucesso. Pela avaliação dos resultados obtidos por meio de ELISA Indireto, pode-se inferir que houve um aumento da produção de anticorpos anti-*Shigella* de acordo com o avanço das imunizações nos camundongos, demonstrando assim uma resposta imune adequada.

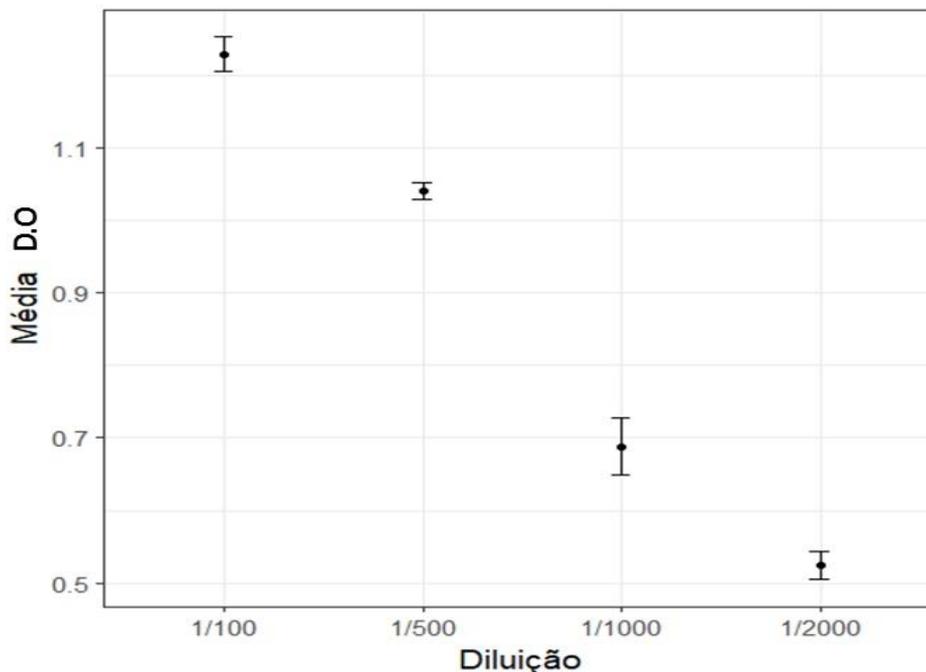
Vale ressaltar ainda que foi constituído um intervalo de confiança de 95% para a média de cada uma das três imunizações e do controle, e pelo fato desses intervalos não terem tido interseção, houve diferença estatística entre cada imunização e o controle ( $p < 0,000001$ ), mostrando assim que as médias de fato são diferentes. Desta forma, pôde-se observar que todos os camundongos imunizados com a bactéria inativada responderam satisfatoriamente (Figura 05).



**Figura 05 – ELISA Indireto da produção de anticorpos específicos IgG total contra *Shigella flexneri* 5a M90T.** C.N = Controle Negativo: soro dos camundongos inoculados apenas com solução salina. Realização de três imunizações com intervalos de 15 dias. O nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$ , com intervalo de confiança de 95%.

## 6.2 ELISA Indireto da dosagem do soro anti-*Shigella flexneri* 5a M90T

A melhor concentração de diluição do soro anti-*Shigella flexneri* 5a M90T encontrada por ELISA Indireto foi a de 1/100, pois foi a que atingiu um nível de D.O maior em comparação às outras concentrações (Figura 06). Assim, esta concentração ficou definida para ser utilizada no teste posterior, o ELISA da Triagem dos Peptídeos.



**Figura 06 – ELISA Indireto da dosagem do soro anti-*Shigella flexneri* 5a M90T.** O soro foi testado nas concentrações: 1/100, 1/500, 1/1000 e 1/2000.

Em relação aos anticorpos específicos contra *Shigella flexneri* 5a M90T produzidos neste trabalho, pode-se inferir que o método *Heat-Killed* utilizado para a imunização dos camundongos com esta bactéria inativada pelo calor foi eficiente, pois todos os camundongos responderam satisfatoriamente de acordo com o avanço das imunizações. Este resultado corrobora com um estudo feito anteriormente que utilizou o mesmo método para cepas de *Shigella* spp., onde também foi observada uma resposta imune às células mortas das bactérias, além de uma eficácia protetora dos anticorpos anti-*Shigella* spp. quando os animais foram desafiados com células virulentas vivas de cada um dos sorotipos de *Shigella* testados (BARMAN *et al.*, 2013). Optou-se pela escolha deste método *Heat-Killed* por conta da necessidade de obtenção de soro anti-*Shigella* para ser utilizado no ELISA da Triagem dos Peptídeos, na etapa posterior.

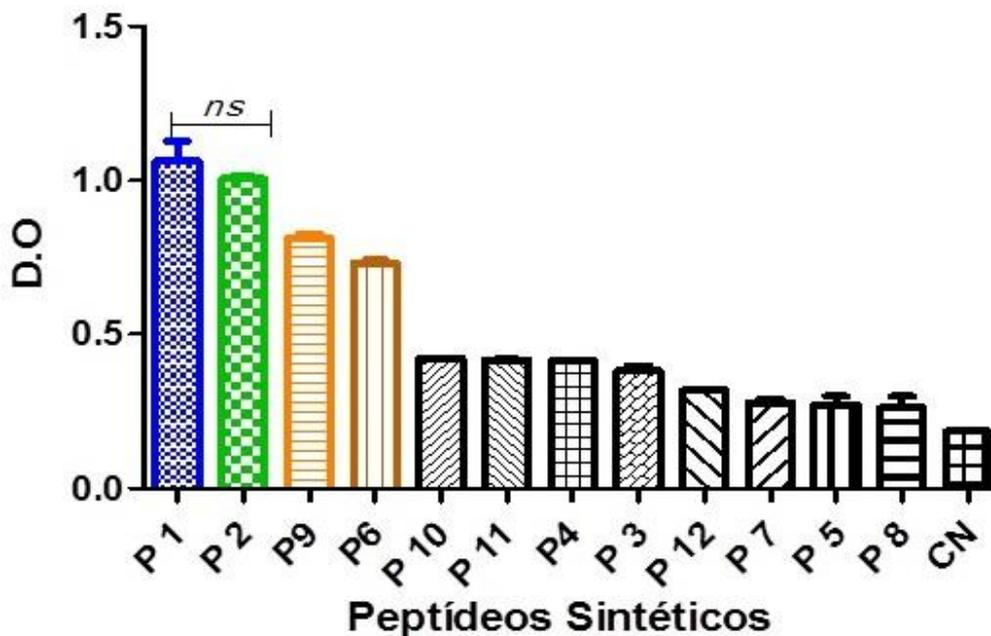
### 6.3 ELISA Indireto da determinação dos peptídeos mais imunogênicos

A imunogenicidade dos 12 peptídeos sintéticos foi devidamente testada através da técnica de ELISA Indireto. Os anticorpos anti-*Shigella flexneri* 5a M90T produzidos na etapa anterior no soro dos camundongos foram testados frente aos peptídeos sintéticos para uma triagem dos mesmos.

Assim, dentre os 12 peptídeos testados, os mais reativos foram: P1 (OmpC); P2 e P6 (OmpA); e P9 (FimH), conforme descritos na Tabela 02. Isto demonstra que esses peptídeos foram possivelmente imunogênicos, ou seja, foram capazes de serem reconhecidos por anticorpos anti-*Shigella* presente no antissoro dos camundongos. Vale destacar ainda que não houve diferença estatística significativa entre P1 e P2 ( $p > 0,7000$ ), demonstrando assim que desde a triagem o P2 já se destacou entre os demais, visto que o P1 foi utilizado como controle positivo para os peptídeos originados de OMPs por já ter sido sintetizado e testado em estudo anterior como um bom antígeno vacinal (JARZAB *et al.*, 2013). O P6 e o P9 também foram selecionados por terem sido capazes de serem reconhecidos pelos anticorpos presentes no antissoro anti-*Shigella* em maior quantidade que os demais (Figura 07).

A partir desta triagem, foi definido também o grupo Pool + com esses peptídeos mais reativos juntos (P1 + P2 + P6 + P9) e o grupo Pool – com os outros peptídeos que foram menos reativos juntos (P3 + P4 + P5 + P7 + P8 + P10 + P11 + P12). O grupo Pool + foi selecionado para testar se todos os peptídeos juntos poderiam ser mais imunogênicos e protetores do que individualmente. E o grupo Pool- também foi selecionado para testar se todos eles juntos poderiam ser imunogênicos e protetores, já que individualmente eles não mostraram capacidade imunogênica elevada.

Para confirmação da imunogenicidade desses grupos de peptídeos, novos grupos de camundongos foram imunizados com todos eles para produção de anticorpos anti-peptídeos.



**Figura 07 – ELISA da triagem dos peptídeos sintéticos.** C.N = Controle Negativo: soro dos camundongos imunizados apenas com solução salina. Reatividade maior presente nos peptídeos P1, P2, P9 e P6. O teste utilizado foi o teste T seguido do *Mann Whitney Test*, para análise de diferença entre P1 e P2, com intervalo de confiança de 95%. O nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$ .

Vale ressaltar que esta triagem foi realizada pelo fato dos peptídeos sintéticos, quando utilizados como candidatos vacinais, serem formulados para que estimulem uma resposta imunológica direcionada (RAUTA *et al.*, 2016).

#### **6.4 Alinhamento múltiplo das sequências peptídicas de P1, P2, P6 e P9 com proteínas das espécies de *Shigella* spp.**

Com a seleção dos peptídeos mais reativos após a triagem (P1, P2, P6 e P9), foi realizado o alinhamento múltiplo dessas sequências de peptídeos com as proteínas OmpC, OmpA e FimH de *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* e *S. dysenteriae*.

Como resultado, pôde-se observar que o peptídeo 1 é específico para *S. flexneri*, enquanto que os peptídeos 2, 6 e 9 correspondem às proteínas de todas as espécies do gênero *Shigella*, pois as sequências desses peptídeos foram encontradas em todas elas (Figuras 08, 09, 10 e 11).

ompC S. son	-----HTAEVYKDGKLDLYGKVTALRYFTDOKRDOGDKTYARLG	41
ompC S. boy	MKSKVLALLIPALLAAGAAHAAEVYKDGKLDLYGKVDGLHYFSDNSAKDGDQSYARLG	60
ompC S. dys	MKVYVLSLLVPALLVAGAANAEEVYKDGKLDLYGKVDGLHYFSDOKSVDGDQTYHRLG	60
P1	-----	0
ompC S. flex	MKVYVLSLLVPALLVAGAANAEEVYKDGKLDLYGKVDGLHYFSDOKSVDGDQTYHRLG	60
ompC S. son	FKGETQZNDQHGIFGHWIEYDFKGYNDEANGSRGNKTRLAYAGLKISEFGSLDYGRNYGVG	101
ompC S. boy	FKGETQZNDQLTGYGQWEYNIQANNTSS-KNQSHTRLAFAGLKFADYSSFDYGRNYGVN	119
ompC S. dys	FKGETQVTDQLTGYGQWEYQIQGNAPE-S-ENNSWTRVAFAGLKFQDZGSIDYGRNYGVV	118
P1	-----	0
ompC S. flex	FKGETQVTDQLTGYGQWEYQIQGNSAE-N-ENNSWTRVAFAGLKFQDVGSSFDYGRNYGVV	118
ompC S. son	YDIGSHTDMLPEFGGDTHSQKDVFHTRYRTTGLATYRNYDFGLIEGLNFAAQYQGNERT	161
ompC S. boy	YDIEGHTDMLPEFGGDSYTNADNFHTGRANGVIATYRNTDFGLVNLNFAVQYQGNINGA	179
ompC S. dys	YDVTSHTDVLPDFGGDTYG-SDNFVQQRGNFATYRNTDFGLVVDGLNFAVQYQGNISV	177
P1	-----	0
ompC S. flex	YDVTSHTDVLPDFGGDTYG-SDNFVQQRGNFATYRSTDFGLVVDGLNFAVQYQGNISV	177
ompC S. son	DNS-----HLYGADYTRANGDGFGISSTYVYD-GFGIGAVYTKSORTNAQERAA-	209
ompC S. boy	SN-----GQEGTINNGRDVHRHENGQHGSLSTYDLQMGFSAGAAYTSSORTNDQV----	228
ompC S. dys	SGENDPDTGHSITNNGKALRQNGDVGGSITDYDYE-GFGIGGAISSSKRTHDQV----	232
P1	-----LN	2
ompC S. flex	E-----GEGHTNNGREALRQNGDVGGSITDYDYE-GFGIGAAVSSSKRTDQNF LN	228
ompC S. son	--ANPLNAGKNAELWATGIKYDANNIYFAANYAETLNMTTYGGDY--ISNKAQSFVVA	265
ompC S. boy	--NHTAAGGKADAWTSGLKYDANNIYLATHYSETRNMTFFGDSYAVANKTQNFVVA	285
ompC S. dys	--NTGLIGTGORAETYTGGLKYDANNIYLAQYITQTYNATRVGSLG--WANKAQNFVVA	288
P1	RYDERYZG-----	10
ompC S. flex	RYDERYZGZGORAETYTGGLKYDANNIYLAQYITQTYNATRVGSLG--WANKAQNFVVA	286
ompC S. son	QYQDFGLRPSLAYLQSKGRDLGR-----YGDQDHIEYZDVGATYFFNKNHSTYVD	316
ompC S. boy	QYQDFGLRPAVSFLMSKGRDLHAAGGADNPAGVDDKDLVKYADIGATYFFNKNHSTYVD	345
ompC S. dys	QYQDFGLRPSLAYLQSKGNLGVING----RNYDDEDILKYVDVGATYFFNKNHSTYVD	344
P1	-----	10
ompC S. flex	QYQDFGLRPSLAYLQSKGNLGVING----RNYDDEDILKYVDVGATYFFNKNHSTYVD	342
ompC S. son	YKINLLIDE-SQFTRAVDIRTDNIVATGITYQF	347
ompC S. boy	YKINLLDEDSFYAANGISTDDIVALGLVYQF	377
ompC S. dys	YKINLLDD-IQFTRDAGINTDNIVALGLVYQF	375
P1	-----	10
ompC S. flex	YKINLLDD-IQFTRDAGINTDNIVALGLVYQF	373

Figura 08 - Alinhamento de P1 com as proteínas C de membrana externa (OmpC) de *S. sonnei*, *S. boydii*, *S. dysenteriae* e *S. flexneri*. feito através do Clustal Ómega. Marcadas em amarelo estão as sequências de aminoácidos de P1 que corresponde a OmpC de *S. flexneri*.

