



UFAM

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

IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS IMUNOGÊNCOS DE *Shigella flexneri*

MAYANA CRISTINA DA SILVA PARDO

MANAUS-AMAZONAS

2016

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

MAYANA CRISTINA DA SILVA PARDO

IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS IMUNOGÊNCOS DE *Shigella flexneri*

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

Orientadora: Dr^a. Patrícia Puccinelli Orlandi

MANAUS-AMAZONAS

2016

Ficha Catalográfica

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

P226i Pardo, Mayana Cristina da Silva
Identificação de epitopos imunogênicos de *Shigella flexneri* /
Mayana Cristina da Silva Pardo. 2016
80 f. : il. color; 31 cm.

Orientadora: Patrícia Puccinelli Orlandi
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. *Shigella flexneri*. 2. peptídeo sintético. 3. estratégia vacinal. 4.
imunização. I. Orlandi, Patrícia Puccinelli II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

MAYANA CRISTINA DA SILVA PARDO

IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS IMUNOGÊNICOS DE *Shigella flexneri*

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

Aprovada em:18/11/2016.

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Patrícia Puccineli Orlandi
Instituto Leônidas Maria & Deane – Fiocruz

Dr^a. Najla Benevides Matos
Fiocruz – Rondônia

Dr^a. Andréa Felix Listik
Universidade do Estado do Amazonas

DEDICATÓRIA

*À Deus,
Sem Ele nenhuma conquista valeria a pena.*

“A Ciência é o caminho para se chegar a Deus pela razão.”

Johnny De Carli

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois eu acredito que tudo em nossa vida tem o toque de Deus e é onde eu deposito toda minha fé e esperança para alcançar meus objetivos, onde o revigoro minhas forças para sempre caminhar em frente sem desistir.

Aos meus familiares que também sempre me deram suporte em várias etapas da minha vida, me apoiando mesmo que indiretamente para ir até o fim deste trabalho, minha gratidão eterna.

Agradeço a minha orientadora, Dr^a. Patrícia Puccinelli Orlandi, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa no Instituto Leônidas & Maria Deane - Fiocruz, pela sua orientação, conhecimento e confiança, contribuiu muito para o meu crescimento como profissional, muito obrigada.

Agradeço ao Dr. Paulo Afonso Nogueira por contribuir com seus conhecimentos para o enriquecimento deste estudo. Seus ensinamentos foram de fundamental importância para a concretização deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Luiz André Mariúba por ter disponibilizado tempo e conhecimento para ajudar-me a desenvolver várias etapas desta pesquisa.

À Dr^a. Stefanie Pinto Lopes, eu agradeço por ter contribuído dando várias sugestões para melhoramento do resultado final deste trabalho e por ser sempre prestativa quando eu precisei muito obrigada.

Ao Dr. Gemilson Soares Pontes, pelas sugestões quanto ao desenho experimental desta pesquisa, foi de grande importância.

Agradeço ao Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila, pela colaboração no trabalho, por me receber em seu laboratório e compartilhar seus conhecimentos quanto à síntese de peptídeos, o qual foi enriquecedor para a realização deste trabalho.

Agradeço ao meu amigo e companheiro de laboratório Lucas Barbosa Oliveira, por ter contribuído com todo seu conhecimento e apoio, por ser sempre prestativo e disponível a ensinar, sua contribuição foi extremamente importante para a realização deste estudo, muito obrigada.

Agradeço ao Jean de Melo Silva, também amigo e companheiro de laboratório, por ser um excelente profissional e sempre solícito a ajudar, em especial com os ELISAs, parte importante do meu trabalho.

Agradeço à MSc. Maria Edilene Martins de Almeida e MSc. Yury Oliveira Chaves pelo suporte dado no laboratório durante os experimentos teste trabalho, muito obrigada.

Agradeço as minhas amigas da minha turma do Mestrado, Paloma Inessa de Souza Dantas e Andréia Ferreira pelo companheirismo e amizade ao longo desta trajetória que sabemos que não é fácil, muito agradecida.

Agradeço aos camundongos, que fizeram papel importante na realização deste trabalho, espero os ter tratado com respeito e dignidade.

E por fim, à Universidade Federal do Amazonas, através do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC) pela oportunidade e concessão da bolsa de estudos.

AGRADEÇO.

RESUMO

Shigella sp. é responsável por uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, especialmente em países em desenvolvimento. A infecção por esta bactéria é conhecida como shigelose ou disenteria bacilar, uma diarreia inflamatória altamente contagiosa. A antibioticoterapia contra shigelose tem se tornado um desafio devido à crescente resistência aos antibióticos apresentada pelos isolados clínicos. Dessa maneira, a imunoprofilaxia direcionada para o desenvolvimento de vacinas tem se tornado prioridade pela Organização Mundial de Saúde no combate a shigelose. Considerando a necessidade de desenvolver novas estratégias de vacinação para o controle da shigelose, uma vez que ainda não existe uma vacina licenciada segura e eficaz, o presente trabalho objetivou identificar epitopos de célula B das proteínas OmpA e FimH de *Shigella flexneri* com potencial imunogênico, utilizando de análises *in silico* para a predição, além de avaliar a resposta humoral de camundongos imunizados com peptídeos sintéticos que imitam estes epitopos. Através do programa IEDB foram preditas 11 epitopos (5 para OmpA e 6 para FimH) e os peptídeos correspondentes foram sintetizados. A estrutura 3D desses antígenos também foi construída para facilitar a predição dos epitopos. Os peptídeos que reagiram ao antissoro anti-*Shigella*, foram selecionados para imunização de camundongos imunocompetentes. Os antissoros anti-peptídeos P1 (controle positivo), P2, P3 e P4 foram produzidos e testados contra 13 isolados selvagens de *Shigella flexneri*, e apresentaram 92,3% (12/13) de reconhecimento pelo epitopo correspondente na proteína nativa presente nas cepas testadas. O epitopo mais imunodominante foi o P2 com resultado estatisticamente significativo ($P < 0,0422$), quando o nível de reconhecimento de P2 foi comparado com P1, diferenças significativas também foram observadas ($P < 0,0155$). O epitopo P4 foi o segundo epitopo imunodominante e está localizado em uma das alças na superfície da OmpA, enquanto o epitopo P2 que foi o mais imunodominante está localizado no domínio globular no espaço periplasmático. Entretanto, os anticorpos produzidos contra os peptídeos P2 e P4 foram capazes de reconhecer os isolados selvagens de *S. flexneri*, este resultado possibilita inferir que esses peptídeos possuem potencial para um candidato a vacina.

Palavras-chave: *Shigella flexneri*, peptídeo sintético, estratégia vacinal, imunização.

ABSTRACT

Shigella sp. is responsible for one of the leading causes of child morbidity and mortality, especially in developing countries. Infection by this bacterium is known as shigellosis or bacillary dysentery, a highly contagious inflammatory diarrhea. Antibiotic therapy against shigellosis has become a challenge due to the increasing resistance to antibiotics presented by clinical isolates. Thus, immunoprophylaxis directed towards the development of vaccines has become a priority for the World Health Organization in the fight against shigellosis. Considering the need to develop new vaccination strategies for the control of shigellosis and the absence of a licensed and safe vaccine, the present work proposed to identify B cell epitopes of the OmpA and FimH proteins of *Shigella flexneri* with immunogenic potential, using *in silico* analyzes for the prediction, besides evaluating the humoral response of mice immunized with synthetic peptides that mimic these epitopes. Through the IEDB program, 11 epitopes (5 for OmpA and 6 for FimH) were predicted and the corresponding peptides were synthesized. The 3D structure of these antigens was also constructed to facilitate the prediction of epitopes. Peptides that reacted to the anti-*Shigella* antiserum were selected for immunization of immunocompetent mice. The anti-peptide antisera P1 (positive control), P2, P3 and P4 were produced and tested against 13 wild isolates of *Shigella flexneri*, and showed 92.3% (12/13) of recognition by the corresponding epitope in the native protein present in the strains Tested. The most immunodominant epitope was P2 with a statistically significant result ($P < 0.0422$), when the level of recognition of P2 was compared with P1, significant differences were also observed ($P < 0.0155$). The P4 epitope was the second immunodominant epitope and is located in one of the loops on the surface of the OmpA, whereas the P2 epitope which was the most immunodominant is located in the globular domain in the periplasmic space. However, the antibodies produced against the P2 and P4 peptides were able to recognize wild isolates of *S. flexneri*, this result makes it possible to infer that these peptides have potential for a vaccine candidate.

Key Words: *Shigella flexneri*, synthetic peptide, vaccine strategy, immunization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- Composição do LPS de *Shigella*.** Os antígenos são compartilhados entre diferentes sorotipos. As estruturas mostradas esquematicamente no painel inferior da figura fornecem a base para os sorotipos de *S. flexneri* ou subsorotipos distintos.23
- Figura 2- Invasão de *Shigella* sp. (1) *Shigella* atravessa a barreira intestinal através das células M. (2) escape das bactérias e apoptose dos macrófagos. (3) Secreção fatores quimiotáticos pelas células epiteliais infectadas e recrutamentos de leucócitos polimorfonucleados (PNM linfócitos), respostas inflamatória inicial. (4) Antígenos de CD carregados e transportados para a estimulação de células T naive. (5) Células dendríticas (CD) permitindo a apresentação de antígenos bacterianos às células T.27**
- Figura 3- Exemplos de epitopos linear e conformacional.** Painel (A) Apresenta um epitopo linear para linfócito-B (IEDB ID 1610831; PDB ID: 3PP4:P). Painel (B) Fornece epitopo conformacional (IEDB ID: 14362; PDB ID: 1K4D:C). As anotações de epitopos foram extraídos do Immune Epitopo Data Base (IEDB) e a estrutura foi coletada do Protein Data Bank PDB. A cor vermelha denota a localização do epitopo de célula-B na superfície do antígeno de proteína e a fonte vermelha e negrito representa o epitopo correspondente a sequência.32
- Figura 4- Esquema representativo da metodologia utilizada no trabalho.36**
- Figura 5- Demonstração da imunização dos camundongos via intraperitoneal e organização dos grupos amostrais.** (A) Aplicação do imunógeno via intraperitoneal em camundongos Balb/C. (B) Organização dos grupos de camundongos (P1, P2, P3, P4, P7, P10, 12) para o ensaio de imunização com peptídeos sintéticos acoplados com BSA e grupo controle (BSA), sendo três animais por microisolador..... 43
- Figura 6- Avaliação do reconhecimento de anticorpos anti-peptídeos contra proteínas nativas em amostras de diferentes isolados de *Shigella* por Citometria de Fluxo.** (A) Análise por tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das amostras de *Shigella* por citometria de Fluxo, (B) Avaliação da porcentagem de marcação de Anti-Mouse Alexa Flúor 488 das amostras de soro contra peptídeos nativos, (C) histograma da media de intensidade de fluorescência - MIF.47
- Figura 7- Relatório gráfico do programa IEDB para avaliação e predição de epitopos lineares de célula B do antígeno OmpA de *Shigella flexneri* 5a str. M90T.** Três parâmetros físico-químico foram utilizados: (A) Predição de acessibilidade da superfície, (B) Predição de

hidrofilicidade e (C) Predição de antigenicidade. Os picos na cor amarela correspondem à previsão da posição dos epitopos na proteína que está indicada no eixo x, e o score mínimo e máximo obtido na predição de cada epitopo está indicado no eixo y.49

Figura 8- Relatório gráfico do programa IEDB para avaliação e predição de epitopos lineares de célula B do antígeno FimH de *Shigella flexneri* 5 str. 8401. Três parâmetros físico-químicos foram utilizados: (A) Predição de acessibilidade da superfície, (B) Predição de hidrofilicidade e (C) Predição de antigenicidade. Os picos da cor amarela correspondem à previsão da posição dos epitopos na proteína que está indicada no eixo x, e o score mínimo e máximo obtido na predição de cada epitopo está indicado no eixo y.50

Figura 9- Relatório gráfico do SWISS-MODEL na versão web gerados na construção automática do modelo estrutural de OmpA de *S. flexneri*. (A) Dados obtidos na construção do modelo (B) Alinhamento entre a sequência primária de OmpA e a sequência da estrutura molde (C) Pré-visualização do modelo construído para OmpA e as regiões de cor laranja são consideradas de maior acessibilidade ao solvente.....53

Figura 10- Relatório gráfico do SWISS-MODEL na versão web gerados na construção automática do modelo estrutural de FimH de *S. flexneri*. (A) Dados obtidos na construção do modelo (B) Alinhamento entre a sequência primária de FimH e a sequência da estrutura molde (C) Pré-visualização do modelo construído para FimH e as regiões de cor laranja são consideradas de maior acessibilidade ao solvente.....54

Figura 11- Relatório gráfico do SWISS-MODEL na versão web gerados na construção automática do modelo estrutural de OmpC de *S. flexneri*. (A) Dados obtidos na construção do modelo (B) Alinhamento entre a sequência primária de OmpC e a sequência da estrutura molde (C) Pré-visualização do modelo construído para OmpC e as regiões de cor laranja são consideradas de maior acessibilidade ao solvente.....55

Figura 12- Visualização da previsão da posição epitopo de OmpC no modelo tridimensional da *Shigella flexneri* 2a str. 301 no programa Swiss PDB-Viewer. A região destacada em azul corresponde ao epitopo P1, predito anteriormente por Jarzab (2013). Este peptídeo foi utilizado para comparação com os epitopos preditos neste trabalho, assim como um possível controle positivo. (A) Visualização da posição do epitopo correspondente ao peptídeo P1 na superfície da OmpC. (B) Demonstração na forma de fita da estrutura da proteína OmpC bem como do epitopo P1.55

Figura 13- Visualização da previsão da posição epitopo de OmpA no modelo tridimensional da *Shigella flexneri* 5a str. M90T no programa Swiss PDB-Viewer. (A) Visualização da posição dos epitopos correspondentes aos peptídeos P2 ao P6 na superfície da

OmpA. (B) Demonstração na forma de fita da estrutura da proteína OmpA bem como dos epitopos correspondentes aos peptídeos P2 ao P7..... 56

Figura 14- Previsão da posição dos epitopos no modelo construído para o antígeno FimH da *Shigella flexneri* 5 str. 8401 através do programa Swiss PDB-Viewer. (A) Visualização da posição dos epitopos correspondentes aos peptídeos P7 ao P12 na superfície do FimH. (B) Demonstração na forma de fita da estrutura da proteína FimH bem como dos epitopos correspondentes aos peptídeos P7 ao P12. 56

Figura 15– ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das três imunizações com os peptídeos sintéticos (P1, P2, P3 e P4). C1= camundongo 1, C2= camundongo 2 e C3= camundongo 3. Controles: antissoro pré-imune, antissoro anti-BSA ambos de camundongo e branco. O ensaio de ELISA foi realizado utilizando solução de PVP 2% em PBS 1x para bloqueio da placa de ELISA e para diluição dos anticorpos secundário conjugado anti-mouse IgG (1:100) e também foi utilizado solução BSA 5% em PBS 1x para adsorção de anti-BSA presente nos antissoros testados. 58

Figura 16- ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das três imunizações com os peptídeos sintéticos (P7, P10, P12). C1= camundongo 1, C2= camundongo 2 e C3= camundongo 3. Controles: antissoro pré-imune, antissoro anti-BSA ambos de camundongo e branco. O ensaio de ELISA foi realizado adsorvendo o anticorpo primário com BSA 5%..... 59

Figura 17- ELISA anti-mouse IgG anti-BSA da terceira imunização com antissoros P1, P2, P3 e P4 contra BSA em diluição seriada. As amostras controles utilizadas foram antissoro de camundongo pré-imune e antissoro anti-BSA..... 60

Figura 18- Padronização Citometria anti-mouse IgG antissoros para teste de adsorção com BSA 5 %. As amostras controles utilizadas foram: somente bactéria (*S. flexneri* 5a str. M90T), bactéria mais anticorpo secundário, antissoro pré-imune e antissoro anti-BSA. O antissoro P1 foi utilizado como amostra positiva, pois o peptídeo P1 foi descrito anteriormente por Jarzab (2013) como um epitopo de célula B do antígeno OmpC. O anticorpo secundário utilizado foi Alexia 488 (Invitrogen) concentração 1:400 e os antissoros na concentração de 1:100. 61

Figura 19- Citometria de fluxo do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse antissoros P1, P2, P3 e P4 contra vários isolados selvagens de *Shigella flexneri*. O anticorpo secundário utilizado foi Alexa Flúor 488 (Invitrogen) concentração 1:400. As barras indicam o Index de reconhecimento obtido através do cálculo de Index de fluorescência menos o valor de cut off. 62

Figura 20- Nível de reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse antissoros P1, P2, P3 e P4 pelos epitopos correspondentes presentes em diferentes cepas selvagens de *Shigella flexneri* através de citometria de fluxo. As barras indicam o valor de Index de reconhecimento obtido através do cálculo de Index de fluorescência menos o valor de cut off.
.....63

Figura 21- Perfil de imunodominância dos epitopos P1 (OmpC) e P2, P3 e P4 (OmpA). A análise de diferenças estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste Kruskal-Wallis para todos os epitopos e o teste T para análise de diferenças entre P1 e P2. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.
.....64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- <i>Shigella</i> espécies e sorotipos	23
Tabela 2- Referência do GenBank das sequências de aminoácidos dos antígenos de <i>Shigella flexneri</i>	37
Tabela 3- Esquema de imunização e sangria dos camundongos	44
Tabela 4- Informações das sequências peptídicas preditas pela ferramenta IEDB correspondentes aos epitopos lineares	51
Tabela 5- Análise da estrutura e parâmetro físico-químicos na predição dos epitopos lineares	52
Tabela 6- ELISA anti-mouse IgG anti- <i>Shigella</i> para triagem dos peptídeos sintéticos	57

LISTA DE ABREVEATURAS

A.C. – Adjuvante de Freud Completo
A.I. – Adjuvante de Freud Incompleto
Ag-Ac – Antígeno-Anticorpo
BLAST – Basic Local Alignment Search
BSA – Bovine Serum Albumin (Albumina de soro bovino)
CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEUA – Comitê de ética em Pesquisa no Uso em Animais
D.O. – Densidade óptica
EIEC – Escherichia coli Enteroinvasiva
ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent
FDA – Food and Drug Administration
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
IEDB – Immune Epitope DataBase and Analysis Reasource
ILMD – Instituto Leônidas & Maria Deane
INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
LB – Luria Bertani
LPS – Lipopolissacarídeo
MIF – Mediana de Intensidade de Fluorescência
NCBI – National Center for Biotechnology Information
Omp – Outer membrane protein (Proteína da membrana externa)
OmpA - Outer membrane protein A (Proteína da membrana externa A)
OmpC - Outer membrane prontein C (Proteína da membrana externa C)
P.M. – Peso molecular
PBS – Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato Saline)
PDB – Protein Data Bank
PMN – Polimorfonucleada
PVP – Polivinil pirrolidona
RCSB – Research Collaboratory of Strutural Bioinformatics
RNM – Ressonância Nuclear Magnética
SST3 – Sistema de Secreção do Tipo 3
TLR2 – Receptor Toll Like 2
TMB – Tetrametil benzidina

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UPEC – *Escherichia coli* Uropatogênica

OMS – Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1- <i>Shigella</i> sp.	22
2.2- EPIDEMIOLOGIA DE <i>Shigella</i> sp.....	24
2.3- PATOGÊNESE DA <i>Shigella</i> sp.....	26
2.4- SHIGELOSE: TRANSMISSÃO, SINTOMATOLOGIA E TRATAMENTO	29
2.5- VACINA PARA <i>Shigella</i> E ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA	30
2.6- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E BIOINFORMÁTICA	31
3. JUSTIFICATIVA	34
4. OBJETIVOS	35
4.1- OBJETIVO GERAL.....	35
4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1- MOLÉCULAS ALVO PARA IDENTIFICAÇÃO DOS EPITOPOS	37
5.2- BUSCA POR ESTRUTURAS PROTEICAS	38
5.2.1- Análise de Similaridade	38
5.2.2- Modelagem de Proteína por Homologia	38
5.3- PREDIÇÕES DOS EPITOPOS.....	39
5.3.1- Predição de epítipo linear pelo IEDB	39
5.3.2- Visualização das estruturas tridimensional e epítipos preditos	40
5.4- SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS	40
5.5- ANIMAIS E BACTÉRIA.....	40
5.6- TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS.....	41
5.6.1- Produção de anticorpos específicos IgG total contra <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T	41
5.6.2- ELISA indireto para determinação dos peptídeos mais imunogênicos	41
5.7- ACOPLAMENTO DOS PEPTÍDEOS.....	42
5.7.1- Método de Bradford para quantificação do peptídeo acoplado	42
5.8- DESENHO EXPERIMENTAL E PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO	42
5.9- AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti-peptídeos POR ELISA INDIRETO.....	44

5.9.1- Avaliação de anticorpos IgG anti-BSA presente soro dos camundongos imunizados	45
5.10- AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS IgG anti-peptídeos POR CITOMETRIA DE FLUXO	45
5.11- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
6. RESULTADOS	49
6.1- PREDIÇÃO DE EPITOPOS LINEARES.....	49
6.2- MODELAGEM MOLECULAR	53
6.3- VISUALIZAÇÃO DOS EPITOPOS LINEARES	55
6.4- TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS.....	57
6.5- AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-MOUSE IgG ANTI-PEPTÍDEOS POR ELISA INDIRETO	58
6.5.1- Detecção de anticorpos anti-peptídeos no soro de camundongos	58
6.5.2- Detecção de anticorpos anti-BSA no antissoro de camundongos imunizados	60
6.6- AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-MOUSE IgG ANTI-PEPTÍDEOS POR <i>Shigella flexneri</i> ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	61
7. DISCUSSÃO	65
8. CONCLUSÃO	70
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXO 1	80

1. INTRODUÇÃO

Shigelose ou disenteria bacilar é uma síndrome disentérica causada por *Shigella*, uma bactéria Gram-negativa, não-móvel, enteroinvasiva que pertence à família *Enterobacteriaceae* (SANSONETTI, 2001). *Shigella* é um agente patogênico diversificado antígenicamente, cuja taxonomia sofre modificações periódicas (BARRY et al., 2013). A atual taxonomia oficial engloba quatro espécies (ou grupos) e 49 sorotipos e subtipos que incluem *S. dysenteriae* (grupo A, 15 sorotipos), *S. flexneri* (grupo B, 15 sorotipos e subtipos, incluindo o recém-designado 7a e 7b subtipos), *S. boydii* (grupo C, 20 sorotipos) e *S. sonnei* (grupo D, um sorotipo). Além disso, mais de uma dúzia de novas cepas do sorotipo ou subtipo putativos estão sendo considerados para uma possível classificação oficial (BARRY et al., 2013; LIVIO et al., 2014).

A *Shigella* sp. tem a capacidade de invadir o epitélio do cólon e do reto de seres humanos, causando assim uma inflamação aguda na mucosa, o que caracteriza a doença (SANSONETTI, 2001). A *Shigella* sp. é um microrganismo altamente contagioso, visto que cerca de 10 à 100 bactérias viáveis podem causar a doença (TRÉPANIER et al., 2014). Após a contaminação por via oral, as bactérias passam através do estômago e intestino delgado até atingir o cólon, onde invadem a mucosa, iniciando o processo inflamatório reto-colite aguda destrutiva, desencadeando os seguintes sintomas disentéricos: febre, cólicas intestinais, diarreia aquosa ou sanguinolenta, com ou sem muco, febre, dor abdominal e tenesmo (SANSONETTI, 2001; RAM et al., 2008).

Shigelose é uma doença diarreica grave que é considerada um grande problema de saúde pública causando considerável morbidade e mortalidade. Os dados de morbidade e mortalidade atualizados são insuficientes, porém, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima-se em todo o mundo que *Shigella* causa 80-165 milhões de casos de doença e 600.000 mortes por ano (CDC, 2015).

A quantificação clássica mundial para infecções por *Shigella* mostram que o principal sorogrupo encontrado em países em desenvolvimento é *S. flexneri* (60%), seguido por *S. sonnei* (15%), *S. dysenteriae* e *S. boydii* ocorrem com frequências semelhantes (cerca de 6%) nestas áreas (KOTLOFF et al., 1999; LIMA et al., 2015). Nos países desenvolvidos, no entanto, *S. sonnei* é o sorogrupo mais comum (77%), seguido por *S. flexneri* (16%), *S. boydii* (2%), e *S. dysenteriae* (1%) (TRÉPANIER et al., 2014).

No Brasil, alguns trabalhos indicam que casos de shigelose são subestimados, porém estudos mostram que as estirpes de *S. flexneri* e *S. sonnei* são os principais agentes

responsáveis pelos casos de shigelose (ANGELINI et al., 2009). Outro aspecto importante na epidemiologia da infecção por *Shigella* é a variação na distribuição de espécies dentro do Brasil (LIMA et al., 2015).

Poucos estudos têm sido realizados na região Norte para estabelecer um panorama atual dessa infecção. Contudo, recentemente um estudo etiológico, realizado em três hospitais que atendem as crianças da periferia de Manaus, identificou 30 isolados de *Shigella* em 1.339 crianças de 0-10 anos que apresentavam diarreia como sintomatologia principal. Os sorogrupos mais frequentes foram: 60% de *S. flexneri*, 22,2% de *S. Sonnei* e 6,6% de ambos sorogrupos, *S. dysenteriae* e *S. boydii* (CRUZ et al., 2014).

Shigella dissemina facilmente em ambientes onde há superlotação, acesso limitado à água, higiene pessoal comprometida e saneamento inadequado (BARRY et al., 2013). A transmissão ocorre por meio da rota via fecal-oral, e é agravada pela falta de higiene, pela ingestão de alimentos contaminados ou em surtos alimentares (JENNISON e VERMA, 2004; SCHROEDE e HILBI, 2008). Portanto, a prevenção inicial da doença acontece no ato de lavar as mãos, garantir o consumo de água potável e saneamento e melhoria da higiene pessoal e alimentos, além de prevenir outras doenças diarreicas (OMS, 2005). Os antibióticos podem ser usados para tratar a shigelose, reduzindo o período de excreção bacteriana do paciente. Porém, tem sido evidenciado que cepas clínicas de *Shigella* desenvolvem cada vez mais resistência a antibióticos de primeira linha (CRUZ et al., 2014), o que dificulta um tratamento efetivo e tem aumentado a tensão em serviços de saúde de países em desenvolvimento.

No entanto, uma vacina eficaz e de baixo custo poderia complementar e acelerar a redução da doença enquanto se espera o acesso universal à melhoria de água, saneamento e higiene (MANI et al., 2016). Estratégias inovadoras, incluindo o desenvolvimento de vacinas contra a maioria dos sorotipos comuns, poderiam proporcionar muitos benefícios. Existe uma diversidade na construção de vacinas em desenvolvimento contra *Shigella*, incluindo vírus vivo atenuado, células inteiras mortas com formalina, glicoconjugada, subunidade, e novos antígenos vacinais, por exemplo: proteínas do sistema de secreção do Tipo III e proteínas de membrana externa (MANI et al., 2016).

As proteínas de membrana externa ou OMPs de bactérias Gram-negativas são estruturas imunologicamente importantes devido sua acessibilidade e por desenvolver mecanismos de defesa (PORE e CHAKRABARTI, 2013). Então, estas proteínas tem sido alvo como antígeno vacinal, e em pesquisas de imuno-proteômica de *S. flexneri* 2a tem

demonstrado que OMPs podem ser considerados como bons candidatos a vacina (WANG et al., 2005; JENNISON et al., 2006; ZHAO et al., 2011; SUH et al., 2014).

Dentre os antígenos imunodominantes na membrana externa de *Shigella flexneri* estão a OmpA (PORE e CHAKRABARTI, 2013; PORE et al., 2011) e OmpC (JARZAB et al., 2013) os quais possuem características desejadas de um candidato a vacina, pois é conservada entre as cepas de *Shigella*, possui epitopo exposto na superfície da célula, bem como capaz de evocar imunidade protetora em camundongos (JARZAB et al., 2013; PORE et al., 2011). Outro antígeno componente do pilus tipo 1 na membrana externa de um subconjunto de bactérias Gram-negativas, chamado FimH, também tem sido alvo de pesquisa como antígeno vacinal, principalmente para *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) (KARAM et al., 2016; SINGARAVELU et al., 2014) porém este antígeno também está presente no gênero *Shigella* e ainda é pouco investigado neste gênero.

Os peptídeos sintéticos que imitam epitopos, bem como anticorpos anti-peptídeo, têm muitas aplicações no diagnóstico de várias doenças humanas (GOMARA e HARO, 2007), além disso tentativas têm sido feitas para desenvolver vacinas profiláticas baseada em peptídeo sintético contra diversas infecções, como por exemplo o vírus da dengue (CHAKRABORTY et al., 2010), ebola (KHAN et al., 2015), por estrogiloidíase (FELICIANO et al., 2016), e vacinas terapêuticas para doenças não infecciosas como câncer (DHIMAN et al., 2016).

Os softwares de imunoinformática e bases de dados têm sido desenvolvidos para facilitar projetos voltados para o desenvolvimento de vacinas à base de epitopo, uma vez que permite a análise prévia do antígeno a ser utilizado na estratégia vacinal (DAVIES e FLOWER, 2007). A identificação computacional de epitopos de células B a partir de cadeias de antígenos é um tema de pesquisa difícil e ativamente investigado, os esforços para o desenvolvimento de métodos para a predição de epitopos lineares se estendem ao longo das últimas três décadas (GAO e KURGAN, 2014). Os métodos de predição de epitopos de células B têm sido voltados principalmente para os epitopos contínuos, com pequenas sequências de aminoácidos, e analisados quanto suas propriedades físico-químicas, tais como a hidrofobicidade, acessibilidade a superfície, a estrutura secundária, e outros (PONOMARENKO e BOURNER, 2007; LI et al., 2014).

Portanto, a investigação de epitopos imunogênicos da *Shigella* sp. presentes em proteínas de superfície da membrana externa, a partir da utilização de peptídeos sintéticos, pode contribuir como combate da shigelose por meio do desenvolvimento de estratégias profilática e terapêutica contra infecção pela *Shigella* sp.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1- *Shigella* sp.

Shigella sp. é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, sem motilidade, não encapsulada e anaeróbio facultativo, que pertence à família *Enterobacteriaceae*. Essas bactérias são patógenos intracelulares facultativos, mostram uma alta especificidade para hospedeiros humanos ou primatas e são os agentes causadores de shigelose ou disenteria bacilar (SCHROEDER e HILBI, 2008; CHANG et al., 2012).

O primeiro relato do isolamento e caracterização de bactérias que causam disenteria bacilar foi inicialmente proposto em 1897, como *Bacillus dysenterie*, publicado no Journal of Bacteriology por Kiyoshi Shiga (YABUUCHI, 2002). Essa bactéria, hoje é conhecida como *Shigella dysenteriae* 1, foi o primeiro membro identificado do gênero *Shigella* e isolado durante as epidemias que ocorreram no Japão na década de 1890 (LEVINE et al., 2007).

Shigella é um agente patogênico antígenicamente diverso, cuja taxonomia sofre alterações periódicas (BARRY et al., 2013). A taxonomia oficial engloba quatro espécies (ou grupos) e 50 sorotipos e subtipos que incluem *S. dysenteriae* (grupo A, 15 sorotipos), *S. flexneri* (grupo B, 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* (grupo C, 20 sorotipos) e *S. sonnei* (grupo D, um sorotipo) (LEVINE et al., 2007; FOSTER et al., 2011; BARRY et al., 2013). A tabela 1 mostra a relação das espécies e sorotipos de *Shigella* com o nicho epidemiológico de cada, além dos sorotipos que deve proteger com uma vacina global contra shigelose.

As espécies de *Shigella* são atualmente definidos por sorotipagem com base em componentes da cadeia lateral específica do antígeno O no lipopolissacarídeo (SAHL et al., 2015). Os sorotipos são definidos na base da composição de hidrato de carbono do antígeno O, que é parte do polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), encontrada em todas as bactérias Gram-negativas (LINDBERG et al., 1991; PHALIPON e SANSONETTI, 2007). O LPS tradicional é construído em três partes: o lipídeo A, um núcleo oligossacarídeo que muitas vezes é conservado dentro de uma espécie, seguido por repetidas unidades de polissacarídeo O-antigênico que é único para cada sorotipo (FOSTER et al., 2011).

Tabela 1- *Shigella* espécies e sorotipos

Espécies de <i>Shigella</i> (grupo)	n° de sorotipos e subsorotipos	O nicho epidemiológico mais importante	Sorotipos que uma vacina global deve proteger
<i>S. dysenteriae</i> (grupo A)	15	Epidemias e pandemias de disenteria grave Shigelose pediátrica	<i>S. dysenteriae</i> 1
<i>S. flexneri</i> (grupo B)	14	endêmicas nos países em desenvolvimento Focos endêmicos espalhados	Todos os 14
<i>S. boydii</i> (grupo C)	20	em países em desenvolvimento	Nenhum
<i>S. sonnei</i> (grupo D)	1	Diarreia do viajante; Shigelose	<i>S. sonnei</i>

Fonte: LEVINE et al., 2007 (Modificado).

Em *Shigella*, esta unidade é a trirramnose (rha) - N-acetil-glicosamina (N-ag), um tetrassacarídeo que é modificado pela ação de glicose e/ou acetato, dependendo do sorotipo (WEST et al., 2005) (Figura 1).

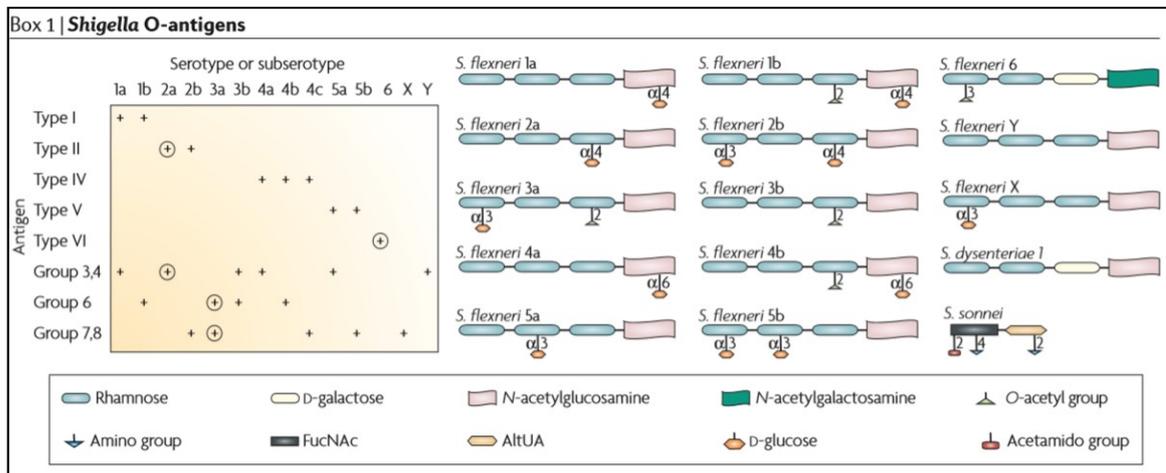


Figura 1- Composição do LPS de *Shigella*. Os antígenos são compartilhados entre diferentes sorotipos. As estruturas mostradas esquematicamente no painel inferior da figura fornecem a base para os sorotipos de *S. flexneri* ou subsorotipos distintos.