ompA <i>S. boy</i>	MKKTAIATAVALAGFATV <b>AQAAPKDNTHYT</b> GAKLGHISQYHDTGFINNNGPTHENQLGAGA	60
ompA <i>S. son</i>	MKKTAIATAVALAGFATV <b>AQAAPKDNTHYT</b> GAKLGHISQYHDTGFINNNGPTHENQLGAGA	60
ompA <i>S. dys</i>	MKKTAIATAVALAGFATV <b>AQAAPKDNTHYT</b> GAKLGHISQYHDTGFIDNNGPTHENQLGAGA	60
P2	----- <b>AQAAPKDNTHYT</b> -----	12
ompA <i>S. flex</i>	MKKTAIATAVALAGFATV <b>AQAAPKDNTHYT</b> GAKLGHISQYHDTGFIPNNGPTHENQLGAGA	60
	*****	
ompA <i>S. boy</i>	FGGYQVNPYVGFEMGYDNLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPI TDOLDIYTRLGG	120
ompA <i>S. son</i>	FGGYQVNPYVGFEMGYDNLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPI TDOLDIYTRLGG	120
ompA <i>S. dys</i>	FGGYQVNPYVGFEMGYDNLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPI TDOLDIYTRLGG	120
P2	-----	12
ompA <i>S. flex</i>	FGGYQVNPYVGFEMGYDNLGRMPYKGDNINGAYKAQGVQLTAKLGYPI TDOLDIYTRLGG	120
ompA <i>S. boy</i>	MVIRADTKSNVYG----KNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQNTNNGDAHTIGT	176
ompA <i>S. son</i>	MVIRADTKSNVYG----KNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQNTNNGDAHTIGT	176
ompA <i>S. dys</i>	MVIRADTKANVPGGASFKDHDGTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQNTNNGDAHTIGT	180
P2	-----	12
ompA <i>S. flex</i>	MVIRADTKANVPGGASFKDHDGTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQNTNNGDANTIGT	180
ompA <i>S. boy</i>	RPDNGHLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	236
ompA <i>S. son</i>	RPDNGHLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	236
ompA <i>S. dys</i>	RPDNGLLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	240
P2	-----	12
ompA <i>S. flex</i>	RPDNGLLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPA--PAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	238
ompA <i>S. boy</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	296
ompA <i>S. son</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	296
ompA <i>S. dys</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	300
P2	-----	12
ompA <i>S. flex</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	298
ompA <i>S. boy</i>	ARGHGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA	346
ompA <i>S. son</i>	ARGHGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA	346
ompA <i>S. dys</i>	ARGHGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA	350
P2	-----	12
ompA <i>S. flex</i>	ARGHGESNPVTGNTCDNVKRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVVTQPQA	348

**Figura 09** - Alinhamento de P2 com as proteínas A de membrana externa (OmpA) de *S. boydii*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. flexneri*. feito através do Clustal Ômega. Marcadas em laranja estão as seqüências de aminoácidos de P2 que corresponde a OmpA de *S. boydii*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. flexneri*.

ompA <i>S. boy</i>	MKXTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWYTGAKLGHISQYHDTGFINNGPTHENQLGAGA	60
ompA <i>S. son</i>	MKXTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWYTGAKLGHISQYHDTGFINNGPTHENQLGAGA	60
ompA <i>S. dys</i>	MKXTAIAIAITVALAGFATVAQAAPKDNWYTGAKLGHISQYHDTGFIDNNGPTHENQLGAGA	60
P6	.....	0
ompA <i>S. flex</i>	MKXTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWYTGAKLGHISQYHDTGFIPNNGPTHENQLGAGA	60
ompA <i>S. boy</i>	FGGYQVNPYVGFENGYDNLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYFITDOLDIYTRLGG	120
ompA <i>S. son</i>	FGGYQVNPYVGFENGYDNLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYFITDOLDIYTRLGG	120
ompA <i>S. dys</i>	FGGYQVNPYVGFENGYDNLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYFITDOLDIYTRLGG	120
P6	.....FITDOLDIYTR---	11
ompA <i>S. flex</i>	FGGYQVNPYVGFENGYDNLGRMPYKGDNINGAYKAQGVQLTAKLGYFITDOLDIYTRLGG	120
ompA <i>S. boy</i>	MWIRADTKSNVYG----KNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQHTNIGDAHTIGT	176
ompA <i>S. son</i>	MWIRADTKSNVYG----KNHDTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQHTNIGDAHTIGT	176
ompA <i>S. dys</i>	MWIRADTKANVPGGASFKDHDGTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQHTNIGDAHTIGT	180
P6	.....	11
ompA <i>S. flex</i>	MWIRADTKANVPGGASFKDHDGTGVSPVFAGGVEYAITPEIATRLEYQHTNIGDANTIGT	180
ompA <i>S. boy</i>	RPDNGHLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	236
ompA <i>S. son</i>	RPDNGHLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	236
ompA <i>S. dys</i>	RPDNGLLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPAPAPAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	240
P6	.....	11
ompA <i>S. flex</i>	RPDNGLLSLGVSYRFGQGEAAPVWAPA--PAPEVQTKHFTLKSVDLNFNFKATLKPEGQA	238
ompA <i>S. boy</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	296
ompA <i>S. son</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	296
ompA <i>S. dys</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	300
P6	.....	11
ompA <i>S. flex</i>	ALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIIGSDAYNQGLSERRAQSVVDYLISKGIPADKIS	298
ompA <i>S. boy</i>	ARGMGESNPVTGNTCONVKQRAALIDCLAPORRVEIEVKGIKDVVTQPQA	346
ompA <i>S. son</i>	ARGMGESNPVTGNTCONVKQRAALIDCLAPORRVEIEVKGIKDVVTQPQA	346
ompA <i>S. dys</i>	ARGMGESNPVTGNTCONVKQRAALIDCLAPORRVEIEVKGIKDVVTQPQA	350
P6	.....	11
ompA <i>S. flex</i>	ARGMGESNPVTGNTCONVKRRAALIDCLAPORRVEIEVKGIKDVVTQPQA	348

**Figura 10 – Alinhamento de P6 com as proteínas A de membrana externa (OmpA) de *S. boydii*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. flexneri*. feito através do Clustal Ômega. Marcadas em azul estão as seqüências de aminoácidos de P6 que corresponde a OmpA de *S. boydii*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. flexneri*.**

FimH <i>S. dys</i>	.....	0
FimH <i>S. son</i>	NKRVITLFAVLLNGHSVNAHSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLS	60
FimH <i>S. boy</i>	NKRVITLFAVLLNGHSVNAHSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLS	60
P9	.....	0
FimH <i>S. flex</i>	NKRAITLFAVLLNGHSVNAHSFACKTANGTAIPIGGGSANVYVNLAPAVNVGQNLVVDLS	60
FimH <i>S. dys</i>	--HF-----FSSLTLMR-PVSRALKGSYKQSLYNNVTYFFPLTTNTNVLIDIGDKT	48
FimH <i>S. son</i>	TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYFFPTTSETPRVYNSRT	120
FimH <i>S. boy</i>	TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYFFPTTSETPRVYNSRT	120
P9	.....	0
FimH <i>S. flex</i>	TQIFCHNDYPETITDYVTLQRGSAYGGVLSNFSGTVKYSGSSYFFPTTSETPRVYNSRT	120
FimH <i>S. dys</i>	PHPLPKLYITPVAAGGVVVKAGEVZIARIHMYKIATLGSQNPFTWNIISNNSVWPT	108
FimH <i>S. son</i>	DKPHVALYLTPVSSVGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNY-NSDOFQFVNIYANDVVPT	179
FimH <i>S. boy</i>	DKPHVALYLTPVSSVGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNY-NSDOFQFVNIYANDVVPT	179
P9	.....VSSAGGVA.....	8
FimH <i>S. flex</i>	DKPHVALYLTPVSSVGGVAIKAGSLIAVLILRQTNNY-NSDOFQFVNIYANDVVPT	179
	*.:.***.	
FimH <i>S. dys</i>	GGCTVDSRNVTVNLPDFPQSAEIPLGVYCSSEQKLSFYLSGATTDSARQVFANTAPDATK	168
FimH <i>S. son</i>	GGCDVSARDVTVLPDYPGSPVPIPLTVYCAKSQNLGYLLSGTTADAGNSIFNTAS-FSP	238
FimH <i>S. boy</i>	GGCDVSARDVTVLPDYPGSPVPIPLTVYCAKSQNLGYLLSGTTADAGNSIFNTIAS-FSP	238
P9	.....	8
FimH <i>S. flex</i>	GGCDVSARDVTVLPDYPGSPVPIPLTVYCAKSQNLGYLLSGTTADAGNSIFNTAS-FSP	238
FimH <i>S. dys</i>	ASQVGVSLHRNGKILATGENVSLGTVNKSKVPLGLSATYGGTGNKVSAGTVQSVIGVTFI	228
FimH <i>S. son</i>	AQQVGVQLTRNGTIIPANNVTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFV	298
FimH <i>S. boy</i>	AQQVGVQLTRNGTIIPANNVTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFV	298
P9	.....	8
FimH <i>S. flex</i>	AQQVGVQLTRNGTIIPANNVTVSLGAVGTSAVSLGLTANYARTGGQVTAGNVQSIIGVTFV	298
FimH <i>S. dys</i>	YE	230
FimH <i>S. son</i>	YQ	300
FimH <i>S. boy</i>	YQ	300
P9	--	8
FimH <i>S. flex</i>	YQ	300

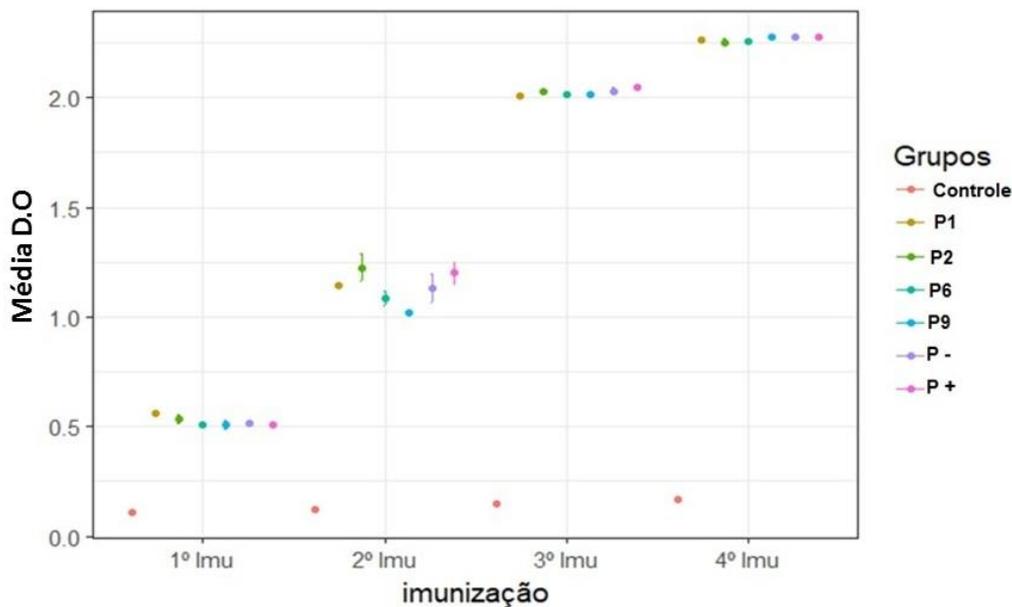
**Figura 11** – Alinhamento de P9 com as proteínas FimH de *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. boydii* e *S. flexneri*, feito através do Clustal Ômega. Marcadas em vermelho estão as sequências de aminoácidos de P9 que corresponde a FimH de *S. dysenteriae*, *S. sonnei*, *S. boydii* e *S. flexneri*.

Pelo fato de ter sido observado neste alinhamento que os peptídeos 2, 6 e 9 estão presentes nas proteínas de todas as espécies do gênero *Shigella*, pode-se inferir que esses peptídeos reconhecem esse gênero. O alinhamento do peptídeo 1 sendo específico para *S. flexneri* confirma o que foi demonstrado no trabalho onde esse peptídeo foi estudado (JARZAB *et al.*, 2013).

## 6.5 ELISA Indireto da produção de anticorpos IgG anti-peptídeos

Os camundongos que receberam P1, P2, P6, P9, Pool + e Pool - produziram níveis significativos de anti-P1, anti-P2, anti-P6, anti-P9, anti-Pool+ e anti-Pool-, respectivamente (Figura 12).

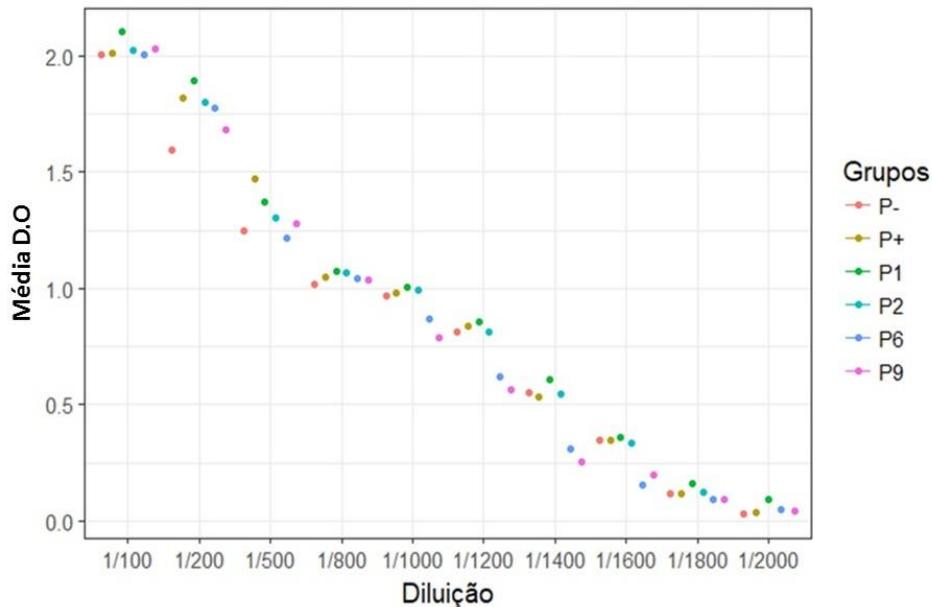
De acordo com estes resultados, os antissoros de todos os grupos da quarta imunização obtiveram melhor resultado de absorvância (D.O) – acima de 2.0, em relação às imunizações anteriores, demonstrando assim que a produção de anticorpos IgG anti-peptídeos pôde ser quantificada de forma considerável.



**Figura 12 – ELISA Indireto da produção de anticorpos IgG anti-peptídeos.** Controle: soro dos camundongos imunizados apenas com Adjuvante de Freund. Realização de quatro imunizações com intervalos de 15 dias.

### 6.6 ELISA Indireto da dosagem dos soros anti-peptídeos

A melhor concentração de diluição dos soros anti-peptídeos de cada grupo de peptídeo encontrada por ELISA Indireto foi a de 1/100, pois foi a que atingiu um nível de D.O maior em comparação às outras concentrações (Figura 13). Assim, esta concentração ficou definida para ser utilizada em teste de ELISA Indireto.