Fonte: LEVINE et al., 2007 (Modificado).

Alguns O-antígenos presentes na *Shigella* são idênticos aos encontrados em *Escherichia coli*, porém a sorotipagem ainda é o atual método padrão-ouro para determinação de espécies de *Shigella*, mas a reatividade cruzada entre os isolados de *Shigella* e *Escherichia coli*, pode confundir os resultados (SAHL et al., 2015).

Shigella também pode ser identificada no laboratório clínico através de suas características morfológicas e testes bioquímicos, através do qual é frequentemente caracterizada pela falta de ambos motilidade, lactose e fermentação (SAHL et al., 2015). Em testes bioquímicos, muitas vezes não é possível diferenciar *Shigella* e algumas *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC) e muitas vezes os sintomas clínicos também não podem diferenciar *Shigella* de infecção por *E. coli* ou distinguir entre espécies de *Shigella* (JOHNSON, 2000). Os métodos moleculares para o diagnóstico e caracterização de cepas virulentas de *Shigella* têm sido explorados, mas os pesquisadores ainda não tiveram sucesso na busca de um gene alvo específico para este bacilo (LIMA et al., 2015). Uma compreensão abrangente e atual das espécies prevalentes e sorotipos de *Shigella* são essenciais para a prevenção da doença e desenvolvimento de vacinas (CHANG et al., 2012).

2.2- EPIDEMIOLOGIA DE *Shigella* sp.

Shigelose é uma doença diarreica grave que é considerada um grande problema de saúde pública causando considerável morbidade e mortalidade. Os dados de morbidade e mortalidade atualizados são insuficientes, porém, segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima-se em todo o mundo que *Shigella* causa 80-165 milhões de casos de doença e 600.000 mortes por ano (CDC, 2015).

Estudos epidemiológicos recentes ratificam a permanência de espécies do gênero *Shigella* entre os principais enteropatógenos bacterianos mais frequentemente isolados de pacientes com diarreia, principalmente pacientes pediátricos, mesmo em áreas com melhorias nas instalações de saúde, renda e educação (SCHROEDER e HILBI, 2008; KOTLOFF et al., 2013). Dessa maneira, *Shigella* continua a desempenhar um papel importante na etiologia da diarreia inflamatória e disenteria, apresentando, assim, um sério desafio para as autoridades de saúde pública em todo o mundo (KOTLOFF et al., 2013).

A shigelose tem uma distribuição mundial, mas predomina na maior parte dos países em desenvolvimento, são endêmicas principalmente em países com climas temperados e tropicais (CDC, 2015). A quantificação clássica mundial para infecções por *Shigella* mostram que o principal sorogrupo encontrado em países em desenvolvimento é *S. flexneri* (60%),

seguido por *S. sonnei* (15%), *S. dysenteriae* e *S. boydii* que ocorrem com frequências semelhantes (cerca de 6%) (KOTLOFF et al., 1999; LIMA et al., 2015). Esta distribuição continua sendo observada em estudos recentes, como por exemplo, em um Estudo Multicêntrico Entérico Global realizado em quatro locais na África sub-saariana e três no Sul da Ásia, a distribuição entre 1.130 casos isolados de espécies de *Shigella* representou: *Shigella dysenteriae* e *S. boydii* correspondente a 5,0% e 5,4% respectivamente, *S. flexneri* foi composta de 65,9% e *S. sonnei* 23,7%. (LIVIO et al., 2014).

Nos países desenvolvidos, no entanto, *S. sonnei* é o sorogrupo mais comum (77%), seguido por *S. flexneri* (16%), *S. boydii* (2%), e *S. dysenteriae* (1%) (TRÉPANIER et al., 2014). Portanto, *Shigella flexneri* e *Shigella sonnei* tem sido identificados como os principais sorogrupos que circulam em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (LIMA et al., 2015).

No Brasil, alguns trabalhos indicam que casos de shigelose são subestimados, porém estudos mostram que as estirpes de *S. flexneri* e *S. sonnei* são os principais agentes responsáveis pelos casos de shigelose (ANGELINI et al., 2009). Em Manaus, a capital do estado do Amazonas, ainda há uma predominância de *S. flexneri* entre as cepas circulantes de isolados em crianças que sofrem de diarreia (CRUZ et al., 2014), enquanto que em Belo Horizonte, capital de Minas Gerais, *S. sonnei* é responsável por quase 90% das cepas de *Shigella* detectadas em crianças que também sofrem de diarreia (SOUSA et al., 2013).

Poucos estudos têm sido realizados na Região Norte para estabelecer um panorama atual dessa infecção. Contudo, o estudo etiológico mais recente, foi realizado em 3 hospitais que abrangem a população da periferia de Manaus com 1.339 crianças de 0-10 anos que apresentavam diarreia como sintomatologia principal, identificou-se neste estudo, 30 isolados de *Shigella*, com a seguinte frequência 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).

Os dados mais recentes sobre a diarreia mostram que shigelose ainda é um problema de saúde pública mundial, *S. flexneri* continua a ser o mais prevalente em áreas em desenvolvimento, mas as evidências sugerem uma mudança nas espécies infectantes dominantes para *S. sonnei* em áreas com avanços socioeconômicos recentes, dessa maneira o impacto dessa mudança pato biológica da infecção por *Shigella* precisa de uma investigação mais aprofundada (UD-DIN et al., 2013; LIMA et al., 2015).

2.3- PATOGÊNESE DA *Shigella* sp.

A patogênese de *Shigella* está intimamente ligada à capacidade desta invadir e replicar intracelularmente dentro do epitélio do cólon e do reto, causando inflamação intensa (TANNER et al., 2015). Espécies de *Shigella* possuem um grande plasmídeo de virulência que transporta os genes necessários para a invasão de células, incluindo os do Sistema de Secreção do tipo III (SST3), usado para ganhar a entrada em células epiteliais (ZAIDI e ESTRADA-GARCÍA, 2014). O SST3 é um fator de virulência comum entre os patógenos Gram-negativos, em *Shigella* sp. ele é usado para promover a inflamação, causando apoptose e infecção dos macrófagos, além de entregar suas proteínas efetoras no citosol das células infectadas, entre o repertório de efetores da *Shigella*, muitos são conhecidos por desarranjar os componentes do citoesqueleto de actina, para induzir a internalização das bactérias nas células epiteliais (CHENA et al., 2015; TANNER et al., 2015).

Todos os sorotipos de *Shigella* têm uma patogenia semelhante, que envolve a translocação do íleo e do cólon através células M, a absorção pelos macrófagos, invasão basolateral das células epiteliais e disseminação na mucosa (LEVINE et al., 2007) (Figura 2). A partir do lúmen intestinal, *Shigella* atravessa a barreira epitelial intestinal através das células M, possivelmente por uma absorção mediada por um receptor (TYRER et al., 2007), elas atravessam essa barreira em um processo chamado transcitose, as células M são células epiteliais especializadas que tem a função de continuamente retirar amostras de partículas do lúmen intestinal e entregá-las ao tecido linfóide subjacente, onde uma resposta imune pode ser iniciada caso seja necessário (JENNISON e VERMA, 2004).

Após a transcitose, as bactérias escapam pelo vacúolo fagocítico e a *Shigella* enfrenta outro sistema de defesa do nosso organismo, ficam sujeitas a endocitose por macrófagos e células dendríticas na zona subepitelial do bolso das células M. Os macrófagos residentes, tem a função de englobar e destruir todo o material que entra, sendo assim, a *Shigella* garante a sua sobrevivência induzindo rapidamente a morte do macrófago por apoptose, fato que é acompanhado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 beta e IL-18 e o início de uma massiva resposta inflamatória aguda (BARRY et al., 2013; SCHROEDER e HILBI, 2008).

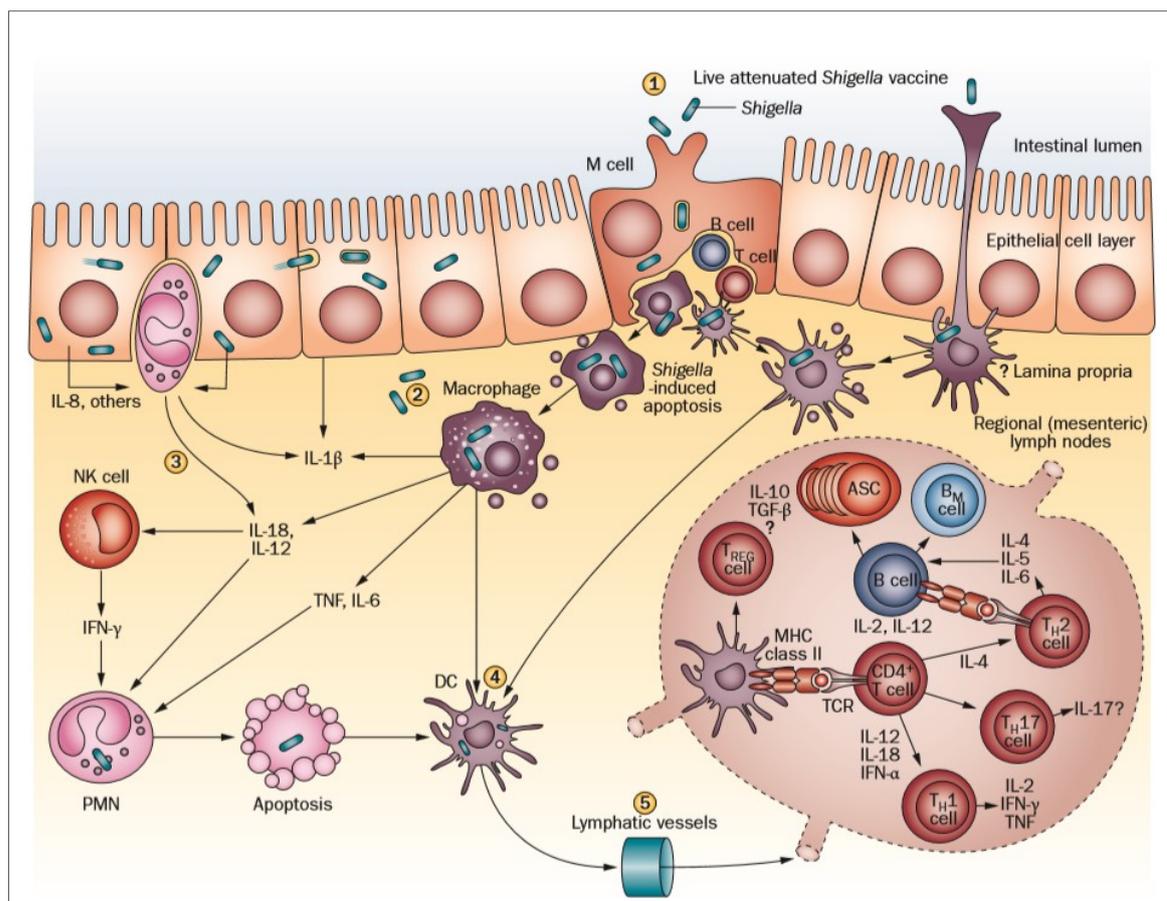


Figura 2- Invasão de *Shigella* sp. (1) *Shigella* atravessa a barreira intestinal através das células M. (2) escape das bactérias e apoptose dos macrófagos. (3) Secreção fatores quimiotáticos pelas células epiteliais infectadas e recrutamentos de leucócitos polimorfonucleados (PNM linfócitos), respostas inflamatória inicial. (4) Antígenos de CD carregados e transportados para a estimulação de células T naive. (5) Células dendríticas (CD) permitindo a apresentação de antígenos bacterianos às células T.

Fonte: BARRY et al., 2013 (Modificado).

Com a morte do macrófago, as bactérias vivas são libertadas, escapam do fagossomo e invadem as células epiteliais pelo lado basolateral, espalhando-se de célula para célula através da camada epitelial da mucosa e multiplicam-se no citoplasma (SCHROEDER e HILBI, 2008). A movimentação dentro do citoplasma das células é feita através da polimerização de uma cauda de actina, semelhante a uma cauda de foguete, que propulsiona a bactéria através da célula (SCHROEDER e HILBI, 2008).

Assim que o ciclo se completa, inicia-se outro ciclo, com a invasão de uma nova célula, desta forma, a bactéria pode evitar a exposição aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro. Porém, o mediador intracelular Nod-1 detecta a presença dos peptidoglicanos bacterianos e desencadeia uma cascata que resulta no recrutamento de

leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o sítio da infecção. Os PMN destroem a integridade da camada epitelial, permitindo que mais bactérias entrem na submucosa sem a necessidade de passar pelas células M (SCHROEDER e HILBI, 2008; JENNISON e VERMA, 2004).

As células epiteliais infectadas por sua vez, segregam IL-8 e outros fatores quimiotáticos que recrutam PMN. Os macrófagos ativados segregam PMN e uma cascata de moléculas pró-inflamatórias (por exemplo, IL-18, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ) atraindo mais células fagocíticas, o que em última instância matam e eliminam o organismo. Esta resposta inflamatória inicial prepara a estimulação do sistema imunológico adaptativo (BARRY et al., 2013).

Apoptose dos macrófagos infectados, neutrófilos e outro material antigênico liberado a partir de células infectadas podem ser tomados por células dendríticas (CD), permitindo a apresentação de antígenos bacterianos às células T (JOFFRE et al., 2012). Estes antígenos de CD - carregada são transportados para zonas de células T interfoliculares adjacentes de folículos linfóides das mucosas ou linfonodos regionais onde eles estimulam as células T naive. Células T estimuladas por sua vez proliferam vigorosamente e se diferenciam em células T efetoras e de memória. Este processo conduz à ativação das células T CD4 + e células Th2, que suportam a produção de anticorpos e células Th1, que irá facilitar e aumentar as respostas inflamatórias, como demonstradas na Figura 2 (BARRY et al., 2013).

Contudo, a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes da patogênese da *Shigella* pode fomentar o desenvolvimento de uma vacina segura e eficiente, o que, em paralelo com a melhoria da higiene, deve conter as infecções generalizadas por este patógeno (SCHROEDER e HILBI, 2008).

2.4- SHIGELOSE: TRANSMISSÃO, SINTOMATOLOGIA E TRATAMENTO

Shigelose é uma doença endêmica em todo o mundo, com milhões de infecções relatadas a cada ano, cuja via de transmissão ocorre pela via fecal-oral (TRÉPANIER et al., 2014). A baixa dose infecciosa da bactéria, a transmissão direta de pessoa a pessoa, transmissão por comida e água contaminadas, e sua baixa suscetibilidade a ácidos do estômago pode ajudar a explicar a ampla disseminação da doença (LIMA et al., 2015). A contribuição de vetores, tais como as moscas domésticas, na transmissão de bactérias de *Shigella* também foram avaliadas e adicionadas entre as causas para a propagação dessa bactéria (FARAG et al., 2013). Outro fator emergente aponta para uma mudança no padrão de transmissão de shigelose, ocorrendo entre indivíduos do sexo masculino na faixa etária de 21 - 60 anos, cujo principal mecanismo poderia ser o sexo, porém o impacto desse modo de transmissão precisa ainda ser mais bem avaliado (CULQUIA et al., 2014; VALCANIS et al., 2015).

Shigelose é uma infecção intestinal aguda, cujos sintomas podem variar de diarreia aquosa leve a disenteria bacilar inflamatória grave, caracterizada por fortes cólicas abdominais, febre e fezes contendo sangue e muco (SCHROEDER e HILBI, 2008). A doença clínica geralmente começa dentro de 24-48 horas da ingestão de 10-100 organismos (SOUSA et al., 2013) com duração normalmente de 5 a 7 dias (TRÉPANIER et al., 2014). Shigelose geralmente é autolimitada, mas pode tornar-se risco de morte se pacientes imunocomprometidos ou se o tratamento médico adequado não estiver disponível, uma combinação de reidratação oral e antibióticos leva à rápida resolução da infecção (MANI et al., 2016; SCHROEDER e HILBI, 2008).

O uso de antibióticos pode encurtar a duração da diarreia e limitar a excreção dos micro-organismos, que de outra forma poderiam continuar a se disseminar entre as pessoas e para o meio ambiente, representando, dessa forma, mais um risco de transmissão da *Shigella* (BEYENE e TASEW, 2014). No entanto, a resistência antimicrobiana é um problema em crescimento, tornando necessário monitorar a susceptibilidade de isolados bacterianos comuns aos medicamentos usados na comunidade (BEYENE e TASEW, 2014). Dessa maneira, as orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005) é que a escolha do esquema de tratamento deve ser decidida pelo padrão de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Shigella* localmente em circulação (NIYOGI, 2005).

Desde a introdução de sulfonamidas no final de 1930, a pressão seletiva e da ampla disseminação de elementos genéticos móveis que conferem resistência aos antimicrobianos

têm forçado os médicos a procurar agentes sucessivos para o tratamento de shigelose multirresistente (OMS, 2005). Ao longo das décadas, os principais antibióticos utilizados no tratamento de infecções por *Shigella* incluíram tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprima, e ácido nalidíxico (OMS, 2005). Atualmente, a ciprofloxacina, azitromicina e ceftriaxona servem como pilares do tratamento, embora há evidência crescente a cerca da diminuição de sensibilidade ou resistência plena a esses agentes em algumas regiões (UD-DIN et al., 2013; BHATTACHARYA et al., 2014; CRUZ et al., 2014).

A multirresistência a antibióticos, mesmo os de primeira linha, de isolados clínicos, tem dificultado um tratamento efetivo onde os serviços em Saúde são deficientes, principalmente em países em desenvolvimento. Contudo, com a diminuição de opções farmacêuticas disponíveis, há uma maior necessidade de medidas preventivas, como um melhor saneamento e normas de higiene, o uso rigoroso de agentes atualmente eficazes e uma vacina licenciada segura e eficaz (KLONTZ e SINGH, 2015).

2.5- VACINA PARA *Shigella* E ANTÍGENOS CANDIDATOS A VACINA

Shigelose continua a provocar um importante impacto na saúde global e não pode ser adequadamente controlada com as medidas de prevenção e de tratamento existentes. Dessa forma, uma vacina eficaz e de baixo custo poderia complementar e acelerar a redução da doença enquanto se espera o acesso universal à melhoria de água, saneamento e higiene (MANI et al., 2016).

Uma vacina adequada para a shigelose deve cumprir certos requisitos: o sistema imune mucosal deve ser ativado e capaz de desenvolver imunidade protetora de longa duração; a vacina deve apresentar excelente relação custo-benefício, induzindo mínimo de efeitos colaterais e; a vacina deve ser simples de administrar, pois as crianças dos países em desenvolvimento serão os principais destinatários (JENNISON e VERMA, 2004).

Vários estudos têm sido voltados para o desenvolvimento de diferentes estratégias de vacina para shigelose que, mesmo havendo resultados conflitantes em relação à eficácia e segurança para o uso em seres humanos representa um progresso promissor no desenvolvimento de vacinas para *S. flexneri* (TOAPANT et al., 2014). Existe uma diversidade na construção de vacinas em desenvolvimento contra *Shigella*, incluindo vírus vivo atenuado, células inteiras mortas com formalina, glicoconjugada, subunidade, e novos antígenos vacinais, como por exemplo: proteínas do sistema de secreção do Tipo III e proteínas de membrana externa (MANI et al., 2016).

As proteínas de membrana externa ou OMPs de bactérias Gram-negativas são estruturas imunologicamente importante devido sua acessibilidade e por desenvolver mecanismos de defesa (PORE e CHAKRABARTI, 2013). Então, estas proteínas tem sido alvo como antígeno vacinal, e em pesquisas de imuno-proteômica de *S. flexneri* 2a tem demonstrado que OMPs podem ser considerados como bons candidatos a vacina (WANG et al., 2005; JENNISON et al., 2006; ZHAO et al., 2011; SUH et al., 2014).

Dente os antígenos imunodominantes na membrana externa de *Shigella flexneri* estão a OmpA (PORE e CHAKRABARTI, 2013; PORE et al., 2011) e OmpC (JARZAB et al., 2013) os quais possuem características desejadas de um candidato a vacina, pois é conservada entre as cepas e *Shigella*, possui epitopo exposto na superfície da célula, bem como capaz de evocar imunidade protetora em camundongos (JARZAB et al., 2013; PORE et al., 2011). Outro antígeno componente do pilus tipo 1 na membrana externa de um subconjunto de bactérias Gram-negativas, chamado FimH, também tem sido alvo de pesquisa como antígeno vacinal, principalmente para *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) (KARAM et al., 2016; SINGARAVELU et al., 2014) porém este antígeno também está presente em *Shigella* e ainda é pouco investigado neste gênero.

2.6- PEPTÍDEOS SINTÉTICOS E BIOINFORMÁTICA

O conceito da utilização de um antígeno conservado entre cepas de *Shigella*, como um imunógeno, para proporcionar uma proteção ampla é a base de vários novos candidatos a vacinas (BARRY et al., 2013). Dentro da abordagem de proteínas conservadas, existem vacinas confeccionadas a partir de sequências de aminoácidos dessas proteínas, que são sintetizadas em laboratório, são as vacinas de peptídeos sintéticos (KALIL et al., 2008).

Os peptídeos sintéticos que imitam epitopos, bem como anticorpos anti-peptídeo, têm muitas aplicações no diagnóstico de várias doenças humanas (GOMARA e HARO, 2007), além disso tentativas têm sido feitas para desenvolver vacinas profiláticas baseada em peptídeo sintético contra diversas infecções, como por exemplo o vírus da dengue (CHAKRABORTY et al., 2010), ebóla (KHAN et al., 2015), por estrogiloidíase (FELICIANO et al., 2016), e vacinas terapêuticas para doenças não infecciosas como câncer (DHIMAN et al., 2016).

A busca por estes peptídeos tem um caráter econômico, já que estes são mais fáceis de serem conservados, são quimicamente mais estáveis menores e mais flexíveis que uma proteína, além disto, em comparação às proteínas, sua síntese é mais barata, simples e fácil de

ser monitorada quanto à sua qualidade, além do fato de não serem infecciosos ou tóxicos (ÁVILA, 2011).

Com o avanço na área da genômica e proteômica, análises *in silico* podem ser utilizadas para avaliação, classificação e predição dos epitopos imunogênicos, para isso, os softwares de imunoinformática e bases de dados, têm sido desenvolvidos para facilitar projetos voltados para o desenvolvimento de vacinas, permitindo a análise prévia do antígeno a ser utilizado na estratégia vacinal (DAVIES e FLOWER, 2007). Dessa maneira, os imunologistas vêm adquirindo informação cada vez mais precisa sobre como os anticorpos se ligam aos antígenos.

Um epitopo de célula B é definido como uma parte de um antígeno de proteínas reconhecido por qualquer uma molécula de anticorpo específico ou do receptor de partícula de células B (PONOMARENKO e BOURNER, 2007), é formado por um segmento curto correspondente a uma sequência de aminoácidos o sendo classificado como contínuo ou descontínuo. O epitopo contínuo, também chamado sequencial ou linear, é um fragmento contínuo da sequência proteica. Já um epitopo descontínuo, igualmente chamado de epitopo conformacional, é composto de diversos fragmentos dispersos ao longo da sequência da proteína e reunidos na proximidade espacial quando a proteína é enovelada, como demonstrado na Figura 3 (GAO e KURGAN, 2014; HUANG e HONDA, 2006).

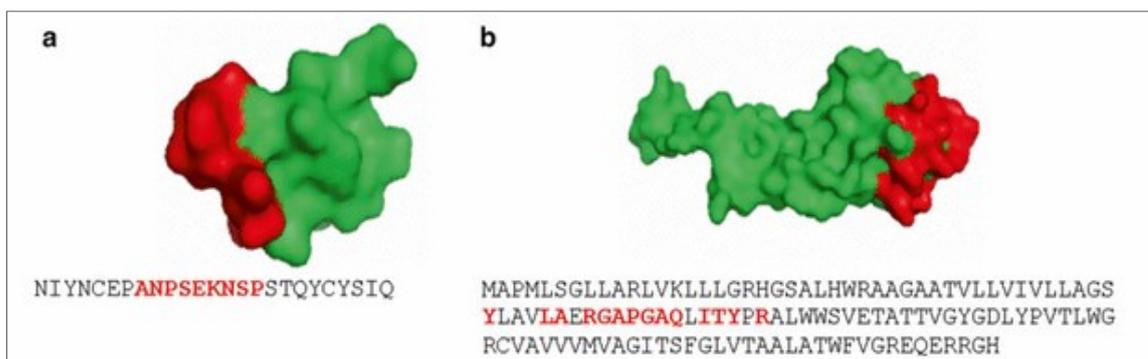


Figura 3- Exemplos de epitopos linear e conformacional. Painel (A) Apresenta um epitopo linear para linfócito-B (IEDB ID 1610831; PDB ID: 3PP4:P). Painel (B) Fornece epitopo conformacional (IEDB ID: 14362; PDB ID: 1K4D:C). As anotações de epitopos foram extraídos do Immune Epitopo Data Base (IEDB) e a estrutura foi coletada do Protein Data Bank PDB. A cor vermelha denota a localização do epitopo de célula-B na superfície do antígeno de proteína e a fonte vermelha e negrito representa o epitopo correspondente a sequência.

Fonte: GAO e KURGAN, 2014. (Adaptado)

Os métodos de predição de epitopos de células B têm sido voltados principalmente para os epitopos contínuos, com pequenas sequências de aminoácidos, e analisados quanto suas propriedades físico-químicas, tais como a hidrofiliabilidade, acessibilidade a superfície, a estrutura secundária, e outros (PONOMARENKO e BOURNER, 2007; LI et al., 2014). A identificação computacional de epitopos de células B a partir de cadeias de antígenos é um tema de pesquisa difícil e ativamente investigada, os esforços para o desenvolvimento de método para a predição de epitopos lineares estendem ao longo das últimas três décadas (GAO e KURGAN, 2014).

Os principais métodos de identificação de epitopos são: métodos imunológicos, como o método de SPOT, estudos de cristalografia de raios-X e métodos de predição computacional (ÁVILA, 2011). O método mais adequado para encontrar um epitopo é resolver a estrutura 3D do complexo Ag-Ac por cristalografia de Raios-X ou RNM (EDWARDS et al., 2000), apesar da técnica de cristalografia ser a mais eficiente na identificação de epitopos, ela é uma técnica cara, que necessita de uma grande quantidade de amostra com um alto grau de pureza, além de ser uma técnica geralmente demorada (ÁVILA, 2011).

A localização experimental dos epitopos imunogênicos é ainda hoje um processo difícil e complexo, contudo a utilização de peptídeos representativos de antígenos proteicos combinados à análise através de ferramentas de bioinformática é uma alternativa interessante e promissora (ÁVILA, 2011).

3. JUSTIFICATIVA

Shigelose é uma doença de ocorrência mundial ocasionando considerável morbidade e mortalidade infantil, principalmente em países em desenvolvimento. Antibióticos podem ser usados para o tratamento da shigelose, porém a multirresistência encontrada em isolados clínicos de *Shigella* sp. tem limitado o tratamento efetivo, sendo assim a Organização mundial de Saúde (OMS) tem dado alta prioridade para o desenvolvimento de uma vacina segura e efetiva contra esta infecção.

Apesar dos esforços para o desenvolvimento de vacina contra shigelose, até o momento não existe nenhuma disponível no mercado. Dessa maneira, considerando a necessidade de desenvolver estratégias inovadoras, a predição de epitopos imunogênicos trás novas perspectivas para a construção de vacina. A aplicação de métodos *in silico* para a predição desses epitopos oferece novas chaves para aquelas doenças para as quais não estão disponíveis vacinas, e também diminui os custos e o tempo necessário para seleção de candidatos vacinal.

A importância de selecionar os epitopos mais imunogênicos ocorre pelo fato de vacinas peptídicas de subunidade são construídas para incluir o mínimo de componentes microbianos, podendo estimular uma resposta imunitária ótima, isso também diminui o risco de estimulação de uma resposta autoimune ou outros efeitos indesejáveis devido à presença dos componentes desnecessários.

Recentemente, epitopos de proteínas de membrana externa da *S. flexneri* tem sido alvo para o desenvolvimento de vacina. Portanto, a investigação de epitopos imunogênicos da *Shigella* sp. presentes em proteínas de superfície da membrana externa, a partir da utilização de peptídeos sintéticos, pode contribuir como combate da shigelose por meio do desenvolvimento de estratégias profilática e terapêutica contra infecção pela *Shigella* sp.

4. OBJETIVOS

4.1- OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar possíveis epítopos imunogênicos provenientes de *Shigella flexneri*, que possam ser utilizados no desenvolvimento de estratégias de imunização profilática e terapêutica.

4.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Construir peptídeos sintéticos a partir de antígenos da membrana externa de *Shigella flexneri*;
- Selecionar epítopos candidatos a partir de antígenos da membrana externa de *Shigella flexneri*, com maior potencial imunogênico, para a imunização de camundongos imunocompetentes;
- Avaliar a resposta de anticorpos sistêmicos específicos nos animais imunizados contra diferentes cepas selvagens de *Shigella flexneri*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada na realização deste trabalho está representada no esquema simplificado na Figura 4 a seguir:

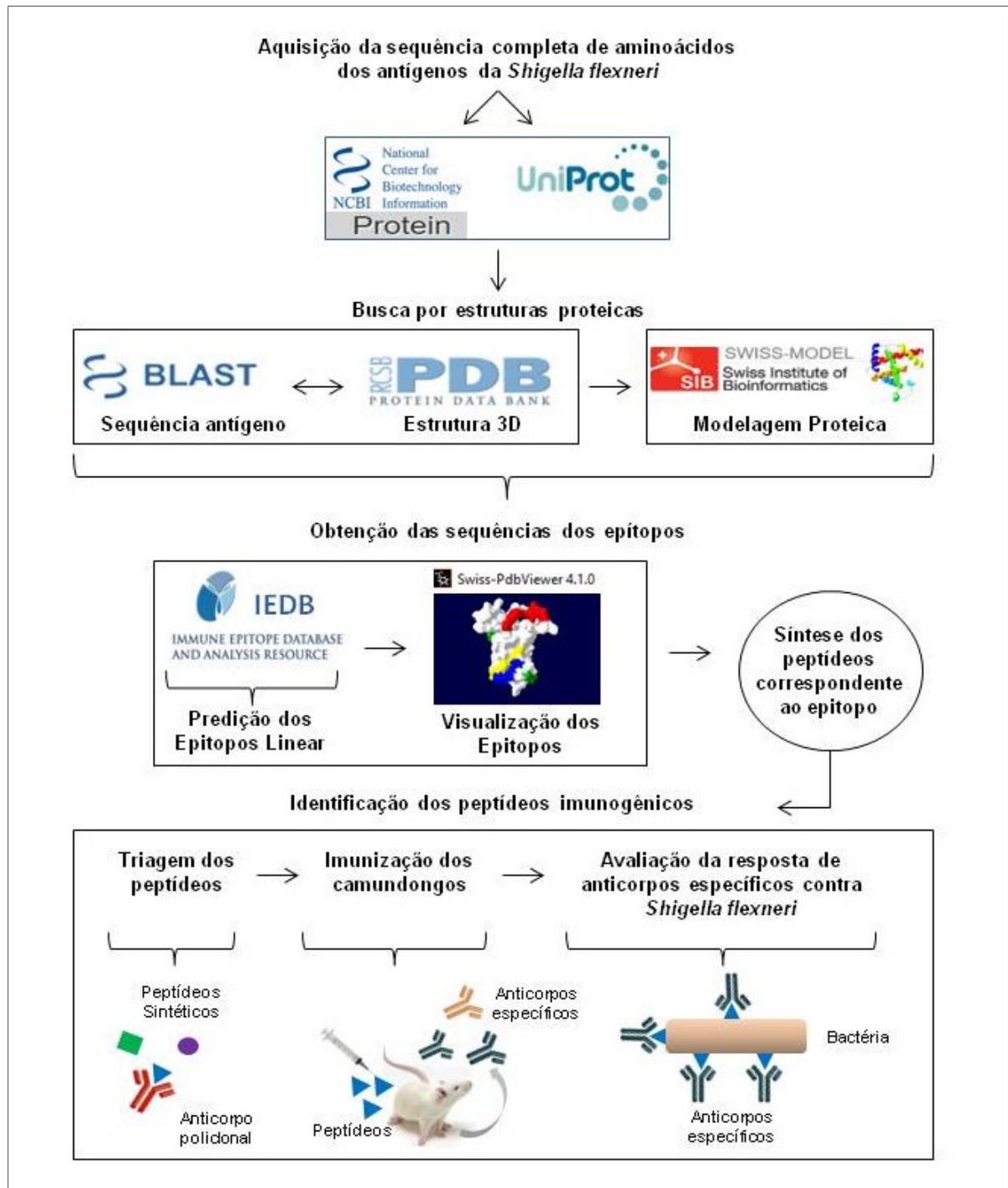


Figura 4- Esquema representativo da metodologia utilizada no trabalho.

5.1- MOLÉCULAS ALVO PARA IDENTIFICAÇÃO DOS EPITOPOS

A primeira etapa deste trabalho consistiu na aquisição das sequências de aminoácidos dos antígenos da *Shigella flexneri*, os quais foram analisados para a identificação dos epítopos imunogênicos. Foi realizada uma busca nos bancos de proteína do GenBank ou Swiss-Prot. O GenBank é um banco de dados online mantido pela National Center for Biotechnology Information (NCBI) (acessado através do endereço eletrônico <http://www.ncbi.nih.gov>) e o Swiss-Prot também é um banco de dados de proteínas no grupo Uniprot e a busca da sequência também é realizada de forma online (disponível no endereço <http://www.uniprot.org/>).

As moléculas escolhidas para este trabalho são as proteínas de membrana externa caracterizada como receptores e canais seletores de pequenas moléculas, chamadas OmpC e a OmpA e também uma proteína componente do pilus tipo 1 na membrana externa de um subconjunto de bactérias Gram-negativas chamada FimH. As sequências desses antígenos foram obtidas no formato FASTA e armazenadas no servidor local.

As informações dos antígenos OmpC, OmpA e FimH obtidas no banco de dados do Genbank, estão demonstrado na Tabela 2. Foi escolhida uma sequência para cada antígeno da espécie *Shigella flexneri*, corresponde a três cepas diferentes. Algumas informações dessas sequências também obtidas, como o comprimento da sequência de aminoácido, o código de acesso no GenBank e a cepa da bactéria.

Tabela 2- Referência do GenBank das sequências de aminoácidos dos antígenos de *Shigella flexneri*

Antígeno	Comprimento	Código de acesso	Cepa <i>Shigella</i>
OmpC	373	GenBank: 24113600	<i>Shigella flexneri</i> 2a str. 301
OmpA	348	GenBank: EID61499.1	<i>Shigella flexneri</i> 5a str. M90T
FimH	300	GenBank: ABF06190.1	<i>Shigella flexneri</i> 5 str. 8401

O antígeno OmpC de *Shigella flexneri* 2a str. 301 possui uma sequência peptídica predita em um estudo realizado anteriormente por Jarzab (2013). Este peptídeo foi sintetizado e utilizado como um controle positivo para comparação com os outros peptídeos desenhados neste trabalho. Sendo assim, a metodologia de predição de epítopos imunogênicos de *S. flexneri* foram aplicadas somente para os antígenos OmpA e FimH.