**Figura 13 – ELISA Indireto da dosagem dos soros anti-peptídeos.** Cada grupo de peptídeo foi testado nas concentrações: 1/100, 1/200, 1/500, 1/800, 1/1000, 1/1200, 1/1400, 1/1600, 1/1800 e 1/2000.

A partir destes resultados, pode-se inferir que os grupos de peptídeos P1, P2, P6, P9, Pool+ e Pool- são de fato imunogênicos, pelo fato de terem sido capazes de induzir nos camundongos anticorpos IgG anti-peptídeos em níveis relevantes (D.O acima de 2.0), que aumentaram exponencialmente durante o curso das imunizações, conforme observado no ELISA da produção desses anticorpos. Essa imunogenicidade foi possível devido esses peptídeos terem sido desenhados a partir de epítomos imunodominantes das proteínas OmpC, OmpA e FimH de *Shigella* spp. Um dos critérios para a escolha desses antígenos de proteínas foi devido estes serem expostos à superfície bacteriana e consequentemente mais suscetíveis ao reconhecimento por anticorpo ou célula B e receptores de células T (PORE *et al.*, 2011; JARZAB *et al.*, 2013).

A produção de anticorpos contra as OMPs (proteínas de membrana externa) é de vital importância porque elas contribuirão marcadamente para os mecanismos de patogenicidade da bactéria. Em relação à OmpC, alguns estudos já foram realizados para observação da expressão, osmorregulação e do papel de virulência das porinas OmpC de *S. flexneri* (BERNARDINI *et al.*, 1993; JARZAB *et al.*, 2013), indicando que a ausência dessa proteína na bactéria causa de fato uma redução na sua virulência (BERNARDINI *et al.*, 1993). OmpC pode estar envolvida também na reorganização do citoesqueleto do hospedeiro humano, que ocorre durante a formação das protrusões induzidas pela bactéria (BERNARDINI *et al.*, 1993), fato que contribui para a patogenicidade de *Shigella*.

A proteína OmpA das enterobactérias, de acordo com a literatura, é a OMP melhor caracterizada, pois ela é expressa em níveis elevados. Esta proteína contribui para a evasão de *Shigella* dos mecanismos de defesa do hospedeiro, além de poder funcionar como uma adesina (SMITH; MAHON; LAMBERT, 2007; CONFER; AYALEW, 2013). Foi observado também que OmpA atua como receptor para várias bacteriocinas, como a colicina U de *Shigella boydii* e a colicina L (FOULDS; CHAI, 1978).

Por conta da relação das OMPs com a virulência da bactéria, estudos anteriores descreveram as propriedades imunogênicas e até mesmo protetoras dessas proteínas isoladas das cepas de *Shigella* spp. quando utilizadas como antígeno vacinal (PORE *et al.*, 2011; JARZAB *et al.*, 2013; ADAMUS *et al.*, 1980; MULCZYK *et al.*, 1981), assim como foi feito neste trabalho. Isto porque ao imunizar tais proteínas em camundongos, foi visto que tanto a resposta humoral como a celular foram induzidas, além de provocar também uma resposta imunológica protetora contra uma dose letal da bactéria (PORE *et al.*, 2011; JARZAB *et al.*, 2013; WITKOWSKA; CZARNY; MULCZYK, 1986; WITKOWSKA; CZARNY; MULCZYK, 1992). Isso corrobora com o que ocorreu neste estudo, uma vez que o peptídeo 1 é proveniente de OmpC, e os peptídeos 2 e 6 são provenientes de OmpA, demonstrando assim uma vantagem para o uso das OMPs como antígenos vacinais contra *Shigella* em estudos utilizando o camundongo como modelo experimental. Vale ressaltar também que a análise imunoproteômica de *S. flexneri*, especificamente, tem confirmado que as OMPs podem ser boas candidatas a vacina (PORE *et al.*, 2011).

A produção de anticorpos observada no organismo dos camundongos contra o epítipo imunodominante de FimH de *Shigella* spp., induzida pelo peptídeo 9, também torna-se relevante dado o fato de que a FimH é uma adesina fimbrial, logo, atua como uma mediadora da adesão de *Shigella* nas membranas de mucosas do hospedeiro. Já foi observado que as fímbrias são predominantes entre as bactérias da família *Enterobacteriaceae* (BLOCH; STOCKER; ORNDORFF, 1992) e assim, os autores sugerem que tais bactérias utilizam essas fímbrias ou outras adesinas durante a aderência e colonização inicial do cólon (FAHERTY *et al.*, 2012). Assim, a FimH contribui essencialmente para o estabelecimento da infecção por *Shigella*, e os anticorpos que foram produzidos contra o epítipo desta proteína neste trabalho, podem então impedir a aderência de *Shigella* no organismo do hospedeiro. Isso mostra que a identificação de

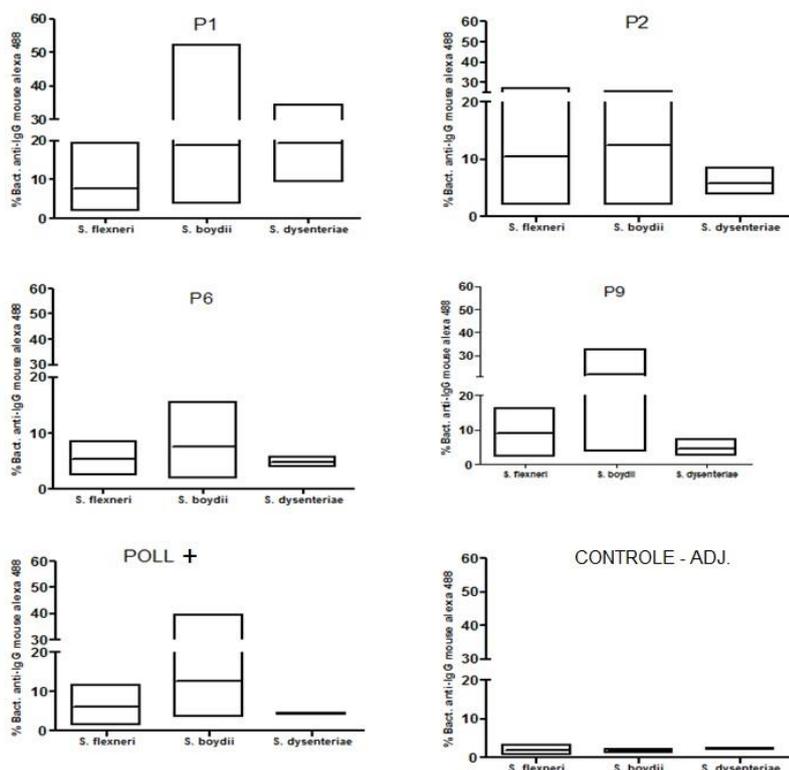
adesinas necessárias das espécies de *Shigella* para o epitélio do cólon antes da invasão pode servir como alvo para vacina em desenvolvimento (FAHERTY *et al.*, 2012).

A proteína FimH utilizada neste trabalho é uma das subunidades que compõe o *pili* tipo I (ou fímbria tipo I) na superfície das bactérias, e alguns trabalhos já foram realizados indicando a expressão de fímbrias tipo I em algumas cepas de *Shigella* spp. também (DUGUID; GILLIES, 1957; DUGUID; OLD, 1980; UTSUNOMIYA; NAKAMURA; HAMAMOTO, 2000; BRAVO *et al.*, 2015). Para investigar o papel dessas fímbrias na interação de *Shigella* com as células hospedeiras, pôde-se observar que a produção de fímbrias por uma cepa recombinante de *S. flexneri* aumentou a capacidade das bactérias em cerca de 50 vezes de poderem aderir e invadir as células epiteliais do hospedeiro (BRAVO *et al.*, 2015), demonstrando assim a capacidade superior de invasão conferida à *Shigella* pela expressão de fímbrias tipo I.

### **6.7 Reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos antes da infecção desafio por Citometria de Fluxo**

A resposta de anticorpos sistêmicos específicos anti-peptídeo P1, P2, P6, P9 e Pool+ foi avaliada contra as cepas de *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae* (descritas na Tabela 1). A Figura 14 mostra o nível de reconhecimento desses anticorpos IgG anti-mouse anti-peptídeos de cada grupo de peptídeo nas proteínas nativas das três cepas, com aproximadamente 40% de reconhecimento.

Vale ressaltar que apesar da espécie *S. boydii* ter sido a cepa mais reconhecida pelos grupos, não houve diferença estatística de reconhecimento entre todas as cepas pelos grupos de peptídeos ( $p > 0,05$ ).



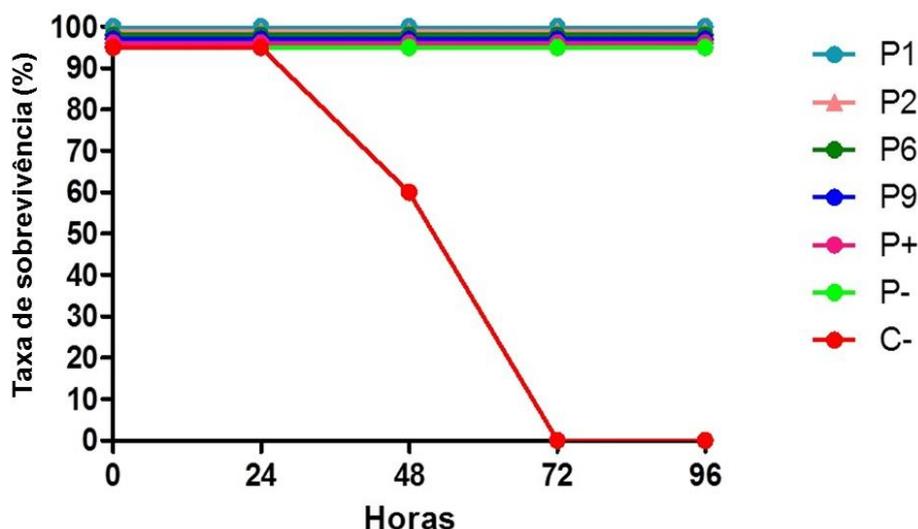
**Figura 14 – Nível de reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse dos antissoros P1, P2, P6, P9 e Pool + pelos epítomos correspondentes presentes nas cepas de *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae* através de citometria de fluxo. CONTROLE-ADJ.: soro dos camundongos imunizados apenas com Adjuvante de Freund. O teste utilizado foi o teste T seguido do *Mann Whitney Test*, com intervalo de confiança de 95%, para análise das possíveis diferenças de reconhecimento entre as cepas. O nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$ .**

Esta avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos de cada grupo de peptídeo contra as proteínas nativas das 15 cepas de *Shigella* corrobora com o que foi observado no resultado do teste de alinhamento múltiplo, confirmando assim mais uma vez que os peptídeos reativos não são específicos para uma única espécie de *Shigella*.

## 6.8 Taxa de sobrevivência dos camundongos após desafio com *S. flexneri* M90T

Para avaliar a capacidade protetora dos peptídeos, os camundongos foram submetidos à infecção desafio com a cepa padrão de invasão *Shigella flexneri* 5a M90T. Em relação ao número de sobreviventes do grupo Controle (C-), pode-se inferir que nas 48h, apenas 60% dos camundongos sobreviveram, sendo realizada a coleta de sangue destes através de corte caudal para testes posteriores. Nas 72h, todos os camundongos foram a óbito. Os principais sintomas apresentados por eles foram calafrios, alteração da pelagem (a qual ficou eriçada) e sangramento na região anal.

Já em relação ao número de sobreviventes dos grupos de camundongos imunizados com os peptídeos, todos sobreviveram até o final das 96h, demonstrando assim que todos os grupos de peptídeos demonstraram ser protetores (além de imunogênicos na primeira etapa) - Figura 15. Entretanto, houve particularidades específicas para cada grupo, que será observado na etapa posterior.



**Figura 15 – Taxa de sobrevivência dos camundongos após infecção-desafio com *S. flexneri* M90T. C- : Camundongos que tinham sido imunizados anteriormente apenas com Adjuvante de Freund (Controle). Os camundongos foram observados em 24h, 48h, 72h e 96h, levando em conta o número de sobreviventes.**

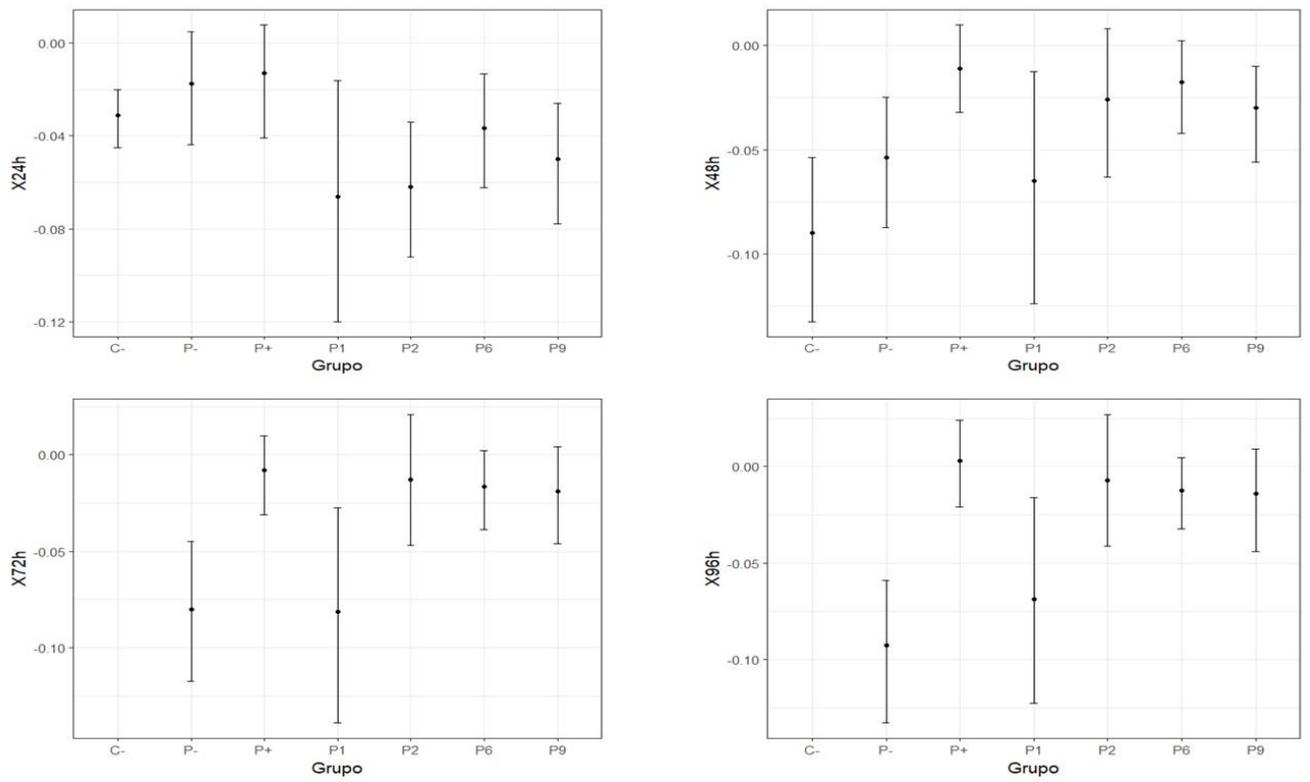
Essa infecção-desafio realizada com uma cepa virulenta de *S. flexneri* para avaliar a proteção do epítipo de OmpC (peptídeo 1), utilizado como controle positivo neste estudo, também foi realizada no estudo anterior onde esse peptídeo foi sintetizado. Tal estudo demonstrou que a imunização com este peptídeo nos animais anteriormente aumentou a proteção contra a bactéria, pois eles sobreviveram após o desafio com a bactéria viva (JARZAB *et al.*, 2013), assim como ocorreu neste trabalho.