5.2- BUSCA POR ESTRUTURAS PROTEICAS

5.2.1- Análise de Similaridade

A primeira etapa para realizar a busca por estruturas das proteínas deste trabalho foi à análise de similaridade. A análise de similaridade das proteínas deste trabalho foi realizada utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que é acessado de forma online no endereço (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/>). O BLAST possui vários programas, para esta análise foi utilizado o programa BLASTp (BLAST-Protein), por onde a sequência proteica primária, fornecida pelo usuário, foi submetida e sincronizada com o banco de dados de estruturas proteicas do Protein Data Bank (PDB). O PDB é administrado pelo RCSB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics) é um banco de dados de domínio público e acessado online através do endereço eletrônico (<http://www.rcsb.org>).

O objetivo desta análise foi verificar se existe uma estrutura proteica já resolvida experimentalmente para os antígenos OmpC, OmpA e FimH da espécie *Shigella flexneri*, como não foi encontrada, foi necessário utilizar a modelagem molecular, que consiste na construção de um modelo proteico tridimensional teórico utilizando uma estrutura resolvida como molde, por esse motivo foi requerido uma análise prévia de similaridade com estruturas já depositadas no PDB.

5.2.2- Modelagem de Proteína por Homologia

A modelagem por homologia consiste em explorar similaridades estruturais entre proteínas, construindo um modelo tridimensional usando como molde uma ou mais estruturas tridimensionais proteicas já resolvidas experimentalmente. Os modelos tridimensionais de OmpA, FimH e OmpC foram construídos utilizando o programa SWISS-MODEL (BIASINI et al., 2014) que é um servidor de modelagem por homologia de estrutura da proteína totalmente automatizada, este programa está disponível online no endereço eletrônico (<http://swissmodel.expasy.org/>).

O SWISS-MODEL sincroniza a sequência primária do antígeno fornecida pelo usuário com várias estruturas proteicas depositadas no PDB, após essa análise o usuário pode escolher e fazer o download do arquivo com a estrutura teórica pronta, seguindo seus critérios, o

critério usado para escolher a estrutura tridimensional modelada dos antígenos deste trabalho foi o de maior similaridade com a estrutura molde.

O modelo de OmpA de *S. flexneri* foi construído por homologia sobrepondo estruturalmente a sequência proteica sobre a estrutura de outra proteína de membrana externa A de *Escherichia coli* utilizando seus dados de difração de raio-x (PDB: 1BXW, resolução: 2,50 Å). A modelagem do FimH de *S. flexneri* foi realizada da mesma forma, porém foi utilizado como molde os dados de difração de raio-x da FimH de *E. coli* (PDB: 4XOA, resolução de 2,54 Å) bem como sobrepondo estruturalmente a sequência proteica sobre a estrutura molde. Por fim, o modelo proteico teórico de OmpC também foi construído, usando dados de microscópio eletrônico da OmpC também de *E. coli* (PDB: 2ZLE, resolução: 28,0 Å).

Todas as estruturas modeladas foram visualizadas e gerenciadas utilizando o programa Deep View (Swiss PDB-Viewer) (SCHWEDE et al., 2003) disponível ao público para download a partir do servidor ExpASy no seguinte endereço eletrônico (<http://spdbv.vital-it.ch/disclaim.html>).

5.3- PREDIÇÕES DOS EPITOPOS

5.3.1- Predição de epitopo linear pelo IEDB

A predição dos epitopos lineares foi realizada utilizando uma ferramenta da Immune Epitope Database Analysis Resource (IEDB) (KIM et al., 2012). O IEDB organiza em um banco de dados público as sequências de epitopos de antígenos de diversos microrganismos, ele também possui outros bancos de dados relacionados.

Para a predição dos epitopos, o IEDB possui a uma coleção de ferramentas que avalia a partir da sequência primária do antígeno fornecida pelo usuário, a predição de possíveis epitopos lineares de células B, considerando os seguintes parâmetros físico-químicos: antigenicidade, hidrofiliçidade, flexibilidade, acessibilidade e beta-voltas. Esta coleção de ferramentas está disponível no seguinte endereço eletrônico (<http://tools.immuneepitope.org/bcell/>). Os parâmetros físico-químicos de avaliação escolhidos foram: acessibilidade da superfície, hidrofiliçidade e antigenicidade.

Os epitopos resultantes da predição em cada parâmetro físico-químico foram comparados e o critério usado para escolher o epitopo foi que a sequência predita tivesse valor de score próximo ao score máximo em cada um dos três parâmetros.

5.3.2- Visualização das estruturas tridimensional e epitopos preditos

A partir do conhecimento da sequência de peptídeos predito anteriormente, foi possível realizar a visualização da provável posição dos epitopos na estrutura modelo tridimensional, utilizando o programa de visualização de estruturas Swiss PDB-Viewer.

5.4- SÍNTESE QUÍMICA DOS PEPTÍDEOS

As sequências de peptídeos obtidas que correspondem aos epitopos lineares foram sintetizadas pela empresa Peptide 2.0, Chantilly, Virginia, EUA.

5.5- ANIMAIS E BACTÉRIA

Foram utilizados camundongos isogênicos 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 (INPA). Antes dos procedimentos experimentais os animais foram transferidos para a sala de experimentação e mantidos em isolamento por um período de no mínimo de duas semanas para que houvesse adaptação da microflora dos animais de acordo com o ambiente a qual estavam expostos. Durante todo o experimento, os animais foram mantidos em microisoladores autoclaváveis, e alimentados com ração e água esterilizadas (por autoclave a 121°C). Foi mantido até 3 animais por microisolador. 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 027/2014 conforme o documento no anexo 1.

A cepa de bactéria padrão utilizada nesta pesquisa foi a *Shigella flexneri* 5a M90T e também foram utilizadas 13 cepas clínicas de *Shigella flexneri*, isoladas de pacientes de hospitais da periferia de Manaus-AM coletados anteriormente em um trabalho realizado por Cruz (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.

5.6- TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS

5.6.1- Produção de anticorpos específicos IgG total contra *Shigella flexneri* 5a M90T

O anticorpo contra a bactéria *Shigella flexneri* 5a M90T foi produzido previamente. Para isso, camundongos Balb/C foram submetidos à infecção intranasal por *Shigella flexneri* 5a M90T na concentração de 1×10^8 CFU. O anticorpo produzido no soro desses animais foi usado com a finalidade de testar a imunogenicidade dos peptídeos sintéticos, utilizando o método imunoenzimático Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

5.6.2- ELISA indireto para determinação dos peptídeos mais imunogênicos

A seleção dos peptídeos sintéticos possivelmente mais imunogênicos foi realizada através da técnica de ELISA indireto. Esta técnica foi realizado em placas de microtitulação de 96 poços adsorvendo com solução de 50µL de cada peptídeo sintético, em duplicata, na concentração de 4µg/mL em tampão de sensibilização carbonato-bicarbonato (Na_2CO_3 0,2M / NaHCO_3 0,2M), a 4 °C por 18 horas. Após a sensibilização, a placa foi lavada 6 vezes com solução de lavagem PBS-Tween (PBS 1x + Tween 20 à 0,05%), e incubada com 300µL/poço de solução de bloqueio (PBS 1x + BSA 3%) por 2 horas à 37 °C em câmara úmida e escura. Após o bloqueio, a solução de bloqueio foi descartada e seguida foi adicionado 50µL/poço de soro de camundongo contendo anticopos anti-*Shigella*, produzidos previamente, diluído na concentração 1:100 em PBS 1x + BSA 3%. Após 1 hora de incubação à 37 °C em câmara úmida e escura, a placa foi lavada novamente e incubada por 1 hora com 50µL/poço de anticorpo secundário IgG anti-mouse peroxidase, diluído em 1:1000 em solução de PBS 1x + BSA 3%, também à 37 °C em câmara úmida e escura, seguida foi lavada com 6 vezes com solução de lavagem PBS-Tween. Após, adicionado 50µL/poço de substrato enzimático TMB (tetrametil benzidina) em solução de revelação (Na_2HPO_4 0,083M, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 0,036M, H_2O_2 P.A) e depois a placa foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente e câmara escura. A reação de revelação foi interrompida adicionando 30 µL/poço de solução de ácido sulfúrico 2M (H_2SO_4). A leitura foi realizada em leitor de microplaca (iMark TM, Biorad) usando o filtro de 450 nm.

Foi usado como controle negativo soro de camundongo pré-imune, ou seja, soro coletado antes da imunização. Para determinar o valor de corte entre as amostras com resultado negativo e positivo, foi calculado o valor de cut off o qual foi determinado com o

valor da média obtida nas amostras de controle negativo (soro de camundongo pré-imune) mais 2 vezes o desvio padrão.

Por meio do ELISA indireto, os peptídeos sintéticos reconhecidos pelos anticorpos anti-*Shigella* produzidos no soro dos animais infectados, foram considerados mais imunogênicos. Sendo assim, estes peptídeos reconhecidos foram selecionados para imunização de camundongos imunocompetentes.

5.7- ACOPLAMENTO DOS PEPTÍDEOS

Os peptídeos que foram mais reativos no teste de ELISA indireto foram acoplados com a proteína albumina de soro bovino (BSA) utilizando o procedimento de acoplamento de um só passo, usando o glutaraldeído como um reagente de ligação do peptídeo e o BSA de acordo com Machado-de-Ávila (2004), com modificações. A reação de acoplamento foi realizada a 4° C, 200 µg de BSA foi adicionado a uma solução de 600 µg de peptídeo em 1 mL de PBS. Em seguida, um volume igual de glutaraldeído 1% em PBS foi adicionado lentamente à solução peptídeo-BSA ao longo de uma hora, submetendo agitação constante. Após, a reação foi prosseguida durante mais uma hora a 4° C. No final da reação os peptídeos que não foram acoplados covalentemente foram removidos da mistura por diálise contra PBS 0,1X.

5.7.1- Método de Bradford para quantificação do peptídeo acoplado

Foi verificando a concentração de produto final do acoplamento realizando uma curva de calibração para a quantificação de proteínas pelo método de Bradford, utilizando BSA como referência. Este método é baseado na adsorção do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250 de Bradford (1976).

5.8- DESENHO EXPERIMENTAL E PROTOCOLO DE IMUNIZAÇÃO

A imunogenicidade propriamente dita dos peptídeos sintéticos selecionados na triagem foi avaliada quanto sua capacidade de produzir anticorpos sistêmicos, para isso foi necessário imunizar os camundongos imunocompetentes, com três doses em intervalo entre as doses de quinze dias, sendo no 1° dia, 15° dia, 30° dia, via intraperitoneal (Figura 5A). Os camundongos foram organizados em 8 grupos de 3 animais cada, como demonstrado na

Figura 5B, sendo que 7 grupos de animais foram imunizados com 200 μ L de diferentes soluções de peptídeos acoplado com BSA (peptídeo-BSA 20 μ g) diluídas em PBS 1X mais Adjuvante de Freud e 1 grupo de camundongos foi imunizado somente com BSA (BSA 20 μ g), também diluído em PBS 1X mais Adjuvante de Freud, o esquema de imunização está descrito da Tabela 3. O soro pré-imune de todos os camundongos foi coletado em 0 dia para controle negativo assim como foi coletado o soro após as imunizações em 15 dias, 30 dias e 45 dias.

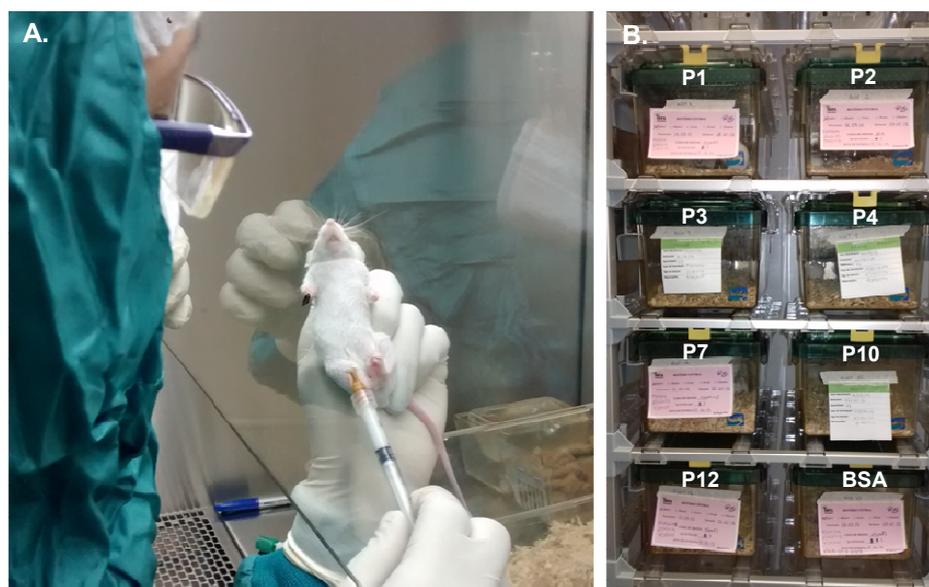


Figura 5- Demonstração da imunização dos camundongos via intraperitoneal e organização dos grupos amostrais. (A) Aplicação do imunógeno via intraperitoneal em camundongos Balb/C. (B) Organização dos grupos de camundongos (P1, P2, P3, P4, P7, P10, 12) para o ensaio de imunização com peptídeos sintéticos acoplados com BSA e grupo controle (BSA), sendo três animais por microisolador.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 3– Esquema de imunização e sangria dos camundongos

Dia	Dose	Imunização	Sangria
0	-	-	1º Soro pré-imune
1	20 µg + A. I.	1º	-
15	20 µg + A. C.	2º	2º
30	20 µg + A. C.	3º	3º
45	-	-	4º

A. I. = Adjuvante incompleto de Freud

A. C. = Adjuvante completo de Freud

As amostras sanguíneas foram coletadas por corte na calda entre as imunizações e por punção cardíaca antes dos animais serem sacrificados, o sacrifício por sua vez foi realizado por deslocamento cervical e em todos os casos os animais foram devidamente anestesiados antes da realização dos procedimentos, de acordo com o que preconiza as diretrizes estabelecidas pelo CEUA. Após a coleta, as amostras foram devidamente transportadas para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde do Instituto Leônidas & Maria Deane, Fiocruz Amazônia, onde foram processadas e acondicionadas a -20°C até serem testados para detecção de anticorpos sistêmicos específico do tipo IgG.

5.9- AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG anti-peptídeos POR ELISA INDIRETO

Os soros obtidos após as três imunizações foram avaliados quanto a produção de anticorpos IgG anti-peptídeos através da técnica de ELISA indireto seguindo o protocolo como descrito em 5.6.2., porém com algumas modificações. Como o protocolo de acoplamento de peptídeos foi utilizando BSA como molécula carreadora, anticorpos anti-BSA também foram produzidos no soro dos camundongos imunizados, então fez-se necessário adsorver o soro utilizado como anticorpo primário no teste de ELISA indireto em uma solução contendo BSA 5% diluído em PBS 1x, por 30 minutos e em constante agitação. Também foi utilizado a solução de 2% polivinilpirrolidona diluído em PBS 1x (2% PVP em PBS 1x) para a etapa de bloqueio da placa de 96 poços e para preparação da solução de

anticorpo secundário (IgG anti-mouse), dessa forma esperava-se que pudesse aumentar a especificidade da reação de ELISA.

5.9.1- Avaliação de anticorpos IgG anti-BSA presente soro dos camundongos imunizados

Para avaliar melhor os anticorpos IgG anti-BSA presente no soro dos camundongos imunizados com peptídeo-BSA foi realizado um teste de ELISA indireto para compara com o soro de camundongo imunizados somente com BSA, além do soro pré-imune. O protocolo de ELISA indireto foi realizado com a seguinte modificação: a placa de 96 poços foi sensibilizada com 50µL/poço de solução de BSA 4µg/mL diluído em solução de sensibilização carbonato-bicarbonato e prosseguiu com protocolo de acordo como descrito em 5.6.2.

5.10- AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO DOS ANTICORPOS IgG anti-peptídeos POR CITOMETRIA DE FLUXO

A produção de anticorpos contra peptídeos P1, P2, P3 e P4 no soro dos camundongos foi avaliada utilizando várias cepas selvagens de *Shigella flexneri*, o reconhecimento antígeno-anticorpo desses soros foi analisado por técnica de citometria de fluxo.

Para obter um pool de anticorpos contra os peptídeos sintetizados durante o trabalho, foi utilizado como molécula carreadora o BSA, porém, a fim de estabelecer a especificidade da ligação antígeno-anticorpo no soro dos camundongos imunizados com os peptídeos acima citados, contra proteínas nativas contidas em cepas de bactéria padrão *Shigella flexneri* 5a str. M90T foram utilizadas as técnicas de absorção em BSA para que possíveis anti-BSA sejam bloqueados nesses soros e conseqüentemente não resultarem num falso positivo. Dessa maneira, foram feitos testes de concentração de BSA para estabelecer a melhor concentração de bloqueio de possíveis anti-BSA contida nos antissoros dos camundongos imunizados, resultando na utilização em solução com BSA 5 % como melhor adsorção.