Em relação aos estudos anteriores que abordam sobre os epítipos de OmpA de *Shigella*, de onde são originados os peptídeos 2 e 6, foi visto que tais epítipos também são capazes de evocar imunidade protetora em camundongos contra shigelose (PORE; CHAKRABARTI, 2013), assim como OmpC, corroborando assim com a sobrevivência observada nos camundongos de P2 e P6 neste trabalho. Vale ressaltar que a imunidade protetora causada por epítipos de OmpA envolve a participação das respostas imunes humoral e celular, visto que a OmpA estimula a indução rápida de IgG e IgA nos compartimentos sistêmico e mucoso, além de ativar também as células Th1 (PORE; CHAKRABARTI, 2013).

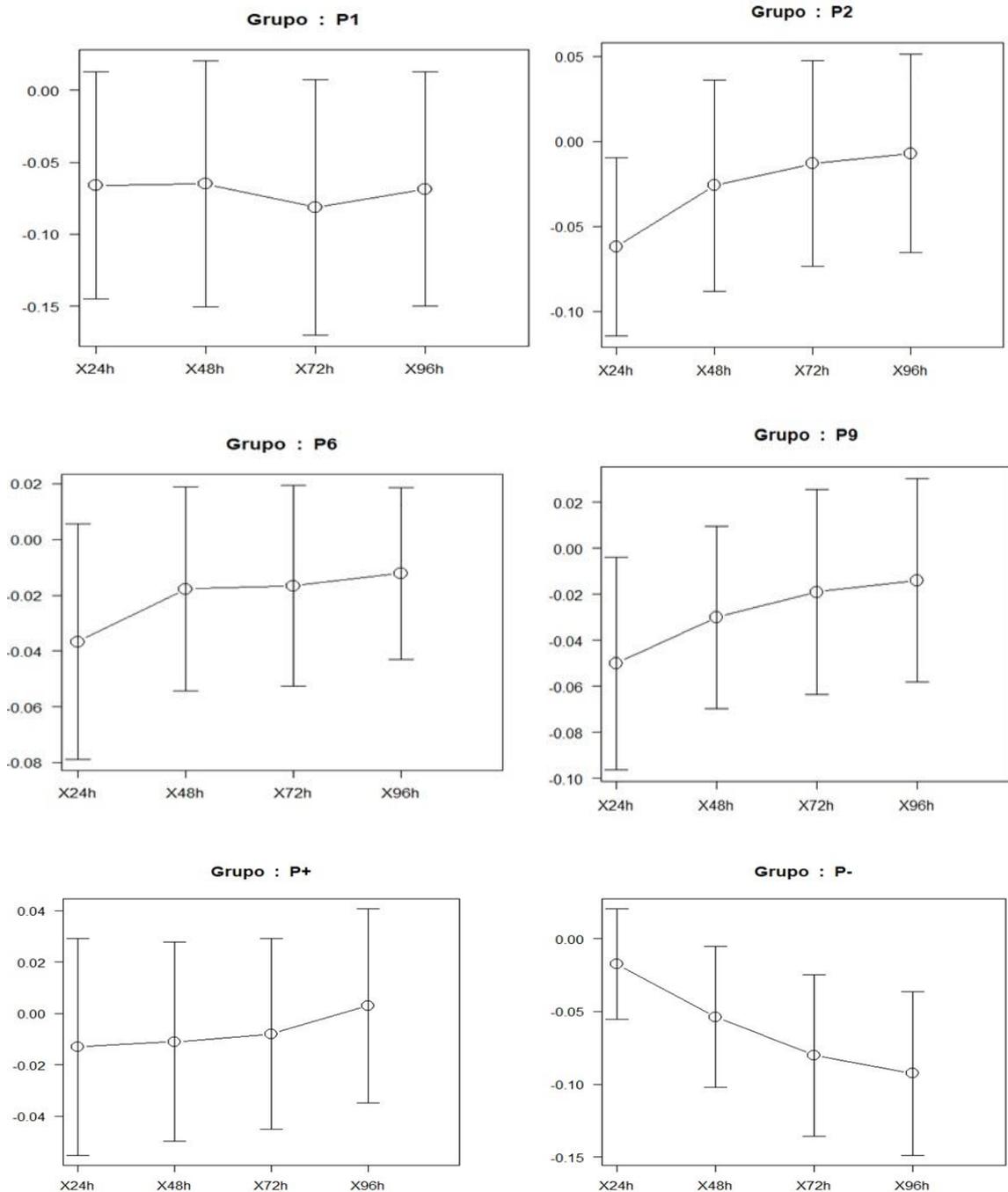
## **6.9 Mensuração do peso dos camundongos desafiados com *S. flexneri* M90T**

Os camundongos também foram monitorados em relação ao peso durante as 24h, 48h, 72h e 96h após o desafio com *S. flexneri* M90T. Para esta análise, a referência de peso foi o peso inicial de cada camundongo pertencente ao seu respectivo grupo de peptídeo (antes de serem desafiados – peso 0), onde os valores negativos indicam que os camundongos perderam de peso em relação ao peso inicial e os valores positivos indicam que os camundongos aumentaram de peso em relação ao peso inicial (Figuras 16, 17 e 18).

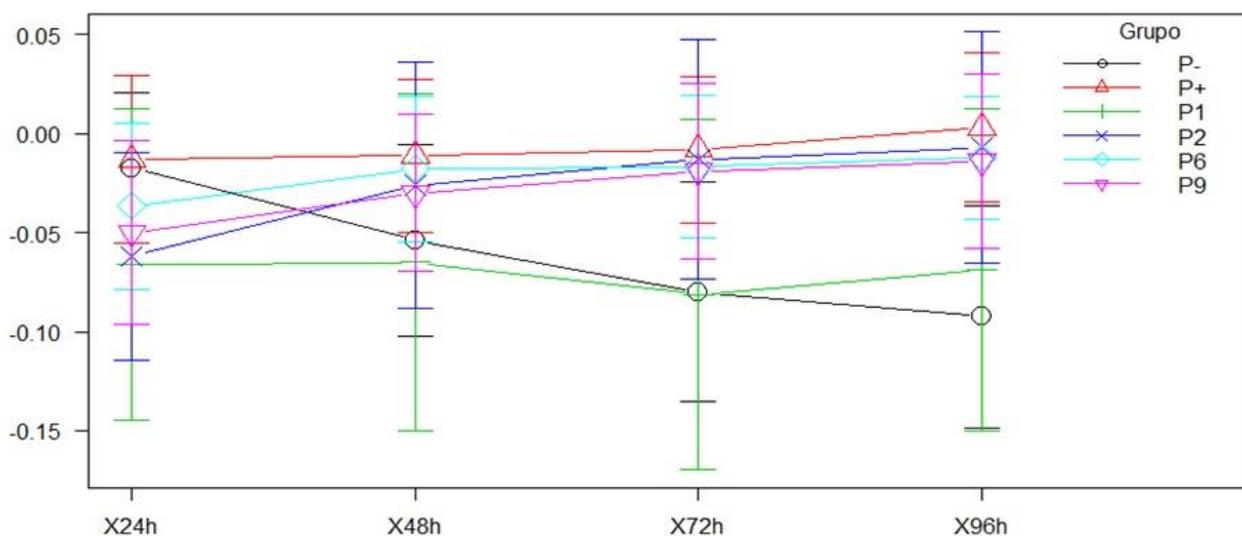
Pela análise dos gráficos, pôde-se observar que todos os camundongos perderam peso quando comparados ao peso 0 nas primeiras 24h, mas após esse período, alguns grupos conseguiram recuperar o peso, enquanto outros não. Os camundongos dos grupos Controle e Pool – foram os que mais perderam peso em relação aos seus pesos iniciais respectivos, não conseguindo a recuperação. Já os camundongos dos grupos P2, P6, P9 e Pool + conseguiram recuperar o peso, se aproximando novamente do peso 0. Os camundongos do grupo P1 também ficaram distantes do peso inicial conforme a observação das horas, sendo que um camundongo deste grupo apresentou infecção grave, com diarreia de coloração negra.



**Figura 16 – Mensuração do peso dos camundongos de cada grupo de peptídeo e do grupo controle (C-) após desafio com *S. flexneri* M90T em relação ao peso inicial. A monitoração do peso foi realizada após 24h, 48h, 72h e 96h do desafio. Intervalo de confiança de 95%.**



**Figura 17 – Mensuração do peso dos camundongos por grupo de peptídeo após desafio com *S. flexneri* M90T.** A referência foi o peso inicial de cada camundongo (peso 0). Os valores das médias amostrais de cada grupo próximos de 0 indicam recuperação do peso inicial e os valores abaixo de 0 indicam perda de peso em relação ao peso inicial. Intervalo de confiança de 95%.



**Figura 18 – Mensuração do peso dos camundongos de todos os grupos de peptídeos juntos após desafio com *S. flexneri* M90T em relação ao peso inicial (peso 0).** A monitoração do peso foi realizada após 24h, 48h, 72h e 96h do desafio. Intervalo de confiança de 95%.

Assim, apesar de todos os camundongos pertencentes aos seus respectivos grupos de peptídeos terem sobrevivido após o desafio, pôde-se observar que houve diferenças entre os grupos em relação ao peso, conforme observado nos gráficos.

O fato dos animais de todos os grupos terem perdido peso quando comparados ao peso inicial nas primeiras 24h corrobora com um estudo realizado em camundongos que foram imunizados com OmpA e depois desafiados com uma cepa virulenta, onde tais animais também perderam peso inicialmente após o desafio (cerca de 19%), mas depois começaram a recuperar e ganhar 60% do seu peso pré-desafiado, voltando ao normal no término da observação (PORE *et al.*, 2011). Acredita-se que os camundongos perderam peso inicialmente após o desafio por terem sentido o impacto da infecção por *S. flexneri* M90T, posto que esta bactéria é considerada uma cepa virulenta padrão de invasão. Logo, a capacidade protetora dos peptídeos foi observada não só pela sobrevivência dos camundongos após o desafio, mas também pela capacidade que cada um tivesse de recuperar o seu peso inicial ou se aproximar dele novamente.

Deste modo, pelos resultados da medição do peso dos camundongos de cada grupo de peptídeo, pôde-se começar a selecionar alguns peptídeos que foram mais protetores. O

peptídeo 1, apesar de ter sido considerado mais imunogênico desde a triagem dos peptídeos (com exceção do P2, com o qual não teve diferença estatística significativa –  $p > 0,7000$ ), ter induzido anticorpos anti-P1 em nível considerável, e ainda ter protegido os camundongos do desafio com *S. flexneri* M90T pelo fato deles terem sobrevivido, pôde-se observar que após a infecção desafio não houve recuperação dos pesos iniciais dos animais conforme a observação das horas. Além disso, o único camundongo dentre todos os grupos que apresentou diarreia de coloração negra claramente como uma infecção grave após o desafio foi imunizado antes com P1, demonstrando assim que possivelmente este peptídeo possa até ser utilizado como um bom antígeno para diagnóstico de *Shigella flexneri* (pois demonstrou ser imunogênico), mas como um antígeno vacinal, não conseguiu induzir uma proteção *in vivo* com a bactéria satisfatória.

Estas características de P1 se enquadram também para o grupo Pool-, uma vez que os camundongos pertencentes a esse grupo também não foram capazes de recuperar seus pesos iniciais e ainda perderam mais peso, conforme observado no gráfico deste Pool. Isso demonstra que possivelmente o Pool- também seja mais viável apenas para diagnóstico de *Shigella* spp., mas não como excelente protetor para vacina.

Como os camundongos dos grupos P2, P6, P9 e Pool+ conseguiram recuperar o peso, demonstra-se assim que possivelmente tais peptídeos sejam tanto imunogênicos como bons protetores, pois os anticorpos anti-peptídeos no organismo dos camundongos fez com que o sistema imunológico destes animais reagisse contra o impacto sentido pela infecção por *S. flexneri* M90T no tocante à perda de peso inicial.

#### **6.10 Reconhecimento dos anticorpos IgG anti-peptídeos pós-desafio por Citometria de Fluxo**

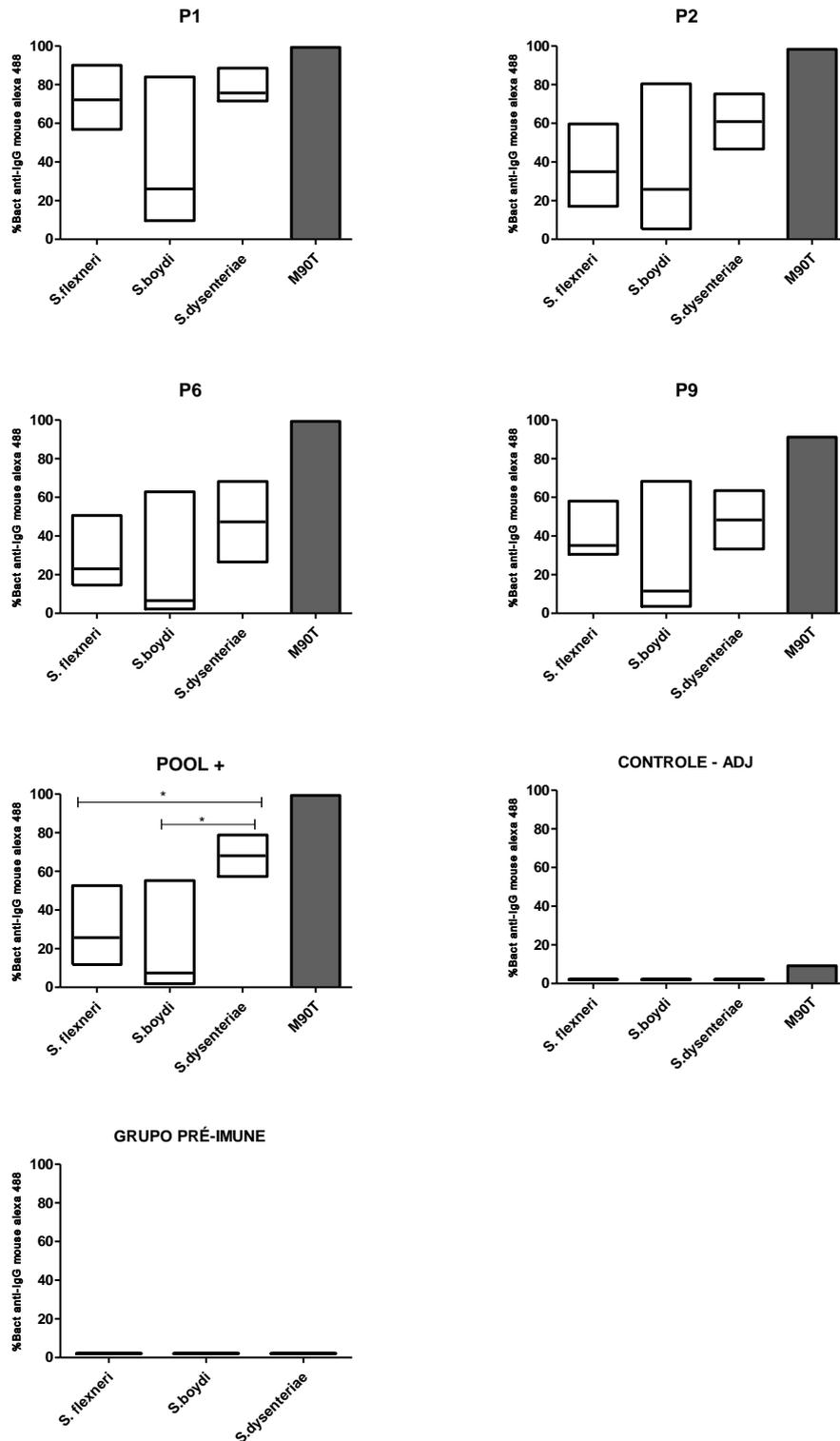
Os anticorpos anti-peptídeos presentes no soro dos camundongos pós-desafio reconheceram todas as proteínas presentes nas cepas de *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae* (Figura 20), assim como observado na Citometria antes do desafio.

Vale destacar que como todos os camundongos foram desafiados com *S. flexneri* M90T, o reconhecimento dos anticorpos contra as proteínas dessa bactéria foi utilizado como Controle Positivo para os grupos de peptídeos, com reconhecimento de mais de 90%. Este resultado demonstra que os grupos de peptídeos P1, P2, P6, P9 e Pool+ induziram de fato a proteção dos animais contra a infecção, simulando assim a idéia de

vacina proposta na hipótese deste trabalho. Tal fato é comprovado pela comparação com os camundongos do grupo controle, que por não terem sido imunizados anteriormente com nenhum peptídeo e assim entraram em contato com o antígeno pela primeira vez, o reconhecimento de anticorpos contra a proteína da bactéria foi bem menor comparado com aquele observado nos camundongos imunizados com os peptídeos.

Pôde-se observar ainda que a porcentagem de reconhecimento dos anticorpos anti-peptídeos contra as três cepas de *Shigella* spp. aumentou para aproximadamente 80%, quando comparada com a porcentagem de reconhecimento antes do desafio. Isso demonstra que houve a produção aumentada de anticorpos que reconhecem as bactérias, devido ao estímulo com *S. flexneri* M90T. Este resultado sugere que houve uma resposta imunológica mais rápida e com produção maior de anticorpos no organismo dos camundongos por terem entrado em contato com o antígeno novamente, simulando assim uma resposta imunitária secundária.

Também foi observado que o Grupo Pool + reconheceu mais as proteínas da espécie *S. dysenteriae*, pois houve diferença estatística significativa entre *S. dysenteriae* e *S. flexneri* ( $p < 0,05$ ), e entre *S. dysenteriae* e *S. boydii* ( $p < 0,05$ ). Entre os grupos P1, P2, P6 e P9 não houve diferença estatística de reconhecimento entre as três cepas ( $p > 0,05$ ). Este resultado demonstra novamente que de fato os peptídeos reconhecem o gênero *Shigella*.

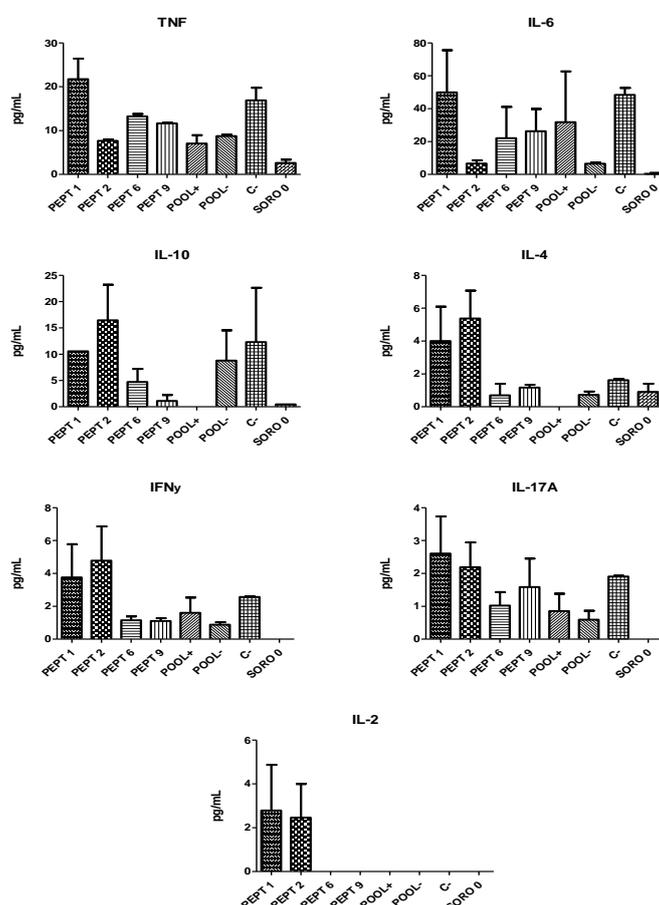


**Figura 19 – Nível de reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse dos antissoros P1, P2, P6, P9 e Pool + pelos epítomos correspondentes presentes nas cepas de *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae* através de citometria de fluxo após o desafio com *S. flexneri* M90T. CONTROLE-ADJ.: soro dos camundongos imunizados apenas com Adjuvante de Freund. GRUPO PRÉ-IMUNE: soro dos camundongos não imunizados. O teste utilizado foi o teste T seguido do *Mann Whitney Test*, com intervalo de confiança de 95%, para análise das diferenças de reconhecimento entre as cepas. O nível de significância considerado foi de  $P < 0,05$ .**

## 6.11 Dosagem de Citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*) com os soros dos camundongos pós-desafio

O padrão de secreção das citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17 A e IL-2 no soro dos camundongos pós-desafio de cada grupo de peptídeo foi avaliado com sucesso.

Pela análise dos gráficos, pode-se inferir que: o grupo do P1 apresentou níveis das citocinas IL-4, IL-6, TNF, IFN- $\gamma$  e IL-17 A mais altos que os do grupo controle, com apenas a citocina IL-10 com nível mais baixo que o do controle; o grupo P2 apresentou níveis de IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$  e IL-17 A mais altos que os do grupo controle, e níveis de IL-6 e TNF mais baixos que os do grupo controle; e os grupos P6, P9, Pool+ e Pool- apresentaram níveis de todas as citocinas testadas mais baixos quando comparados aos níveis do grupo controle. Os peptídeos 1 e 2 foram os únicos que expressaram IL-2 (Figura 21).



**Figura 20 – Dosagem das citocinas IL-4, IL-10, TNF, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-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. C-: Camundongos que tinham sido imunizados anteriormente apenas com Adjuvante de Freund (grupo controle). Soro O-: soro dos camundongos pré-imune.**

Em relação ao resultado desse teste, pode-se inferir que a verificação de citocinas pró e anti-inflamatórias é essencial para determinar se o sistema imune foi bem sucedido em fornecer proteção contra organismos patogênicos específicos (HENDERSON; POOLE; WILSON, 1998; KIDD, 2003), neste caso o desafio com *S. flexneri* M90T. Acredita-se que uma resposta imunológica eficaz seria o equilíbrio entre as citocinas, de forma que seja preservada uma resposta efetiva contra o patógeno e, ao mesmo tempo, não ocorra uma inflamação acentuada por parte do sistema imune do hospedeiro, posto que esta última é a causa dos sintomas disentéricos prejudiciais da shigelose, caracterizados por uma destruição maciça de tecidos infectados devido ao recrutamento de células inflamatórias, tais como os PMN (CHAMEKH *et al.*, 2008).

As citocinas possuem diversas propriedades que as caracterizam como mediadoras da duração e da intensidade da resposta imune, tais como: podem ser pleiotrópicas (agem em diferentes tipos celulares), ligam-se a receptores de membrana específicos de outras células, e ainda influenciam na síntese e ação de outras interleucinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; TIZARD, 2009).

Diferentes células são responsáveis pela síntese de citocinas, no entanto, os macrófagos ativados são os principais responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6 (IL-6), o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e o interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012), testados neste trabalho. Sabe-se que na patogênese de *Shigella*, as bactérias induzem a apoptose dos macrófagos, e como resposta, eles liberam as citocinas, que recrutam células do sistema imune e induzem a inflamação (SANSONETTI *et al.*, 2001; KUBOTA, 2006), justificando assim a ativação dos macrófagos no processo de infecção por *Shigella*.

Pelos resultados dos gráficos das citocinas, pôde-se observar a expressão de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$  em todos os grupos de camundongos imunizados com os peptídeos, bem como nos camundongos do grupo controle, indicando assim que a infecção por *Shigella* ativou as células do tipo Th1, o que resultou em uma resposta imune mediada por células. A expressão de IL-2 pelos peptídeos 1 e 2 também demonstra essa ativação de Th1. Assim, a resposta de Th1 observada neste trabalho torna-se significativa, uma vez que já foi demonstrado que ela desempenha um papel proeminente na imunidade protetora contra o desafio letal de *S. flexneri* (PORE *et al.*, 2011). As citocinas de Th1 estão relacionadas

principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra patógenos intracelulares (MALE *et al.*, 2006), como é o caso de *Shigella*.

Além disso, a detecção de IL-4 e IL-10, também encontrada em todos os grupos (com exceção do Pool +), indica que a infecção pela bactéria também ativou as células do tipo Th2, o que já resultou em uma resposta imune humoral, visto que **essas** citocinas produzidas pelas células Th2 ajudam a ativar células B, dando origem à produção de anticorpos (MALE *et al.*, 2006). A ativação de células Th17 também foi observada pela expressão de IL-17 A e IL-6 por todos os grupos. Para uma compreensão mais detalhada de como o sistema imunológico dos camundongos reagiu ao desafio com *S. flexneri* M90T, foram verificadas as funções de cada uma das citocinas testadas neste estudo no processo de infecção por *Shigella*.

O Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) é o primeiro mediador inflamatório a ser produzido em resposta às infecções, sendo considerado mediador primário do sistema imune inato e crucial para induzir proteção local (ULLOA; TRACEY, 2005). Devido à sua potente função, quantidades mínimas de TNF- $\alpha$  contribuem para a defesa do hospedeiro e, quando a produção é excessiva e prolongada, ele torna-se nocivo ao organismo (NETEA *et al.*, 2003), causando desregulação da resposta imune e induzindo a ativação de outras citocinas, bem como do sistema oxidativo celular, os quais promovem inflamação e lesão tecidual potencialmente letais (TRACEY, 2002; ULLOA; TRACEY, 2005). No caso da shigelose, essa lesão seria a desestabilização da integridade da parede intestinal, característica de uma resposta inflamatória massiva e aguda que gera a forte inflamação intestinal (SCHROEDER; HILBI, 2008). Assim, quantidades elevadas de TNF- $\alpha$  indicam amplificação e prolongação da inflamação.

Pela análise do gráfico de TNF, pode-se observar que o peptídeo 1 apresentou nível mais elevado do que todos os grupos de peptídeos com diferença estatística significativa ( $p < 0,0005$ ), bem como nível mais alto que o grupo controle também ( $p < 0,05$ ), indicando assim uma resposta inflamatória acentuada e prejudicial no organismo dos camundongos deste grupo. Este fato corrobora com o que foi observado visualmente em um camundongo que pertencia a P1, o qual apresentou diarreia grave. Acredita-se assim que houve o comprometimento da integridade do epitélio intestinal, dado que o TNF desempenha um papel central no desenvolvimento de lesões inflamatórias destrutivas durante a infecção

aguda de shigelose (D'HAUTEVILLE *et al.*, 2002) e níveis elevados deste fator já foram associados ao aumento da gravidade da inflamação na shigelose (D'HAUTEVILLE *et al.*, 2002; RAQIB *et al.*, 1995; CERSINI *et al.*, 2003). Conseqüentemente, este peptídeo não induziu uma capacidade protetora eficaz nos camundongos imunizados pela verificação de processo inflamatório acentuado.

Em contrapartida, pôde-se perceber que os camundongos dos peptídeos 2, 6, 9, P+ e P- apresentaram níveis mais baixos de TNF quando comparados ao nível do grupo controle, com diferença estatística significativa (P6 e P9 =  $p < 0,05$ ; P- =  $p < 0,005$ ; P2 e P+ =  $p < 0,0005$ ), indicando assim que as quantidades de TNF podem ter contribuído para a defesa dos animais sem se tornar deletério ao organismo dos mesmos. Em estudos realizados com infecção desafio de *S. flexneri* em camundongos, também foi observada uma elevação prolongada dos níveis de TNF nos camundongos do grupo controle em comparação com os camundongos imunizados com OmpA (PORE *et al.*, 2011; RAQIB *et al.*, 1995), corroborando assim os níveis menores encontrados de TNF nos peptídeos 2 e 6 deste trabalho comparados com o grupo controle.

A produção de interleucina 6 (IL-6) ocorre logo em seguida à do TNF, no início do processo inflamatório. Esta citocina pró-inflamatória é considerada importante marcador da resposta inflamatória sistêmica (CASEY, 2000), confirmando assim a sua expressão por todos os grupos de camundongos que foram desafiados pela via intraperitoneal. Nas infecções, IL-6 alcança rapidamente picos de concentração sérica, caracterizando-se como citocina de alerta da infecção (CASEY, 2000), além de induzir células Th17 (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009). Essa citocina também tem sido sugerida como um interruptor de citocina que bloqueia o desenvolvimento e a função de células T reguladoras (ZHOU; CHONG; LITTMAN, 2009), uma vez que já foi demonstrado que a produção de IL-6 por células dendríticas impede a resposta imune Th1, na tentativa de contrariar o potencial de dano tecidual inflamatório das respostas crônicas mediadas por esse tipo de célula. Assim, os locais de mucosa podem inclinar-se para as respostas imunitárias Th2, e essa regulação diminui a probabilidade de patologia inflamatória crônica (DODGE *et al.*, 2003). Por conta disso, as atividades de IL-6 são críticas para a resolução da imunidade inata, mas promovem a resposta imune adquirida (JONES, 2005). Sabe-se que níveis intestinais locais elevados e sustentados de IL-6, assim como de TNF, estão presentes

durante a shigelose aguda estabelecida (RAQIB *et al.*, 1995), e por causa disso, quantidades elevadas de IL-6 indicam amplificação da inflamação.