O procedimento de marcação das cepas de bactérias para a análise por citometria de fluxo foi realizado da seguinte forma: As cepas de bactéria a serem utilizadas foram pré-inoculada em meio líquido LB a 37 °C sob agitação no dia anterior e mantido por no máximo 18 horas, no dia seguinte foi reinoculada e mantida para crescimento sob as mesmas condições por no máximo 5 horas. Após o crescimento da bactéria foi realizado a leitura em

espectrofotômetro utilizando o filtro de 600nm para preparar uma suspensão de bactérias ajustando a concentração para 1×10^7 UFC/mL. Em seguida a suspensão de bactéria nessa concentração foi lavada duas vezes com PBS 1x (filtrado) centrifugando a 10000 rpm por 5 min, após foi distribuído em microtubos de 1,5mL um volume de 200 μ L dessa suspensão, centrifugado novamente e descartado o sobrenadante, após foi reservado para uso posterior. Os soros a serem utilizados neste trabalho para a pesquisa de anticorpos anti-peptídeos específicos, foram alicotados previamente e inativado incubando em banho Maria a 56 °C por 30 minutos. Após, para bloquear possíveis anti-BSA presentes nos soros testes, estes foram diluídos na concentração de 1:100 em solução de PBS 1x com BSA 5% e incubado em temperatura ambiente sob agitação constante por 30 min. Em seguida, as bactérias que foram lavadas e centrifugadas em microtubos de 1,5 mL anteriormente, foram colocadas em contato com 100 μ L da solução de soros testes e incubadas em temperatura ambiente por mais 30 minutos. Após o tempo de incubação, as bactérias foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e na última lavagem foi descartado o sobrenadante e mantido o pellet de bactérias, em seguida foi adicionado 50 μ L da solução de anticorpo secundário conjugado anti-mouse IgG Alexa flúor 488 (Invitrogen, Oregon, USA) diluído em PBS 1x na concentração de 1:400, depois foi incubado por 30 minutos no escuro. Após, as bactérias foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e ressuspensa em 200 μ L de PBS 1x novamente, transferida para tubos de citometria e por fim estava pronta para leitura por citometro de fluxo.

A capacidade opsonizante dos anticorpos IgG anti-peptídeos foi avaliada pelo equipamento citometro de fluxo FACS canto II da Plataforma de Citometria de fluxo do Instituto Leônidas e Maria Deane FIOCRUZ-AM utilizando os programas FACS Diva softwer versão 6.1.2, para obtenção dos dados brutos e a análise de porcentagem de eventos, média de intensidade de fluorescência e a formatação dos gráficos de citometria, foi utilizado o programa Flow-Jo versão 5.6.7.

As análises morfométricas como o Tamanho (FSC) e a Complexidade (SSC) das amostras de *Shigella* sp. onde se pode construir a 'Gate' de seleção para as análises de fluorescência está demonstrada na Figura 6A. A determinação das porcentagens de cepas de *Shigella* sp. reconhecidas por anticorpos contra peptídeos P1, P2, P3, e P4 foi feito utilizando Anti-IgG Mouse conjugado Alexa flúor 488 onde foram utilizados os parâmetros de Tamanho e Fluorescência no canal FL-1 (FITC) e através desses parâmetros pode-se comparar aos controles contra a cepa padrão e os isolados selvagens (Figura 6B). A média de intensidade de fluorescência foi determinada pela análise do gráfico em histograma (Figura 6C) onde foi

calculada através do programa de citometria a média de deslocamento dos picos de fluorescência de cada amostra de anti-peptídeo.

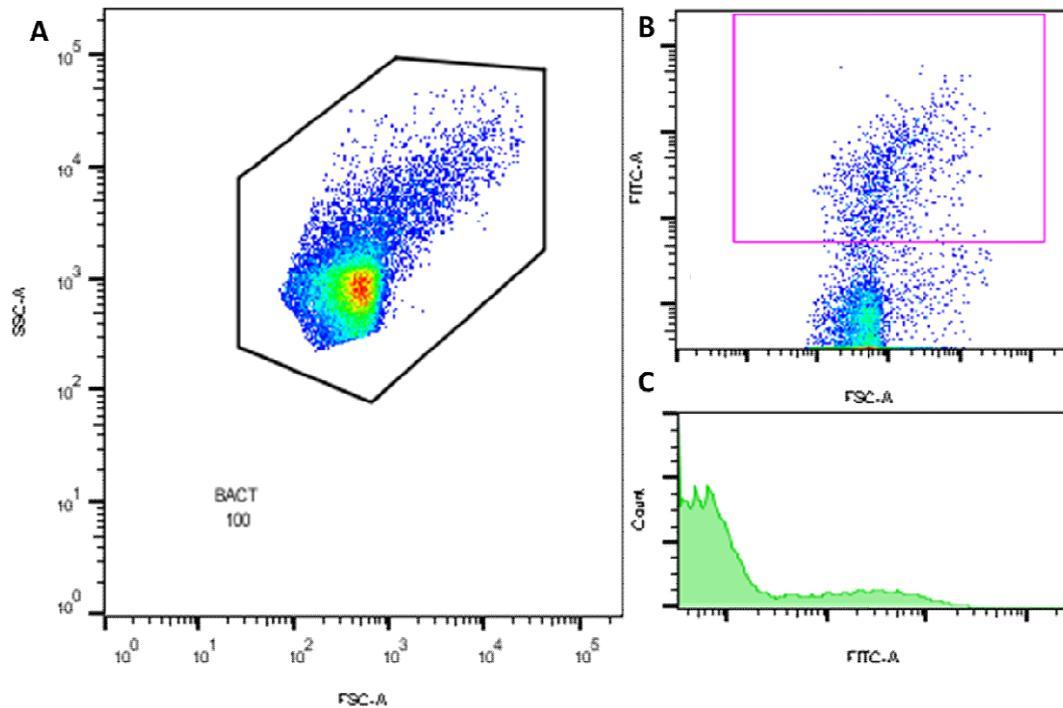


Figura 6- Avaliação do reconhecimento de anticorpos anti-peptídeos contra proteínas nativas em amostras de diferentes isolados de *Shigella* por Citometria de Fluxo. (A) Análise por tamanho (FSC) e complexidade (SSC) das amostras de *Shigella* por citometria de Fluxo, (B) Avaliação da porcentagem de marcação de Anti-Mouse Alexa Fluor 488 das amostras de soro contra peptídeos nativos, (C) histograma da media de intensidade de fluorescência - MIF.

Também foi determinado um valor de corte (cut off) entre as amostras com resultado negativo e positivo, utilizando os resultados de antissoros pré-imune e anti-BSA como controle negativo para o cálculo de Index de reconhecimento, o qual consiste no seguinte:

- Index de reconhecimento = (Index de fluorescência da amostra) – (cut off);
- Index de fluorescência = (Mediana da intensidade de fluorescência - MIF) x (porcentagem de células bacterianas marcadas).
- Cut off = (Média entre o Index de fluorescência do antissoros anti-BSA e antissoros pré-imune) + (2 vezes o desvio padrão).

5.11- ANÁLISE ESTATÍSTICA

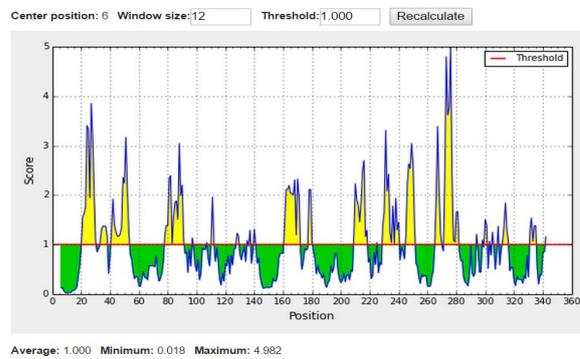
A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software Graph Pad Prism 5.0. A diferença entre os grupos de testes foram analisados por métodos de análise descritiva de variáveis, como média, desvio padrão, coeficiente de variação, análise de variação (ANOVA). Os resultados paramétricos foram submetidos ao teste t e os resultados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal Wallis. As diferenças obtidas foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

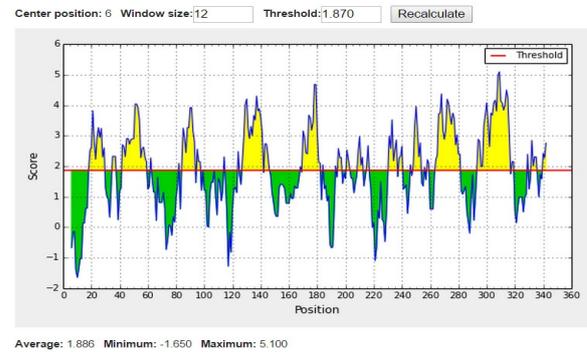
6.1- PREDIÇÃO DE EPITOPOS LINEARES

Os epítopos lineares dos antígenos OmpA e FimH foram preditos. Na Figura 7 está representada de forma gráfica a predição do antígeno OmpA de *Shigella flexneri* 5a str. M90T, avaliados com base em três parâmetros físico-químicos.

A. Predição de Acessibilidade na superfície (Emini)



B. Predição de Hidrofilicidade (Parker)



C. Predição de Antigenicidade (Kolaskar&Tongaonkar)

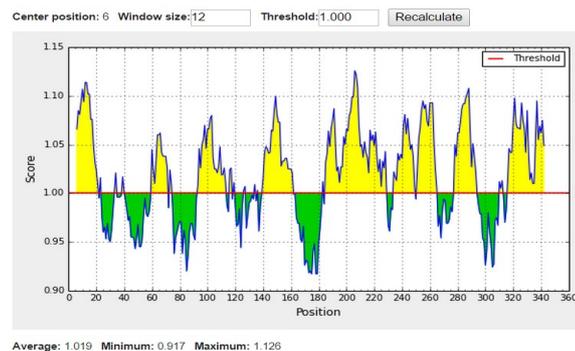
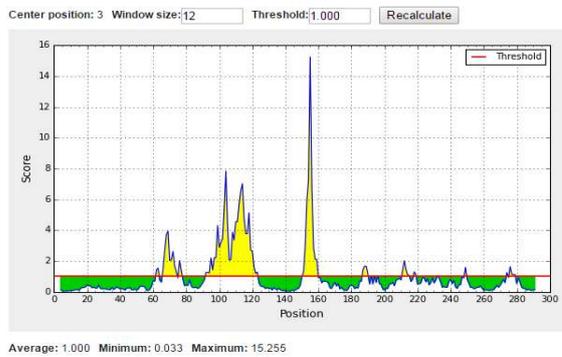


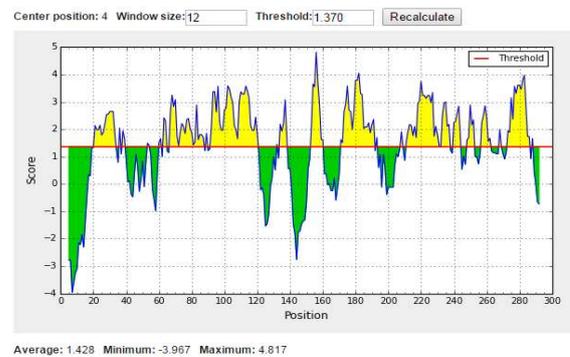
Figura 7- Relatório gráfico do programa IEDB para avaliação e predição de epítopos lineares de célula B do antígeno OmpA de *Shigella flexneri* 5a str. M90T. Três parâmetros físico-químico foram utilizados: (A) Predição de acessibilidade da superfície, (B) Predição de hidrofilicidade e (C) Predição de antigenicidade. Os picos na cor amarela correspondem à previsão da posição dos epítopos na proteína que está indicada no eixo x, e o score mínimo e máximo obtido na predição de cada epítopo está indicado no eixo y.

A predição do antígeno FimH de *Shigella flexneri* 5 str. 8401 está representada de forma gráfica na Figura 8 abaixo:

A. Predição de Acessibilidade na superfície (Emini)



B. Predição de Hidrofilicidade (Parker)



C. Predição de Antigenicidade (Kolaskar&Tongaonkar)

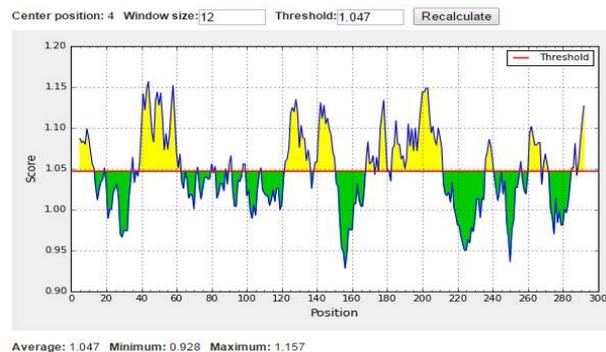


Figura 8- Relatório gráfico do programa IEDB para avaliação e predição de epitopos lineares de célula B do antígeno FimH de *Shigella flexneri* 5 str. 8401. Três parâmetros físico-químicos foram utilizados: (A) Predição de acessibilidade da superfície, (B) Predição de hidrofilicidade e (C) Predição de antigenicidade. Os picos da cor amarela correspondem à previsão da posição dos epitopos na proteína que está indicada no eixo x, e o score mínimo e máximo obtido na predição de cada epitopo está indicado no eixo y.

As sequências dos epitopos escolhidos para OmpA e FimH estão descritas na Tabela 4. A predição dos epitopos lineares resultou em 11 sequências peptídicas, o tamanho destas sequências variou de 6 a 13 aminoácidos, outras informações destas sequências também foram obtidas, como a posição do epitopo na sequência da proteína, peso molecular (P.M.) e a carga atribuída. Com exceção do peptídeo P1 do antígeno OmpC, este não foi submetido a predição pelo IEDB neste trabalho, esta sequência peptídica foi predita em um estudo

realizado anteriormente por Jarzab (2013). Por fim, todos os peptídeos foram sintetizados para posteriores testes de imunogenicidade, acoplamento e imunização em camundongos.

Tabela 4- Informações das sequências peptídicas preditas pela ferramenta IEDB correspondentes aos epitopos 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

A Tabela 5 mostra os resultados da análise dos parâmetros físico-químicos na predição dos epitopos de OmpA e FimH, foi possível atribuir três níveis de acessibilidade, hidrofiliicidade e antigenicidade dos epitopos, estes atributos foram alta, média e baixa.

Tabela 5- Análise da estrutura e parâmetro físico-químicos na predição dos epitopos lineares

Peptídeo	Posição	Acessibilidade	Hidrofiliicidade	Antigenicidade
P2	19-30	Alta	Média	Baixa
P3	59-69	Baixa	Baixa	Média
P4	83-95	Média	Alta	Baixa
P5	142-159	Baixa	Baixa	Alta
P6	107-117	Baixa	Baixa	Alta
P7	82-91	Baixa	Média	Baixa
P8	95-104	Média	Alta	Baixa
P9	133-140	Baixa	Média	Alta
P10	156-161	Alta	Alta	Baixa
P11	171-180	Baixa	Alta	Média
P12	260-269	Baixa	Média	Média

6.2- MODELAGEM MOLECULAR

Os modelos moleculares de OmpC, OmpA e FimH foram construídos. Na Figura 9, podemos observar um relatório gráfico do SWISS-MODEL na versão web referente à construção do modelo estrutural teórico de OmpA. Algumas informações foram obtidas na construção do modelo, sendo que dois modelos foram construídos com sucesso, porém somente um foi escolhido, e o critério de escolha do modelo foi o de maior similaridade com a estrutura molde.

Na Figura 9A, podemos observar que a estrutura molde utilizada na construção do modelo foi a da proteína de membrana externa A de *Escherichia coli* (PDB: 1BXW, resolução: 2,50 Å) obtendo 92,94 % de identidade e também foi calculado pelo programa um valor de similaridade (0,60). Em relação ao alinhamento da sequência de entrada com a sequência do molde, observa-se na Figura 9B que aquela abrange mais a porção N-terminal.

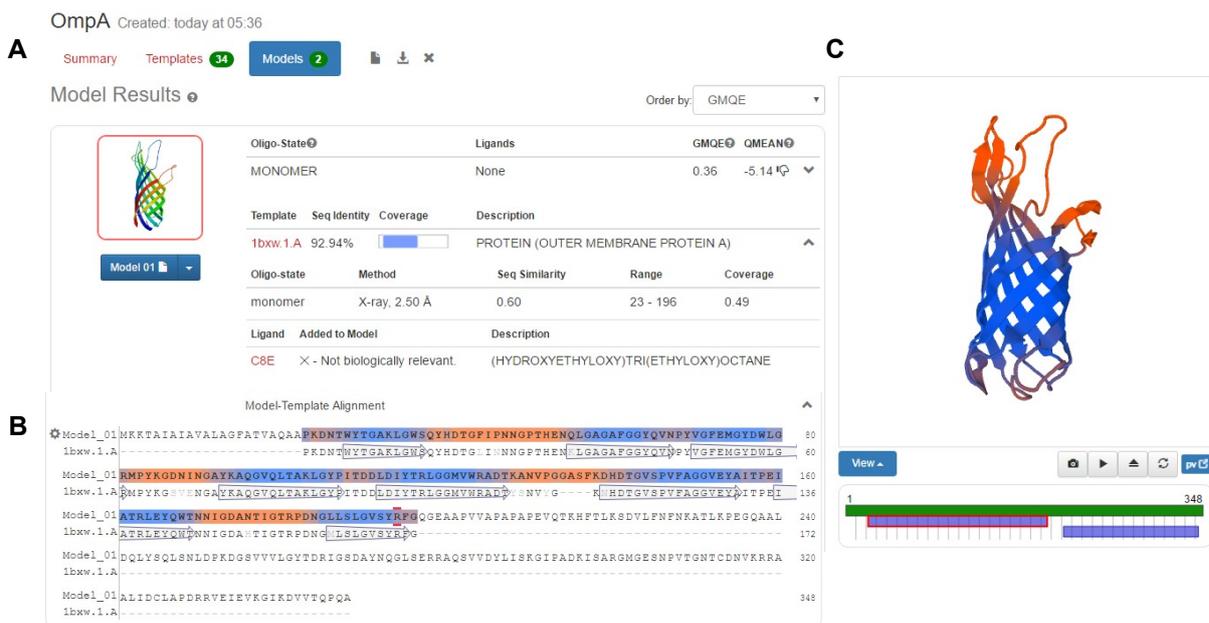


Figura 9- Relatório gráfico do SWISS-MODEL na versão web gerados na construção automática do modelo estrutural de OmpA de *S. flexneri*. (A) Dados obtidos na construção do modelo (B) Alinhamento entre a sequência primária de OmpA e a sequência da estrutura molde (C) Pré-visualização do modelo construído para OmpA e as regiões de cor laranja são consideradas de maior acessibilidade ao solvente.