Pela análise do gráfico de IL-6, pode-se observar que o peptídeo 1 e o grupo controle apresentaram os níveis mais elevados do que todos os outros grupos de peptídeos, sem diferença estatística significativa entre eles (*ns*), indicando assim mais uma vez uma resposta inflamatória acentuada no organismo dos camundongos pertencentes a estes grupos, assim como no gráfico de TNF. Isso sugere que os animais tiveram uma shigelose grave estabelecida, sendo que tal fato era até esperado pelos camundongos do grupo controle (pois não tinham sido protegidos com nenhum peptídeo anteriormente), mas não pelos camundongos de P1, visto que este peptídeo demonstrou ser bastante imunogênico na primeira etapa. Assim, os resultados obtidos por CBA mostram mais uma vez que P1 não induz uma proteção de forma eficiente na análise *in vivo* com a bactéria.

As concentrações mais baixas de IL-6 foram observadas em P2 e Pool-, com diferença estatística significativa quando comparado com o grupo controle ( $p < 0,0005$ ). Este dado corrobora com o fato de que os camundongos que integravam esses grupos também tiveram baixas quantidades de TNF, ou seja, como acredita-se que não houve lesões inflamatórias destrutivas por TNF, não foi necessário IL-6 alcançar picos de concentração sérica para alertar uma infecção aguda, indicando assim possivelmente a capacidade protetora eficaz desses peptídeos em relação à essas citocinas pró-inflamatórias no sistema imune dos camundongos. Por outro lado, os peptídeos P6, P9 e Pool+ apresentaram níveis de IL-6 mais elevados que os de TNF, indicando assim que os animais destes grupos estavam com infecção acentuada de shigelose.

A interleucina 10 (IL-10), por sua vez, é considerada uma citocina anti-inflamatória que exerce papel contrário da IL-6 e TNF, pois age como inibidora da síntese de citocinas pró-inflamatórias, principalmente em respostas imunes que envolvem macrófagos (TIZARD, 2009), como é o caso da shigelose, desempenhando assim uma função importante na regulação da inflamação por *Shigella* spp. (CHAMEKH *et al.*, 2008).

Assim, elevadas concentrações de IL-10 reduzem a produção de TNF e IL-6 pelos monócitos (HOWARD; O'GARRA, 1992), fato este que corrobora com a expressão dessas citocinas nos grupos P2 e Pool-. Estas observações mostram claramente um equilíbrio entre a resposta pró e anti-inflamatória nos camundongos imunizados com esses peptídeos,

o que caracteriza uma resposta imunológica eficaz. Em estudo anterior utilizando modelo murino também, foi observado que as cepas de *Shigella* expressando IL-10 induziram uma menor mortalidade nos camundongos, que foi associada à redução da inflamação, assim como o nível de TNF foi reduzido após a infecção por *Shigella* secretora de IL-10 (CHAMEKH *et al.*, 2008), corroborando assim com o que ocorreu nos camundongos dos grupos P2 e Pool- neste trabalho.

Já a supressão ou pouca concentração de IL-10 resulta em aumento dos níveis séricos circulantes de TNF e IL-6, o que sugere de fato que esta citocina possua grande poder anti-inflamatório (CUNNEEN; CARTWRIGHT, 2004), fato este que corrobora com a expressão dessas citocinas nos grupos P6, P9 e Pool+. Isso indica que a resposta pró-inflamatória foi predominante nos camundongos desses grupos, não havendo uma restauração da homeostase, o que indica uma shigelose em fase aguda nos animais. Tal fato ocorreu o mesmo para os camundongos do grupo P1, pois a quantidade de IL-10 expressa por esse grupo ainda foi menor em comparação com as concentrações de TNF e IL-6, que predominaram.

A interleucina 4 (IL-4), assim como IL-10, também é considerada uma citocina anti-inflamatória com função reguladora (KHOURY; HANCOCK; WEINER, 1992), sendo que a necessidade de respostas imunes dominadas por IL-4 pode refletir a influência protetora das células Th2 durante a infecção por patógenos gastrointestinais (ELSE *et al.*, 1994), como é o caso da *Shigella*. Um estudo feito também com camundongos BALB/c e infecção-desafio com *S. flexneri* mostrou que a presença de IL-4 às 24 e 48h após o desafio com a bactéria pode ter inibido a produção adicional de TNF, reduzindo assim os efeitos prejudiciais da produção excessiva desta última citocina (MULLIGAN *et al.*, 1993), fato este que corrobora com a observação da expressão elevada de IL-4 e baixa de TNF pelo peptídeo 2. Vale ressaltar que o nível mais elevado de IL-4 por P2 teve diferença significativa com todos os grupos de peptídeos (com exceção do P1), inclusive com o grupo controle ( $p < 0,0005$ ), indicando assim que este peptídeo induziu de fato uma capacidade protetora eficaz nos camundongos, visto que as concentrações baixas de TNF e IL-6 (pró-inflamatórias), juntamente com as concentrações de IL-4 e IL-10 (anti-inflamatórias) demonstram que houve uma regulação do sistema imunológico dos animais frente à infecção da dose letal de *S. flexneri* M90T.

Como os grupos P6 e P9 mostraram níveis baixos de IL-4, e o Pool+ não a expressou, assim como ocorreu nos níveis de IL-10, isso confirma novamente que não houve uma regulação do sistema imune nos camundongos pertencentes a esses grupos, uma vez que os níveis de TNF e IL-6 foram maiores quando comparados às citocinas anti-inflamatórias. Tal fato ocorreu o mesmo para os camundongos do grupo P1, pois a quantidade de IL-4 expressa por esse grupo foi bem menor em comparação com as concentrações de TNF e IL-6, que predominaram. O grupo Pool- apresentou baixa quantidade IL-4, mas em compensação, apresentou uma concentração ideal da outra citocina anti-inflamatória, a IL-10, que regulou o sistema imune dos camundongos, visto que as quantidades de TNF e IL-6 neste grupo não foram mais elevadas.

A resposta efetiva e o controle da infecção microbiana parecem exigir diversos níveis de interação entre os sistemas imune inato e adaptativo e, para fins de vacinação, que é o objetivo deste trabalho, a indução de uma forte resposta de *células T CD4<sup>+</sup>* do sistema imune adaptativo torna-se essencial (IWASAKI; MEDZHITOV, 2004). A ativação dessas células leva à secreção de citocinas, tais como o IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-17 A, organizando assim a ligação entre as respostas imunes inatas e adaptativas (PORE; CHAKRABARTI, 2013; SELLGE *et al.*, 2010).

O Interferon-gama (INF- $\gamma$ ) é uma importante citocina produzida primariamente por células Th1, mas que também pode ter sua produção estimulada por células *natural killer* (NK), como ocorre na shigelose (SCHROEDER; HILBI, 2008). Por esse motivo, o INF- $\gamma$  possui funções tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Essa citocina, quando mediada por células NK, demonstrou ser essencial para a resistência dos camundongos após infecção primária por *Shigella* em estudo anterior (WAY *et al.*, 1998), visto que foi sugerido que além de promover respostas Th1, o IFN- $\gamma$  atua como uma molécula efetora impedindo a invasão de células eucarióticas por *Shigella* (PORE *et al.*, 2011; NIESEL *et al.*, 1986). Assim, essa citocina constitui-se como essencial na defesa do hospedeiro contra a infecção por patógenos, como a *Shigella*, induzindo uma variedade de respostas fisiologicamente significativas que contribuem para a imunidade (SHTRICHMAN; SAMUEL, 2001). Isso justifica a importância dos grupos de peptídeos testados neste trabalho em expressarem INF- $\gamma$ .

Pela análise do gráfico de INF- $\gamma$ , pôde-se observar que o peptídeo 2 apresentou o nível mais elevado, com diferença estatística significativa com os grupos P6, P9, Pool- ( $p < 0,005$ ) e Pool+ ( $p < 0,05$ ), indicando assim novamente a proteção eficaz induzida por esse peptídeo nos camundongos. Por os peptídeos 6, 9, Pool+ e Pool- terem apresentado concentrações baixas de INF- $\gamma$ , isso demonstra possivelmente que a defesa dos animais desses grupos contra a infecção por *Shigella* pode não ter sido tão eficiente, uma vez que o INF- $\gamma$  impede a invasão de células eucarióticas por *Shigella* (PORE *et al.*, 2011; NIESEL *et al.*, 1986). Quanto ao nível desta citocina expressa pelo peptídeo 1, pode-se inferir que ainda foi em menor concentração quando comparada às citocinas TNF e IL-6, justificando assim mais uma vez a shigelose aguda estabelecida nos camundongos deste grupo.

A interleucina 2 (IL-2), que foi expressa apenas pelos peptídeos 1 e 2 deste trabalho, por compor as citocinas das células Th1, está relacionada principalmente com a defesa mediada por fagocitose contra patógenos intracelulares (MALE *et al.*, 2006), como é o caso de *Shigella*, podendo causar a proliferação da maioria das linhagens de células T (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Em um estudo anterior feito com camundongos que foram imunizados com OmpA de *S. flexneri*, foi observado que na análise *in vivo* houve um aumento seletivo da liberação de IFN- $\gamma$  e IL-2 pelas células T CD4<sup>+</sup> (PORE; MAHATA; CHAKRABARTI, 2012), as quais demonstraram regular as respostas imunes celulares induzindo também a diferenciação de Th1 (MCGHEE, 2005; MOSMANN; COFFMAN, 1989), mostrando assim a relação que IL-2 faz entre as respostas imunes inatas e adaptativas. Assim, a expressão de IL-2 pelos peptídeos 1 e 2 demonstra que houve uma resposta de células Th1 no sistema imune dos camundongos, o que é válido, uma vez que essa citocina estimula linfócitos T citotóxicos e macrófagos a destruírem células infectadas por patógenos intracelulares, neste caso a *S. flexneri* M90T.

A interleucina 17A (IL-17A), expressa por todos os grupos neste estudo, compõe as células Th17, juntamente com IL-17F. Tais citocinas são produzidas durante as infecções, contribuindo para a depuração do patógeno (CURTIS; WAY, 2009; ISHIGAME *et al.*, 2009). Em um estudo anterior que também utilizou modelo murino para infecção com *S. flexneri*, foi relatado que a IL-17A é produzida por células Th17 específicas dessa bactéria, e os resultados sugeriram fortemente que tais células são mantidas em camundongos até 12 meses após a primeira infecção com a bactéria, fornecendo assim uma evidência da existência de um estado de memória Th17 de longo prazo no processo de infecção por

*Shigella*. Os resultados deste estudo mostraram ainda que a IL-17A não tem efeito sobre a depuração de *S. flexneri* na infecção primária, consistentemente com sua baixa produção durante a resposta inata – fato este que corrobora com o que foi observado neste trabalho, pois como o desafio com a bactéria só foi feito uma vez, pôde-se perceber que as concentrações detectadas de IL-17A para todos os grupos também foi baixa. Em contraste, os camundongos do estudo anterior foram desafiados novamente com a bactéria, e nesta reinfecção foi visto que a IL-17A restringiu significativamente o crescimento bacteriano (SELLGE *et al.*, 2010). Assim, acredita-se que se os camundongos deste trabalho fossem desafiados mais uma vez, poderiam ter esta mesma resposta, uma vez que a IL-17A desempenha um papel importante na mediação da imunidade protetora à *Shigella*.

Tendo em vista todos os resultados obtidos por esse trabalho, pode-se inferir que os peptídeos sintéticos podem ser considerados bons candidatos vacinais devido às suas diversas propriedades benéficas observadas, tais como: a estimulação de respostas imunológicas específicas, natureza não infecciosa, simplicidade de produção e efeitos colaterais minimizados (NAZ; DABIR, 2007; RAUTA *et al.*, 2016), fato que contribui para o controle da shigelose, que não possui vacina ainda.

Existe uma certa dificuldade de se produzir uma vacina com eficácia adequada para a *Shigella* devido os seus 50 sorotipos diferentes presentes nas quatro espécies principais (LIVIO *et al.*, 2014). Assim, alguns autores afirmam que a solução mais apropriada seria uma vacina abrangente ou multivalente, que conseguisse captar todas as espécies do gênero (KAMINSKI; OAKS, 2009; VENKATESAN; RANALLO, 2006; CAMACHO; IRACHE; GAMAZO, 2013). Levando em conta esse contexto, confirma-se novamente que os peptídeos sintéticos utilizados nesse trabalho originados de OmpA e FimH podem ser considerados bons candidatos vacinais devido à especificidade para o gênero verificada neles.

Além disso, sugere-se que a vacina seja cientificamente viável com uma imunidade protetora, ainda que de pouca duração, pois assim já haveria proteção de diversas crianças que podem ser acometidas pela bactéria. A solução para a pouca duração da imunidade seria o desenvolvimento de uma vacina de reforço a cada intervalo da diminuição da imunidade (KAMINSKI; OAKS, 2009; VENKATESAN; RANALLO, 2006; CAMACHO; IRACHE; GAMAZO, 2013).

Vale ressaltar que uma variedade de pesquisas sobre vacinas para *Shigella* já foram realizadas e outras ainda estão em desenvolvimento, sendo a maioria com foco em sorotipos específicos. Em estudos na fase pré-clínica foram avaliados antígenos proteicos que podem ser conservados, contribuindo assim para uma melhor proteção (WALKER, 2015). Os candidatos vacinais incluem principalmente: vacinas de antígenos, glicoconjugadas, antígenos inativados e também os antígenos de peptídeos e proteínas de membrana externa (utilizados neste trabalho). Todos eles podem ter o seu potencial avaliado através de estudos com o uso de modelos animais experimentais, para que assim, futuramente, os testes em humanos sejam iniciados e ocorra a avaliação da eficácia da vacina antes de sua implantação (BÉLOT *et al.*, 2005; BRAGA *et al.*, 2014; OAKS; TURBYFILL; KAMINSKI, 2010). Pôde-se observar então que uma das etapas para vacina contra *Shigella* com peptídeos sintéticos foi concluída com sucesso nesse estudo, uma vez que foi utilizado o camundongo como modelo experimental para avaliação da proteção dos peptídeos.

Assim, a principal hipótese do trabalho partiu do princípio de que: para os peptídeos serem considerados bons candidatos vacinais, eles deveriam primeiramente induzir no organismo dos camundongos anticorpos anti-peptídeos em níveis consideráveis (o que de fato ocorreu com todos os grupos), e na próxima etapa, correspondente à infecção desafio desses mesmos camundongos com uma dose letal da bactéria (no caso deste estudo a *S. flexneri* M90T, uma cepa padrão de invasão), os anticorpos anti-peptídeos induzidos por seus respectivos grupos de peptídeos anteriormente deveriam proteger os camundongos da infecção por *Shigella*, simulando assim a idéia de uma vacina – o que também ocorreu em todos os grupos de peptídeos. Apesar disso, pôde-se observar que apenas os peptídeos de antígenos OmpA e FimH demonstraram efeito protetor mais efetivo contra infecção por *Shigella flexneri* 5a M90T nos camundongos, o que os seleciona possivelmente como bons candidatos vacinais.

## **7. PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Estabelecer o modelo de imunização nos camundongos com os peptídeos sintéticos mais reativos (P2; P6; P9) pelas vias nasal e oral;
- Realizar a infecção desafio em camundongos com cepas virulentas de *Shigella flexneri* pelas vias intraperitoneal, nasal e oral, com observações em intervalos de 6 horas;
- Avaliar o perfil de secreção das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, nas três vias imunizadas nos camundongos;
- Analisar a capacidade opsonizante dos anticorpos anti-peptídeos através de ensaio de fagocitose;
- Realizar a imuno-histoquímica dos tecidos pulmonar, intestinal e do baço dos camundongos;
- Escolher o melhor peptídeo que protegeu os camundongos nas três vias imunizadas.

## CONCLUSÃO

- Os peptídeos de antígenos OmpA e FimH demonstraram efeito protetor mais efetivo contra infecção por *Shigella flexneri* 5a M90T nos camundongos, o que os indica possivelmente como bons candidatos vacinais;
- A produção de anticorpos específicos contra *S. flexneri* 5a M90T pôde ser obtida de maneira eficaz através da imunização com esta bactéria inativada, devido à observação de uma resposta imune significativa nos camundongos;
- Todos os grupos de peptídeos P1, P2, P6, P9, Pool+ e Pool- demonstraram ser imunogênicos ao serem inoculados nos camundongos, o que confirma eles serem epítomos imunodominantes das proteínas OmpC, OmpA e FimH de *Shigella* spp.;
- Houve reconhecimento dos anticorpos anti-peptídeos P1, P2, P6, P9 e Pool+ nas proteínas nativas presentes nas cepas de *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. dysenteriae* antes e após o desafio com a M90T, indicando assim que tais peptídeos não são específicos para uma única espécie de *Shigella*;
- Todos os camundongos pertencentes aos grupos de peptídeos selecionados sobreviveram após infecção desafio com a cepa padrão de invasão *S. flexneri* 5a M90T, porém os camundongos de P1 e Pool- não conseguiram a recuperação do peso inicial;
- O grupo P2 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 que possivelmente foi devido à proteção induzida por esse peptídeo;
- 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*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ADAMUS, G. *et al.* Protection against keratoconjunctivitis shigellosa induced by immunization with outer membrane proteins of *Shigella* spp. **Infection and immunity**, v. 30, n. 2, p. 321-324, 1980.

ANDERER, F. A. Preparation and properties of an artificial antigen immunologically related to tobacco mosaic virus. **Biochimica et biophysica acta**, v. 71, p. 246-248, 1963.

ANDERSON, M.; SANSONETTI, P. J.; MARTEYN, B. S. *Shigella* diversity and changing landscape: insights for the twenty-first century. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, 2016.

ASHKENAZI, S. *et al.* Growing antimicrobial resistance of *Shigella* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 427-429, 2003.

BARMAN, S. *et al.* Protective immunity by oral immunization with *heat-killed Shigella* strains in a guinea pig colitis model. **Microbiology and immunology**, v. 57, n. 11, p. 762-771, 2013.

BASTOS, F. C; LOUREIRO, E. C. B; HOFER , E. Frequency of *Shigella flexneri* serotypes isolated in the state of Pará, Brazil (1979-2009). **Revista de Patologia Tropical**, v. 41, n. 3, p. 277-284, 2012.

BASTOS, F.C.; LOUREIRO, E.C.B. Antimicrobial Resistance of *Shigella* spp. isolated in the State of Pará, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 607-610, 2011.

BELD, M.J.C.V.D.; REUBSAET, F.A.G. Differentiation between *Shigella*, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 6, p. 899-904, 2012.

BÉLOT, F. *et al.* Synthesis of two linear PADRE conjugates bearing a deca- or pentadecasaccharide B epitope as potential synthetic vaccines against *Shigella flexneri* serotype 2a infection. **Chemistry—A European Journal**, v. 11, n. 5, p. 1625-1635, 2005.

BERNARDINI, M. L. *et al.* OmpC is involved in invasion of epithelial cells by *Shigella flexneri*. **Infection and immunity**, v. 61, n. 9, p. 3625-3635, 1993.

BISWAS, T. Role of porin of *Shigella dysenteriae* type 1 in modulation of lipopolysaccharide mediated nitric oxide and interleukin-1 release by murine peritoneal macrophages. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 129-136, 2000.

- BLOCH, C. A.; STOCKER, B. A; ORNDORFF, P. E. A key role for type 1 pili in enterobacterial communicability. **Molecular microbiology**, v. 6, n. 6, p. 697-701, 1992.
- BOHN, N.R. **Investigação de genes do sistema de secreção do tipo III em cepas de *Escherichia coli* patogênicas aviárias**. Trabalho de Conclusão de Graduação. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Curso de Ciências Biológicas: Ênfase Molecular, Celular e Funcional: Bacharelado. 2011.
- BOPP, C. A. *et al.* *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. **Manual of clinical microbiology**, v. 8, p. 654-71, 2003.
- BOURDET- SICARD, R. *et al.* Binding of the *Shigella* protein IpaA to vinculin induces F- actin depolymerization. **The EMBO journal**, v. 18, n. 21, p. 5853-5862, 1999.
- BRAGA, C. J. M. *et al.* Parenteral adjuvant effects of an enterotoxigenic *Escherichia coli* natural heat-labile toxin variant. **Frontiers in immunology**, v. 4, p. 487, 2014.
- BRAVO, V. *et al.* Distinct mutations led to inactivation of type 1 fimbriae expression in *Shigella* spp. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121785, 2015.
- BUTCHER, E.C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. **Cell**, v. 67, n. 6, p. 1033-1036, 1991.
- CAMACHO, A. I.; IRACHE, J.M.; GAMAZO, C. Recent progress towards development of a *Shigella* vaccine. **Expert review of vaccines**, v. 12, n. 1, p. 43-55, 2013.
- CARAYOL, N.; VAN NHIEU, G.T. The inside story of *Shigella* invasion of intestinal epithelial cells. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 3, n. 10, p. a016717, 2013.
- CASEY, L. C. Immunologic Response to Infection and its Role in Septic Shock. **Critical Care Clinics**, v. 16, n. 2, p. 193-213, 2000.
- CERSINI, A. *et al.* Analysis of virulence and inflammatory potential of *Shigella flexneri* purine biosynthesis mutants. **Infection and immunity**, v. 71, n. 12, p. 7002-7013, 2003.
- CHAI, T.J.; FOULDS, J. Purification of protein A, an outer membrane component missing in *Escherichia coli* K-12 ompA mutants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure**, v. 493, n. 1, p. 210-215, 1977.
- CHAKRABORTY, S. *et al.* A computational approach for identification of epitopes in dengue virus envelope protein: a step towards designing a universal dengue vaccine targeting endemic regions. **In silico biology**, v. 10, n. 5, 6, p. 235-246, 2010.
- CHAMEKH, M. *et al.* Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra in vivo by the *Shigella* type III secretion apparatus. **The Journal of immunology**, v. 180, n. 6, p. 4292-4298, 2008.

- CHEN, Y. *et al.* A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. **The EMBO journal**, v. 15, n. 15, p. 3853, 1996.
- CONFER, A. W.; AYALEW, S. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. **Veterinary microbiology**, v. 163, n. 3-4, p. 207-222, 2013.
- COSTER, T. S. *et al.* Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. **Infection and immunity**, v. 67, n. 7, p. 3437-3443, 1999.
- CRUZ, C. B. N. *et al.* Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.
- CUNNEEN, J.; CARTWRIGHT, M. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. **AACN Clinical Issues**, v. 15, n. 1, p. 18-44, 2004.
- CURTIS, J. E. *et al.* The human primary immune response to keyhole limpet haemocyanin: interrelationships of delayed hypersensitivity, antibody response and in vitro blast transformation. **Clinical and Experimental immunology**, v. 6, n. 4, p. 473, 1970.
- CURTIS, M. M.; WAY, S. S. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. **Immunology**, v. 126, n. 2, p. 177-185, 2009.
- DCDIA. Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia - Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia. 2017.
- D'HAUTEVILLE, H. *et al.* Two *msbB* genes encoding maximal acylation of lipid A are required for invasive *Shigella flexneri* to mediate inflammatory rupture and destruction of the intestinal epithelium. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 10, p. 5240-5251, 2002.
- DODGE, I. L. *et al.* IL-6 production by pulmonary dendritic cells impedes Th1 immune responses. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 9, p. 4457-4464, 2003.
- DUGUID, J.P.; GILLIES, R.R. Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli. **The Journal of Pathology**, v. 74, n. 2, p. 397-411, 1957.
- DUGUID, J.P.; OLD, D.C. Adhesive properties of *Enterobacteriaceae*. In: **Bacterial adherence**. V.6, p. 185-217. Springer, Dordrecht, 1980.
- ELSE, K. J. *et al.* Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 1, p. 347-351, 1994.
- FAHERTY, C. S. *et al.* *Shigella flexneri* effectors OspE1 and OspE2 mediate induced adherence to the colonic epithelium following bile salts exposure. **Molecular microbiology**, v. 85, n. 1, p. 107-121, 2012.

- FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. S.; GONZAGA, H. T. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology letters**, v. 172, p. 89-93, 2016.
- FINDLAY, H. E.; MCCLAFFERTY, H.; ASHLEY, R. H. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein. **BMC microbiology**, v. 5, n. 1, p. 5, 2005.
- FORMAL, S. B. *et al.* Oral vaccination of monkeys with an invasive *Escherichia coli* K-12 hybrid expressing *Shigella flexneri* 2a somatic antigen. **Infection and immunity**, v. 46, n. 2, p. 465-469, 1984.
- FOULDS, J.; CHAI, T. J. Defeat of colicin tolerance in *Escherichia coli* ompA mutants: evidence for interaction between colicin L-JF246 and the cytoplasmic membrane. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 1, p. 158-164, 1978.
- FUJITA, Y.; TAGUCHI, H. Current status of multiple antigen-presenting peptide vaccine systems: Application of organic and inorganic nanoparticles. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 48, 2011.
- GERMANI, Y.; SANSONETTI, P.J. The genus *Shigella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH and Stackebrandt E (eds). **The Prokaryotes: A handbook of the biology of bacteria**. New York: Springer Science + Business Media Inc. p. 99-116. 2006.
- GOMARA, M. J.; HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. **Currente Medicinal Chemistry**, n. 14, v. 5, p. 531-546, 2007.
- HAHN, E. *et al.* Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. **Journal of molecular biology**, v. 323, n. 5, p. 845-857, 2002.
- HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. **Micron**, v. 30, n. 6, p. 597-623, abr. 1999.
- HENDERSON, B.; POOLE, S.; WILSON, M. Bacteria–cytokine interactions in health and disease, **Portland Press**, London, United Kingdom, 1998.
- HODGES, K.; GILL, R. Infectious diarrhea: cellular and molecular mechanisms. **Gut Microbes**, v. 1, p. 4-21, 2010.
- HOLT, K.E. *et al.* *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. **Nature Genetics**, v. 44, p. 1056- 1061, 2012.
- HOWARD, M.; O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. **Immunology Today**, v.13, n. 6, p. 198-200, 1992.

HULLAND, K.R.S. *et al.* Designing a handwashing station for infrastructure-restricted communities in Bangladesh using the integrated behavioural model for water, sanitation and hygiene interventions (IBM-WASH). **BMC Public Health**, v. 13, n. 1, p. 877, 2013.

ISHIGAME, H. *et al.* Differential roles of interleukin-17A and-17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses. **Immunity**, v. 30, n. 1, p. 108-119, 2009.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nature immunology**, v. 5, n. 10, p. 987, 2004.

IYER, R.; DELCOUR, A. H. Complex inhibition of OmpF and OmpC bacterial porins by polyamines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 30, p. 18595-18601, 1997.

JARZĄB, A. *et al.* *Shigella flexneri* 3a outer membrane protein C epitope is recognized by human umbilical cord sera and associated with protective activity. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. e70539, 2013.

JENNISON, A. V.; VERMA, N. K. *Shigella flexneri* infection: pathogenesis and vaccine development. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 28, p. 43–58, 2004.

JOH, R.I. *et al.* Dynamics of shigellosis epidemics: estimating individual level transmission and reporting rates from national epidemiologic data sets. **American journal of epidemiology**, v. 178, p. 1319-1326, 2013.

JONES, C. H. *et al.* FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 6, p. 2081-2085, 1995.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3463-3468, 2005.

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E.; GUILHERME, L. Novas Estratégias de Vacinas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, 2008.

KAMINSKI, R.W.; OAKS, E.V. Inactivated and subunit vaccines to prevent shigellosis. **Expert review of vaccines**, v. 8, n. 12, p. 1693-1704, 2009.

KARAM, M.R.A.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Use of flagellin and cholera toxin as adjuvants in intranasal vaccination of mice to enhance protective immune responses against uropathogenic *Escherichia coli* antigens. **Biologicals**, v. 44, n. 5, p. 378-386, 2016.

KHAN, S. *et al.* Isolation of *Shigella* species and their resistance patterns to a panel of fifteen antibiotics in mid and far western region of Nepal. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4, p.30-34, 2014.

KHOURY, S. J.; HANCOCK, W. W.; WEINER, H. L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are

associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. **Journal of Experimental Medicine**, v. 176, n. 5, p. 1355-1364, 1992.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative medicine review**, v. 8, n. 3, p. 223-246, 2003.

KIM, H.J. *et al.* Epidemiological characteristics of imported shigellosis in Korea, 2010-2011. **Osong Public Health and Research Perspectives**, v. 4, n. 3, p. 159-165, 2013.

KOEBNIK, R.; LOCHER, K. P.; VAN GELDER, P. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. **Molecular microbiology**, v. 37, n. 2, p. 239-253, 2000.

KOTLOFF, K. L. *et al.* Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, n. 8, p. 651-666, 1999.

KRISHNAN, S.; PRASADARAO, N. V. Outer membrane protein A and OprF – Versatile roles in Gram-negative bacterial infections. **The FEBS Journal**, v. 279, n. 6, p. 919-931, 2012.

KUBOTA, K. A novel functional T cell hybridoma recognizes macrophage cell death induced by bacteria: a possible role for innate lymphocytes in bacterial infection. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 12, p. 7576-7588, 2006.

LATEEF, S. S. *et al.* An improved protocol for coupling synthetic peptides to carrier proteins for antibody production using DMF to solubilize peptides. **Journal of biomolecular techniques: JBT**, v. 18, n. 3, p. 173, 2007.