Conseqüente, na Figura 9C obteve-se a pré-visualização do modelo construído, as regiões de cor laranja na pré-visualização do modelo construído, as regiões correspondem às sequências de

aminoácidos também em com laranja na Figura 9B, com isso pode-se inferir que estas regiões com acessibilidade ao solvente são mais expostas na superfície da membrana, onde a OmpA está localizada, e podem ser potenciais epítopos de célula B.

A Figura 10, por sua vez, apresenta o relatório gráfico da construção do modelo estrutural para o antígeno FimH, que também foi construído da mesma forma seguindo os mesmos critérios. A estrutura molde utilizada para a construção desse modelo foi da FimH de *Escherichia coli* (PDB: 4XOA, resolução de 2,54 Å), obtendo 100% de identidade e atingiu uma ampla cobertura no alinhamento entre as sequências da estrutura modelo e molde, e por fim, o valor de similaridade calculado pelo programa foi de 0,61. Na Figura 10C também foi possível observar a pré-visualização do modelo construído.

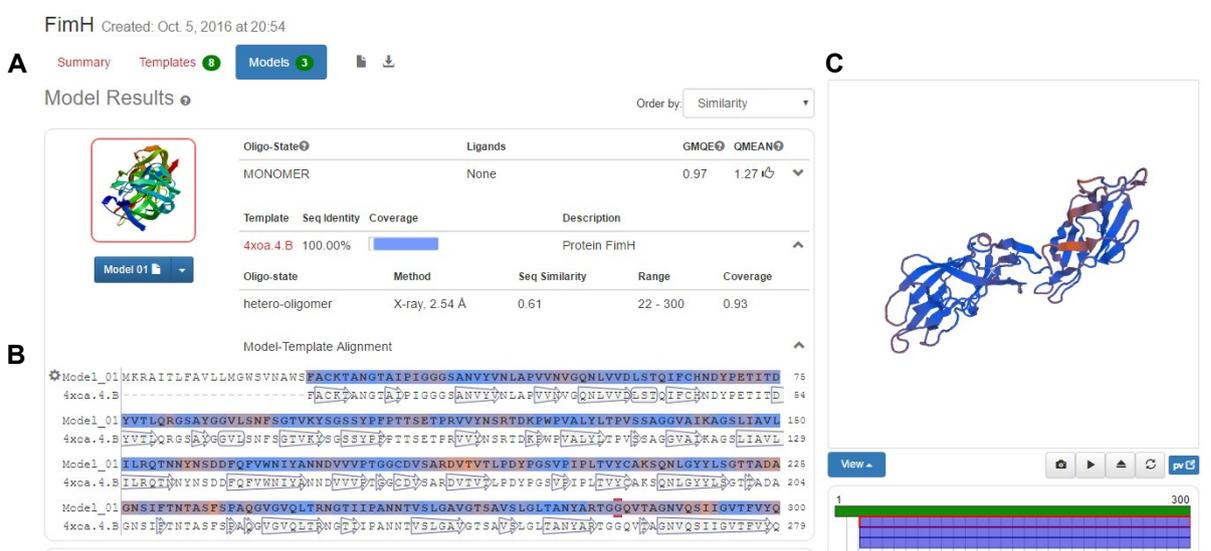


Figura 10- Relatório gráfico do SWISS-MODEL na versão web gerados na construção automática do modelo estrutural de FimH de *S. flexneri*. (A) Dados obtidos na construção do modelo (B) Alinhamento entre a sequência primária de FimH e a sequência da estrutura molde (C) Pré-visualização do modelo construído para FimH e as regiões de cor laranja são consideradas de maior acessibilidade ao solvente.

O modelo proteico de OmpC também foi construído (Figura 11), porém foi usando dados de microscópio eletrônico da estrutura da proteína de membrana externa C de *E. coli* (PDB: 2ZLE, resolução: 28,0 Å), obteve 95,56% de identidade e valor de similaridade de 0,61 calculado pelo programa.

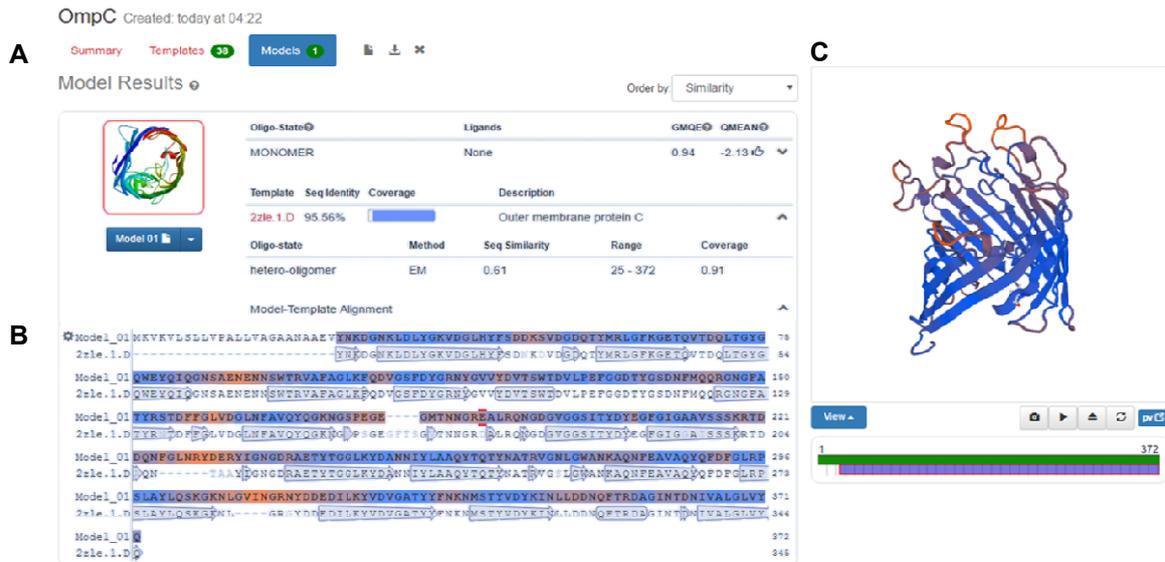


Figura 11- Relatório gráfico do SWISS-MODEL na versão web gerados na construção automática do modelo estrutural de OmpC de *S. flexneri*. (A) Dados obtidos na construção do modelo (B) Alinhamento entre a sequência primária de OmpC e a sequência da estrutura molde (C) Pré-visualização do modelo construído para OmpC e as regiões de cor laranja são consideradas de maior acessibilidade ao solvente.

6.3- VISUALIZAÇÃO DOS EPITOPOS LINEARES

A posição de cada epitopo predito pode ser visualizada no modelo tridimensional construído anteriormente. Nas Figuras 12, 13 e 14 a seguir pode-se observar a previsão da posição do epitopo correspondendo a cada sequência peptídica dos antígenos OmpC, OmpA e FimH respectivamente.

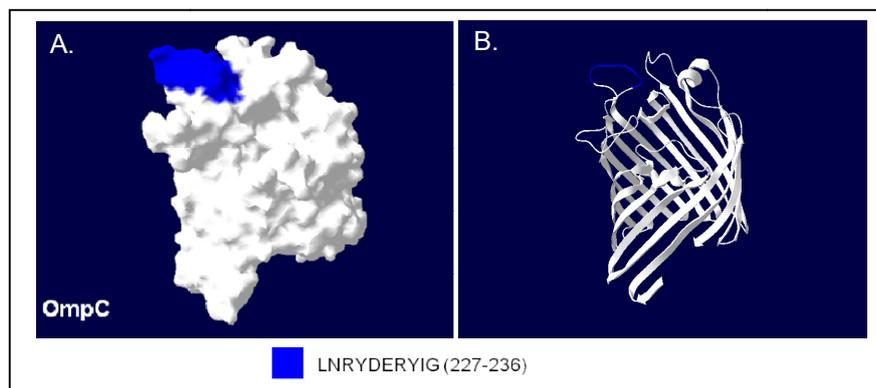


Figura 12- Visualização da previsão da posição epitopo de OmpC no modelo tridimensional da *Shigella flexneri* 2a str. 301 no programa Swiss PDB-Viewer. A região destacada em azul corresponde ao epitopo P1, predito anteriormente por Jarzab (2013). Este peptídeo foi utilizado para comparação com os epitopos preditos neste trabalho, assim como um possível controle positivo. (A) Visualização da posição do epitopo correspondente ao peptídeo P1 na superfície da OmpC. (B) Demonstração na forma de fita da estrutura da proteína OmpC bem como do epitopo P1.

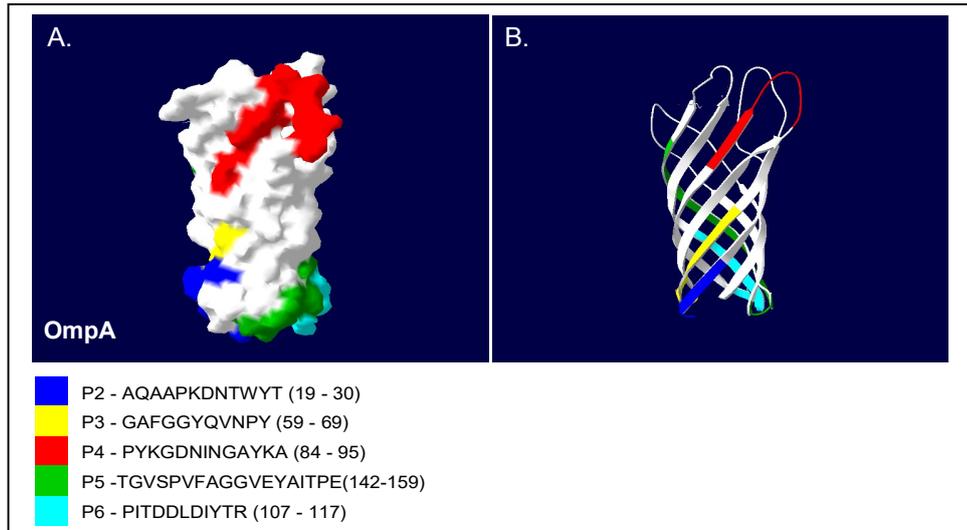


Figura 13– Visualização da previsão da posição epitopo de OmpA no modelo tridimensional da *Shigella flexneri* 5a str. M90T no programa Swiss PDB-Viewer. (A) Visualização da posição dos epitopos correspondentes aos peptídeos P2 ao P6 na superfície da OmpA. (B) Demonstração na forma de fita da estrutura da proteína OmpA bem como dos epitopos correspondentes aos peptídeos P2 ao P7.

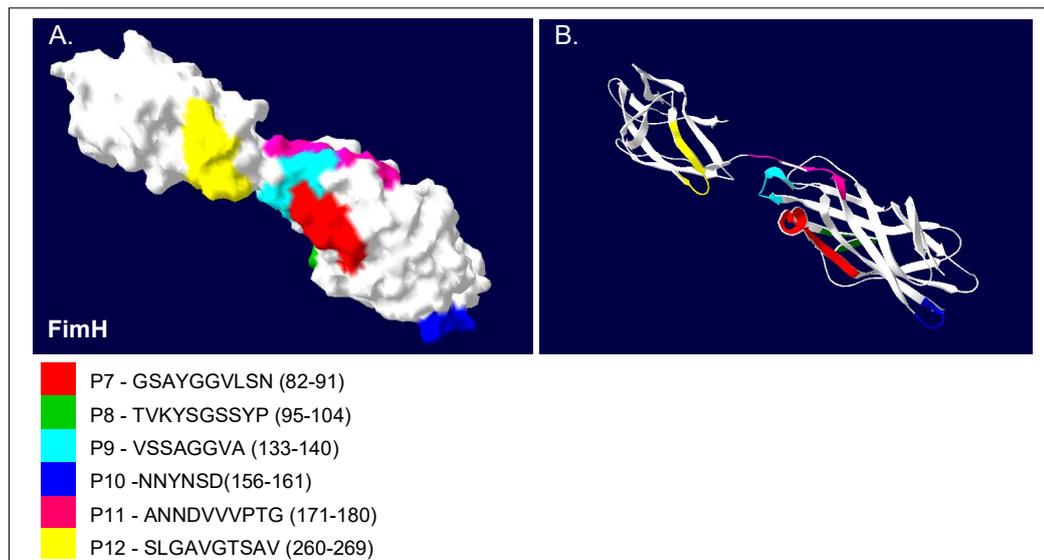


Figura 14- Previsão da posição dos epitopos no modelo construído para o antígeno FimH da *Shigella flexneri* 5 str. 8401 através do programa Swiss PDB-Viewer. (A) Visualização da posição dos epitopos correspondentes aos peptídeos P7 ao P12 na superfície do FimH. (B) Demonstração na forma de fita da estrutura da proteína FimH bem como dos epitopos correspondentes aos peptídeos P7 ao P12.

6.4- TRIAGEM DOS PEPTÍDEOS

A imunogenicidade dos peptídeos foi testada. Anticorpos anti-*Shigella* produzidos no soro de camundongos infectados por *Shigella flexneri* str. M90T foram testados frente aos peptídeos sintéticos. Foram utilizados dois antissoros anti-*Shigella* de camundongos que foram submetidos à infecção intranasal previamente, para realizar o teste em replica. Entre os peptídeos testados, os mais reativos foram: P1 (OmpC); P2, P3 e P4 (OmpA); e P7, P10 e P12 (FimH) conforme demonstrado no Tabela 6. Estes peptídeos sintéticos foram possivelmente imunogênicos, ou seja, foram capazes de serem reconhecidos por anticorpos anti-*Shigella* presente no antissoro dos camundongos.

Tabela 6– ELISA anti-mouse IgG anti-*Shigella* para triagem dos peptídeos sintéticos

	OmpC	OmpA					FimH					
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Soro 1	■	■	■	■	□	□	■	□	□	■	□	■
Soro 2	□	□	□	□	□	□	■	□	□	■	□	■

■ Positivo
 □ Negativo

Para determinar os resultados negativos e positivos da Tabela 6 foi calculado o valor de corte (cut off) o qual foi obtido a partir da média das amostras de controle negativo (antissoro de camundongo pré-imune) mais 2 vezes o desvio padrão.

6.5- AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-MOUSE IgG ANTI-PEPTÍDEOS POR ELISA INDIRETO

6.5.1- Detecção de anticorpos anti-peptídeos no soro de camundongos

O protocolo de ELISA indireto foi otimizado visando obter um protocolo capaz de detectar diferença entre a D.O. dos soros positivos e soros controles, além de minimizar reações inespecíficas. Os resultados da padronização estão na Figura 15 e 16. Os animais que receberam P1, P2, P3 e P4 produziram níveis significativos de anti-P1, anti-P2, anti-P3 e anti-P4 respectivamente (Figura 15) quando comparados com os animais que receberam P7, P10 e P12 (Figura 16).

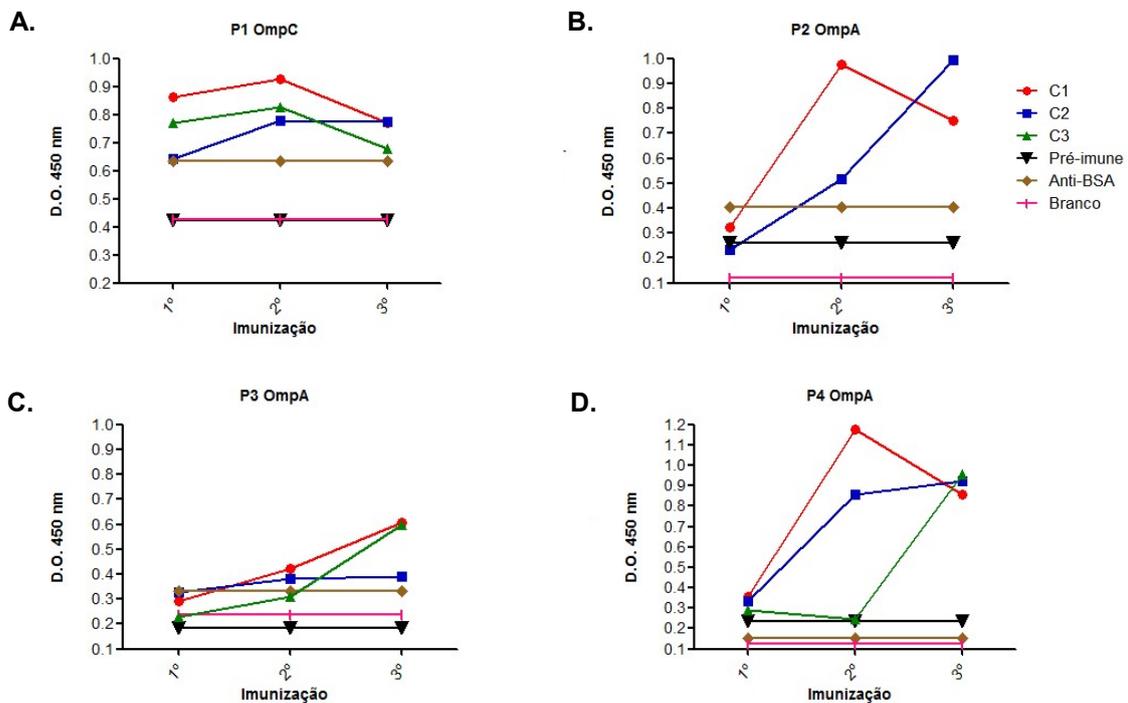


Figura 15– ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das três imunizações com os peptídeos sintéticos (P1, P2, P3 e P4). C1= camundongo 1, C2= camundongo 2 e C3= camundongo 3. Controles: antissoro pré-imune, antissoro anti-BSA ambos de camundongo e branco. O ensaio de ELISA foi realizado utilizando solução de PVP 2% em PBS 1x para bloqueio da placa de ELISA e para diluição dos anticorpos secundário conjugado anti-mouse IgG (1:100) e também foi utilizado solução BSA 5% em PBS 1x para adsorção de anti-BSA presente nos antissoros testados.