LEVINE, M. M. *et al.* Clinical trials of *Shigella* vaccines: two steps forward and one step back on a long, hard Road. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 540-553, 2007.

LIMA, I. F. N.; HAVT, A.; LIMA, A. A. M. Update on molecular epidemiology of *Shigella* infection. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 30-37, 2015.

LIN, F. C.; YANG, T. L.; WU, P. F. Experimental keratoconjunctivitis shigellosis in guinea pigs. ii. histologic findings. **Chinese medical journal**, v. 83, p. 463-469, 1964.

LIN, J.; HUANG, S.; ZHANG, Q. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. **Microbes and infection**, v. 4, n. 3, p. 325-331, 2002.

LIVIO, S.; STROCKBINE, N. A.; PANCHALINGAM, S. *Shigella* Isolates From the Global Enteric Multicenter Study Inform Vaccine Development. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 7, p. 933-941, 2014.

- LYU, Z. X. *et al.* Direct observation of the uptake of outer membrane proteins by the periplasmic chaperone Skp. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46068, 2012.
- MACDOWELL, E.C.; LORD, E. M. The relative viability of male and female mouse embryos. **Developmental Dynamics**, v. 37, n. 1, p. 127-140, 1926.
- MALE, D. *et al.* **Immunology**. 7. ed. Canadá: Elsevier, 2006.
- MANI, S.; WIERZBA, T.; WALKER, R. I. Status of vaccine research and development for *Shigella*. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2887-2894, 2016.
- MARTEYN, B.; GAZI, A.; SANSONETTI, P.J. *Shigella*: a model of virulence regulation in vivo. **Gut microbes**, v. 3, n. 2, p. 104-120, 2015.
- MCGHEE, J. R. The world of TH1/TH2 subsets: first proof. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 1, p. 3-4, 2005.
- MCGUIRE, C.D.; FLOYD, T. M. Studies on experimental shigellosis: I. *Shigella* infections of normal mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 108, n. 2, p. 269, 1958.
- MÉNARD, R.; DEHIO, C.; SANSONETTI, P.J. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 220-226, 1996.
- MEYER, D. *et al.* Hypervariable epitope constructs representing variability in envelope glycoprotein of SIV induce a broad humoral immune response in rabbits and rhesus macaques. **AIDS research and human retroviruses**, v. 14, n. 9, p. 751-760, 1998.
- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual review of immunology**, v. 7, n. 1, p. 145-173, 1989.
- MULCZYK, M. *et al.* Studies on virulence of *Shigella flexneri*. Protective effect of outer membrane proteins. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 29, n. 1, p. 85-90, 1981.
- MULLIGAN, M. S. *et al.* Protective effects of IL-4 and IL-10 against immune complex-induced lung injury. **The Journal of Immunology**, v. 151, n. 10, p. 5666-5674, 1993.
- NAG, D. *et al.* Immunization of Mice with a Live Transconjugant *Shigella* Hybrid Strain Induced Th1 and Th17 Cell- Mediated Immune Responses and Confirmed Passive Protection Against Heterologous *Shigellae*. **Scandinavian journal of immunology**, v. 83, n. 2, p. 92-101, 2016.
- NAUMOVA, E. N. *et al.* Seasonality in six enterically transmitted diseases and ambient temperature. **Epidemiology and infection**, v. 135, n. 02, p. 281-292, 2007.

- NAVIA, M. M.; GASCÓN, J. Genetic diversity of *Shigella* species from different intercontinental sources. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 5, n. 4, p. 349-353, 2005.
- NAZ, R. K.; DABIR, P. Peptide vaccines against cancer, infectious diseases, and conception. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 12, p. 1833-44, 2007.
- NETEA, M. G. *et al.* Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 254-258, 2003.
- NEURATH, A. R. *et al.* Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120–145 region of the hepatitis B virus envelope are virus-neutralizing. **Vaccine**, v. 4, n. 1, p. 35-37, 1986.
- NIESEL, D. W. *et al.* Natural and recombinant interferons inhibit epithelial cell invasion by *Shigella* spp. **Infection and immunity**, v. 52, n. 3, p. 828-833, 1986.
- NIKAIDO, H. In *Escherichia coli* and Salmonella-Cellular and Molecular Biology. **American Society for Microbiology**, Washington, D. C, ed. Neidhardt F. C, p. 29–47, 1996.
- NIYOGI, S. K. Shigellosis. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43, n. 2, p. 133-143, 2005.
- NUNES, M. R. *et al.* Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de pediatria**, v. 88, n. 2, p. 125-128, 2012.
- NYFREN, B.L *et al.* Foodborne outbreaks of shigellosis in the USA, 1998– 2008. **Epidemiology and infection**, v. 141, n. 02, p. 233-241, 2013.
- OAKS, E. V.; TURBYFILL, K. R.; KAMINSKI, R. W. **Artificial invaplex**. U.S. Patent n. 7,780,966, 24 ago. 2010.
- OJHA, S. C. *et al.* A pentaplex PCR assay for the detection and differentiation of *Shigella* species. **BioMed research international**, v. 2013, p. 412370, jan. 2013.
- OLIVEIRA, P. L. **Caracterização de bacteriocina sintetizada por amostra de *Shigella sonnei* isolada de criança com diarreia aguda**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.
- OMS – Organização Mundial de Saúde. **Diarrhoeal disease**. 2017.
- ORLANDI, P. P *et al.* Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n. 5, p. 621-625, 2001.
- PAIGEN, B. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 2, p. 458S-462S, 1995.

PAIVA, C. M.; LORENA, V. M. B.; GOMES, Y. M. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Rev Patol Trop**, v. 37, n. 1, p. 1-14, 2008.

PARDO, M.C.S. **Identificação de epítomos imunogênicos de *Shigella flexneri***. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, 2016.

PARSOT, C. *et al.* A secreted anti-activator, OspD1, and its chaperone, Spa15, are involved in the control of transcription by the type III secretion apparatus activity in *Shigella flexneri*. **Molecular microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1627-1635, 2005.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS microbiology letters**, v. 252, n. 1, p. 11-18, 2005.

PATH – DefeatDD. **The cascading burden of diarrheal disease**. Revealing the hidden costs of ETEC and *Shigella* diarrhea. Seattle, WA, USA. 2015.

PEIRANO, G.; SOUZA, F.S.; RODRIGUES, D.P. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 245-250, 2006.

PHALIPON, A.; SANSONETTI, P. J. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival?. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 119-129, 2007.

PORE, D. *et al.* Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri 2a*, induces protective immune response in a mouse model. **PLoS one**, v. 6, n. 7, p. e22663, 2011.

PORE, D.; MAHATA, N.; CHAKRABARTI, M. K. Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri 2a* links innate and adaptive immunity in a TLR2-dependent manner and involvement of IL-12 and nitric oxide. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 15, p. 12589-12601, 2012.

PORE, D.; CHAKRABARTI, M. K. Outer membrane protein A (OmpA) from *Shigella flexneri 2a*: a promising subunit vaccine candidate. **Vaccine**, v. 31, n. 36, p. 3644-3650, 2013.

QIU, S. *et al.* Shift in serotype distribution of *Shigella* species in China, 2003-2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 3, p. 252. e5-252. e8, 2015.

QU, F. *et al.* Plasmid-encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-55 in a clinical *Shigella sonnei* strain, China. **Future microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1143-1150, 2014.

RABBANI, G. H. *et al.* Development of an improved animal model of shigellosis in the adult rabbit by colonic infection with *Shigella flexneri 2a*. **Infection and immunity**, v. 63, n. 11, p. 4350-4357, 1995.

- RAM, P. K. *et al.* Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 05, p. 577-603, 2008.
- RAQIB, R. *et al.* Persistence of local cytokine production in shigellosis in acute and convalescent stages. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 1, p. 289-296, 1995.
- RAQIB, R. *et al.* Cytokine secretion in acute shigellosis is correlated to disease activity and directed more to stool than to plasma. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 2, p. 376-384, 1995.
- RASHID, H.; RAHMAN, M. Possible transfer of plasmid mediated third generation cephalosporin resistance between *Escherichia coli* and *Shigella sonnei* in the human gut. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 15-18, 2015.
- RAUTA, P. R. *et al.* In silico identification of outer membrane protein (Omp) and subunit vaccine design against pathogenic *Vibrio cholerae*. **Computational Biology and Chemistry**, v. 65, p 61–68, 2016.
- REIS, R.S.; HORN, F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of host-bacteria interactions in enteric diseases. **Gut pathogens**, v. 2, n. 1, p. 8, 2010.
- SACK, D.A *et al.* Is protection against shigellosis induced by natural infection with *Plesiomonas shigelloides*? **The Lancet.**, v.343, p.1413-1415, 1994.
- SALVATO, B. Hemocyanins: molecular architecture, structure and reactivity of the binuclear copper active site. **Life. Chem. Rep.**, v. 8, p. 1-47, 1990.
- SANSONETTI, P. J. *et al.* Infection of rabbit Peyer's patches by *Shigella flexneri*: effect of adhesive or invasive bacterial phenotypes on follicle-associated epithelium. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 7, p. 2752-2764, 1996.
- SANSONETTI, P. J. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 3, p. G319-G323, 2001.
- SANSONETTI, P. J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. **FEM Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p.3-14, 2001.
- SANTOS, H.C.A.S. **Caracterização molecular e fenotípica da disseminação de diferentes sorotipos de Escherichia coli enteroinvasora em células epiteliais intestinais da linhagem Caco-2**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2012.
- SASAKAWA, C. A. New paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 3, p. 229-243, 2010.

- SAUER, M. M. *et al.* Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. **Nature communications**, v. 7, p. 10738, 2016.
- SCHROEDER, G.N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clinical microbiology reviews**, v. 21, n. 1, p. 134-156, 2008.
- SELLGE, G. *et al.* Th17 cells are the dominant T cell subtype primed by *Shigella flexneri* mediating protective immunity. **The journal of immunology**, v. 184, n. 4, p. 2076-2085, 2010.
- SESARDIC, D. Synthetic peptide vaccines. **Journal of medical microbiology**, v. 39, n. 4, p. 241-242, 1993.
- SHTRICHMAN, R.; SAMUEL, C. E. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. **Current opinion in microbiology**, v. 4, n. 3, p. 251-259, 2001.
- SINGARAVELUA, M.; SELVANA, A.; ANISHETTY, S. Molecular dynamics simulations of lectin domain of FimH and immunoinformatics for the design of potential vaccine candidates. **Computational Biology and Chemistry**, v. 52, p. 18-24, 2014.
- SMITH, S. G. J.; MAHON, V.; LAMBERT, M. A. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 273, p. 1-11, 2007.
- SOUSA, M.A.B. *et al.* Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. **Apmis**, v. 118, n. 2, p. 125-135, 2010.
- SUZUKI, T. *et al.* A novel caspase-1/toll-like receptor 4-independent pathway of cell death induced by cytosolic Shigella in infected macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 14042-14050, 2005.
- SWAMINATHAN, A. *et al.* Keyhole limpet haemocyanin – a model antigen for human immunotoxicological studies. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 78, n.5, p. 1135-1142, 2014.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária - Uma Introdução**. 8 ed. Rio de Janeiro: Saunders: Elsevier, 2009.
- TORRES, A. G. *et al.* Outer membrane protein A of *Escherichia coli* O157: H7 stimulates dendritic cell activation. **Infection and immunity**, v. 74, n. 5, p. 2676-2685, 2006.
- TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.
- TRÉPANIÉ, S. *et al.* Travel- Related Shigellosis in Quebec, Canada: An Analysis of Risk Factors. **Journal of travel medicine**, v. 21, n. 5, p. 304-309, 2014.

- TROEGER, C. *et al.* Estimativas da morbidade, mortalidade e etiologia globais, regionais e nacionais de doenças diarréicas: Uma análise sistemática para o estudo Global Burden of Disease 2015. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, edição 9, p. 909 – 948, 2017.
- ULLOA, L.; TRACEY, K. J. The "cytokine profile": a code for sepsis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 56-63, 2005.
- UTSUNOMIYA, A.; NAKAMURA, M.; HAMAMOTO, A. Expression of fimbriae and hemagglutination activity in *Shigella boydii*. **Microbiology and immunology**, v. 44, n. 6, p. 529-531, 2000.
- VENKATESAN, M. M.; RANALLO, R. T. Live-attenuated *Shigella* vaccines. **Expert review of vaccines**, v. 5, n. 5, p. 669-686, 2006.
- VOLKOVA, T. D. *et al.* Study of the antigenic structure of tick-borne encephalitis virus using synthetic peptides. **Bioorganicheskaja khimiia**, v. 24, n. 2, p. 100-111, 1998.
- WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J. Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 765, 2009.
- WALKER, R. I. An assessment of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella* vaccine candidates for infants and children. **Vaccine**, v. 33, n. 8, p. 954-965, 2015.
- WALTON, T. A. *et al.* The cavity-chaperone Skp protects its substrate from aggregation but allows independent folding of substrate domains. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 6, p. 1772-1777, 2009.
- WAY, S. S. *et al.* An essential role for gamma interferon in innate resistance to *Shigella flexneri* infection. **Infection and immunity**, v. 66, n. 4, p. 1342-1348, 1998.
- WEIGLE, W. O. Immunochemical properties of hemocyanin. **Immunochemistry**, v. 1, n. 4, p. 295-302, 1964.
- WITKOWSKA, D.; CZARNY, A.; MULCZYK, M. Humoral response in mice immunized with outer membrane proteins of *Shigella flexneri*. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 34, n. 5-6, p. 499-504, 1986.
- WITKOWSKA, D.; CZARNY, A.; MULCZYK, M. Humoral response in mice immunized with outer membrane proteins of *Hafnia alvei*. Protective activity of anti-OMP-antibodies. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 40, n. 5-6, p. 301-304, 1992.
- YABUUCHI, E. *Bacillus dysentericus* (sic) 1897 was the first taxonomic rather than *Bacillus dysenteriae* 1898. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1041-1041, 2002.
- YANG, J.Y. *et al.* A mouse model of shigellosis by intraperitoneal infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 203-215, 2014.
- ZHOU, L.; CHONG, M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity**, v. 30, n. 5, p. 646-655, 2009.



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA  
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES  
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA  
 ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS  
 COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

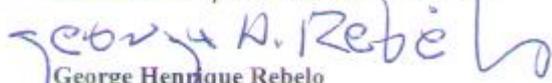
**PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS  
 DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial vacinal de peptídeos de antígenos de *Shigella* sp", registrada com o nº 059/2016, sob a responsabilidade de **Aline Rubens de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 30/03/2017.

Finalidade	( ) Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização		31/05/2017 a 31/02/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo	isogênico Balb/c <i>Mus musculus</i>
Número de animais		234
Peso/Idade		25 a 40 gramas
Sexo		M + F
Origem		Biotério Central INPA

Data de liberação do Parecer: 31.03.2017

  
**George Henrique Rebelo**  
 Presidente CEUA-INPA  
 PO n. 079/2015