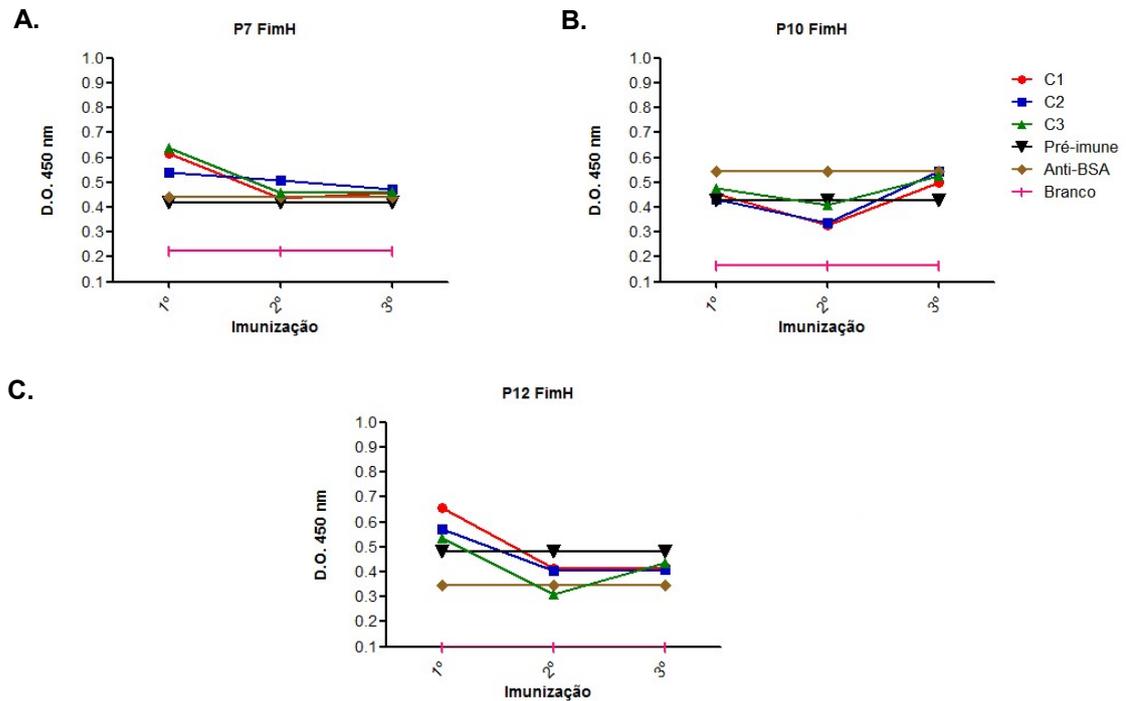


Figura 16- ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das três imunizações com os peptídeos sintéticos (P7, P10, P12). C1= camundongo 1, C2= camundongo 2 e C3= camundongo 3. Controles: antissoro pré-imune, antissoro anti-BSA ambos de camundongo e branco. O ensaio de ELISA foi realizado adsorvendo o anticorpo primário com BSA 5%.

De acordo com estes resultados, o antissoro P1 (camundongo 2), P2 (camundongo 2), P3 (camundongos 1) e P4 (camundongo 3) da terceira imunização obtiveram melhor resultado de absorvância (D.O.) em relação aos resultados da imunização com os peptídeos do antígeno FimH. Dessa maneira os antissoros de P1, P2, P3 e P4 foram escolhidos para avaliação de anticorpos sistêmicos específicos contra diferentes isolados selvagens de *Shigella flexneri*.

6.5.2- Detecção de anticorpos anti-BSA no antissoro de camundongos imunizados

Os anticorpos IgG anti-BSA presente nos antíssoros de camundongos imunizados com P1, P2, P3 e P4 após a terceira imunização foram avaliados, uma vez que todos os peptídeos usados como imunógenos foram acoplados na molécula carreadora BSA. De acordo com Figura 17 foi observado que o antíssoro pré-imune do camundongo apresenta uma atividade basal de anti-BSA e vai diminuindo conforme a titulação do soro vai diminuindo. Também foi observado que os antíssoros de camundongos imunizados com peptídeo acoplado com BSA possuem uma concentração de anti-BSA próxima ao do antíssoro do camundongo imunizado somente com BSA. Sendo assim, pode-se considerar que a concentração de anti-BSA em todos os antíssoros anti-peptídeos são equivalentes quando comparada ao antíssoro anti-BSA, porém para conseguir especificidade do antíssoro anti-peptídeo no reconhecimento dos peptídeos ou os epitópos correspondente na proteína nativa foi realizado a adsorção dos antíssoros com BSA 5%.

Elisa anti-mouse IgG anti-BSA dos antíssoros anti-peptídeos

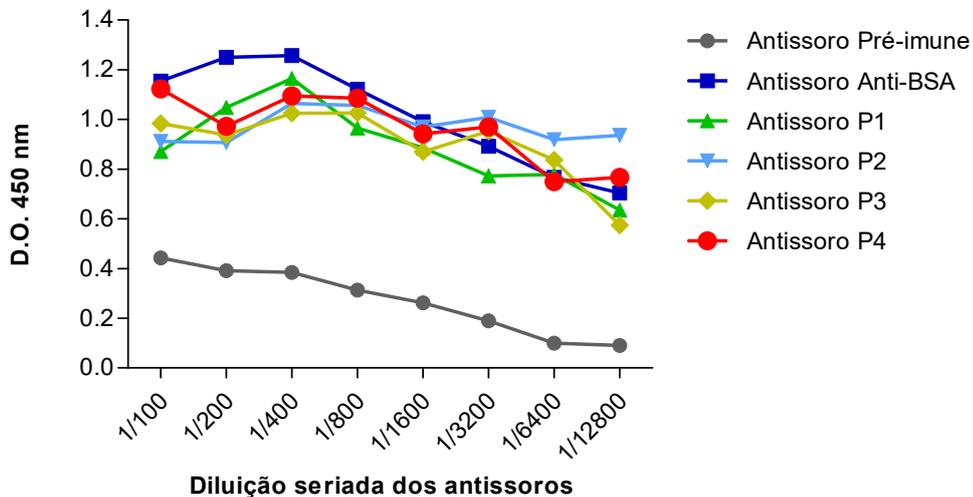


Figura 17- ELISA anti-mouse IgG anti-BSA da terceira imunização com antíssoros P1, P2, P3 e P4 contra BSA em diluição seriada. As amostras controles utilizadas foram antíssoro de camundongo pré-imune e antíssoro anti-BSA.

6.6- AVALIAÇÃO DO RECONHECIMENTO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-MOUSE IgG ANTI-PEPTÍDEOS POR *Shigella flexneri* ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO

O protocolo de citometria de fluxo também foi otimizado visando obter um protocolo capaz de diferenciar amostras positivas e negativas, além de minimizar reações inespecíficas. Os antissoros que foram adsorvidos com BSA 5% foram comparados com os mesmos antissoros não adsorvidos, o resultado está apresentado na Figura 18. Estes resultados mostraram, de modo geral, que a adsorção do anti-BSA presente no antissoro dos camundongos imunizados diminui a reatividade contra *S. flexneri* 5a str. M90T quando comparado ao mesmo soro que não foi adsorvido. Também se pode observar que a adsorção do antissoro anti-BSA conseguiu equiparar-se ao antissoro pré-imune. Sendo assim, inferiu-se que a adsorção pode contribuir para o aumento da especificidade dos antissoros anti-peptídeos no reconhecimento pelos epitopos da proteína nativa presente na bactéria padrão para qual o peptídeos foram preditos.

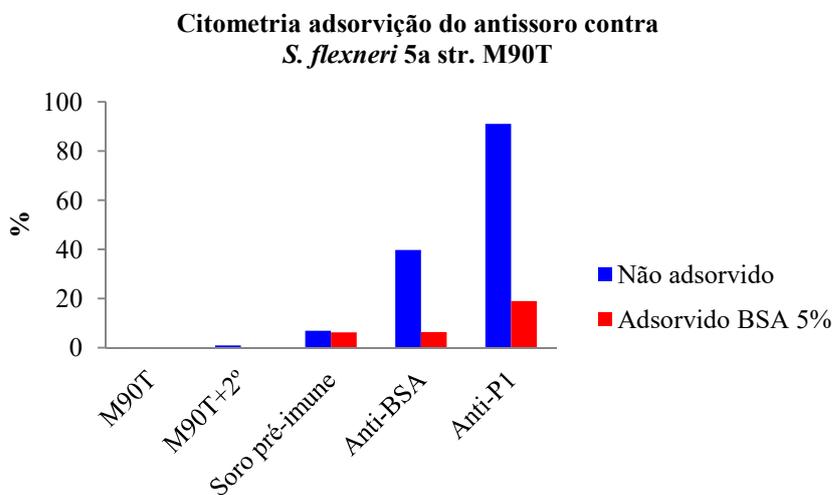


Figura 18- Padronização Citometria anti-mouse IgG antissoros para teste de adsorção com BSA 5 %. As amostras controles utilizadas foram: somente bactéria (*S. flexneri* 5a str. M90T), bactéria mais anticorpo secundário (M90T+2°), antissoro pré-imune e antissoro anti-BSA. O antissoro P1 foi utilizado como amostra positiva, pois o peptídeo P1 foi descrito anteriormente por Jarzab (2013) como um epitopo de célula B do antígeno OmpC. O anticorpo secundário utilizado foi Alexia 488 (Invitrogen) concentração 1:400 e os antissoros na concentração de 1:100.

A resposta de anticorpos sistêmicos específicos anti-peptídeo P1, P2, P3 e P4 foi avaliada contra vários isolados selvagens de *Shigella flexneri*. A Figura 19 mostra o nível de reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse anti-peptídeos P1, P2, P3 e P4 pelos seus epítopos correspondentes presentes na cepa padrão (M90T) e em 13 isolados selvagens de *S. flexneri*. Dentre todas as cepas testadas houve reconhecimento em 85,7 % (12/14) e entre as cepas selvagens houve 92,3 % (12/13). As cepas padrão M90T e 16 foram as que não atingiram algum nível de reconhecimento suficiente por nenhum dos antissoros anti-peptídeos.

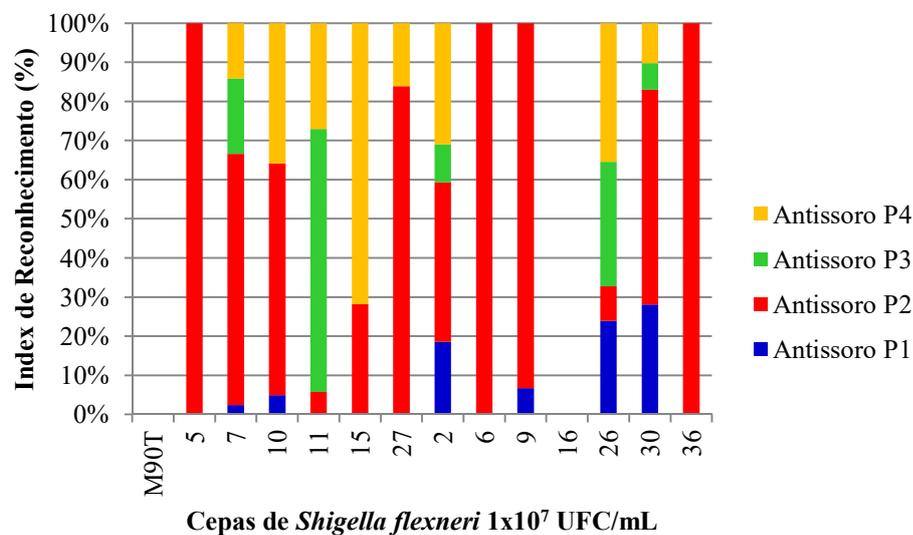


Figura 19- Citometria de fluxo do reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse antissoros P1, P2, P3 e P4 contra várias isolados selvagens de *Shigella flexneri*. O anticorpo secundário utilizado foi Alexa Flúor 488 (Invitrogen) concentração 1:400. As barras indicam o Índice de reconhecimento obtido através do cálculo de Índice de fluorescência menos o valor de cut off.

A Figura 20 apresenta separadamente os resultados do index de reconhecimento dos epitopos pelos anti-peptídeos em 13 cepas selvagens de *S. flexneri*. O antissoro anti-peptídeo que reconheceu o maior número de cepas foi pelo antissoro P2 com 92,3 % (12/13), seguido por antissoro P4 com 61,5 % (8/13), antissoro P1 com 46,2 % (6/13) e antissoro P3 com percentual de reconhecimento de 38,5 % (5/13).

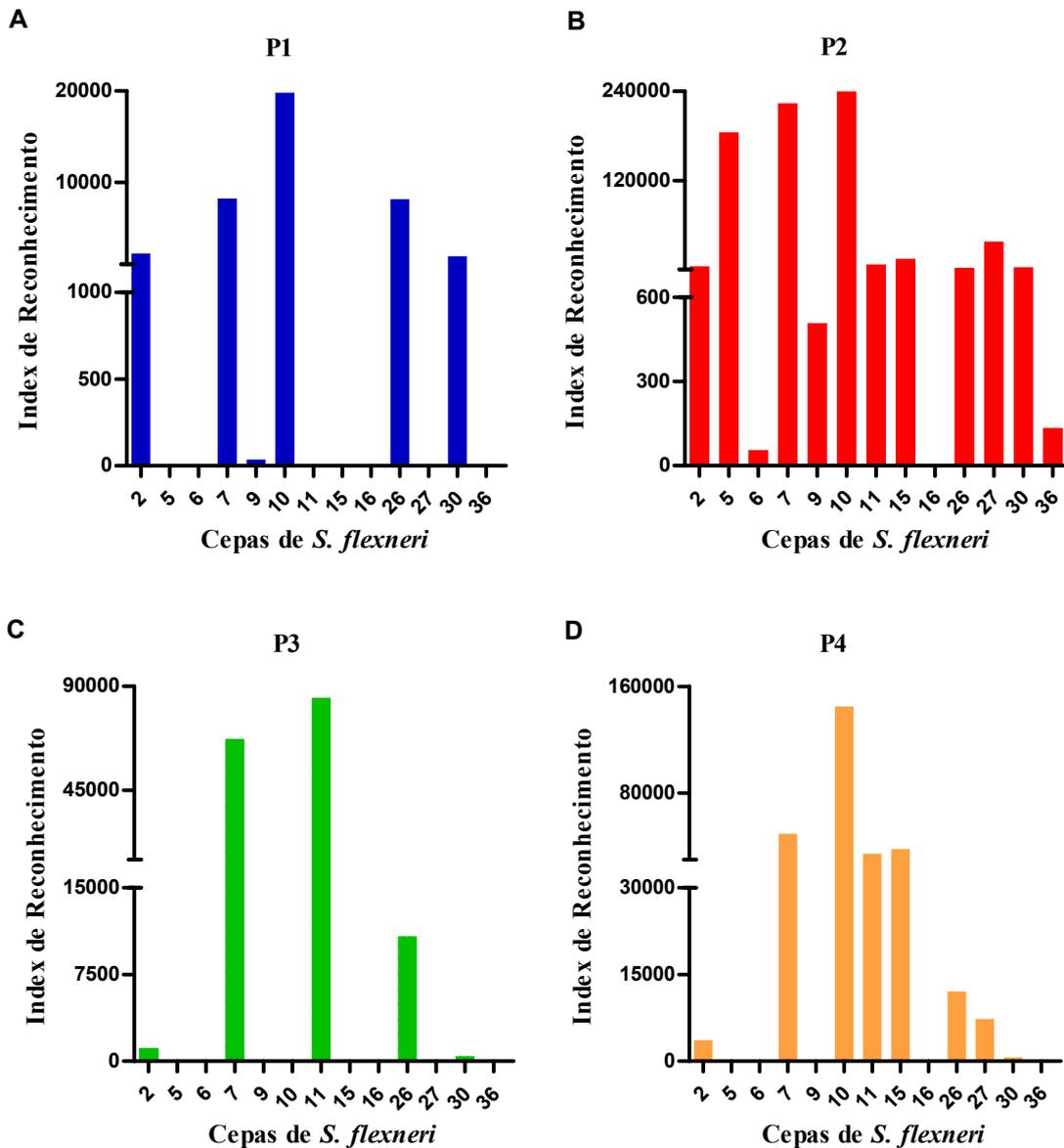


Figura 20- Nível de reconhecimento dos anticorpos IgG anti-mouse antissoros P1, P2, P3 e P4 pelos epitopos correspondentes presentes em diferentes cepas selvagens de *Shigella flexneri* através de citometria de fluxo. As barras indicam o valor de Index de reconhecimento obtido através do cálculo de Index de fluorescência menos o valor de cut off.

A partir do index de reconhecimento dos antissoros anti-peptídeos por diferentes cepas de *S. flexneri* foi possível avaliar o nível de imunodominância dos epitopos P1 (OmpC), P2, P3 e P4 (OmpA). Na Figura 21, as diferenças da análise de variação do index de reconhecimento dos epitopos P1, P2, P3 e P4 apresentou um nível de significância com valor $P < 0,0422$ (teste Kruskal-Wallis 8,191). O epitopo P2 demonstrou ser mais imunodominante entre os epitopos avaliados e diferenças estatisticamente significativa também foram observadas entre o epitopo P1 e P2 com valor de $P < 0,0155$ (teste T), esta comparação entre P1 e P2 foi realizada, pois o peptídeo P1 foi predito e avaliado anteriormente por Jarzab (2013) como um possível epitopo de célula B do antígeno OmpC de *S. flexneri* 2a str. 301 e neste trabalho foi utilizado para comparação dos resultados.

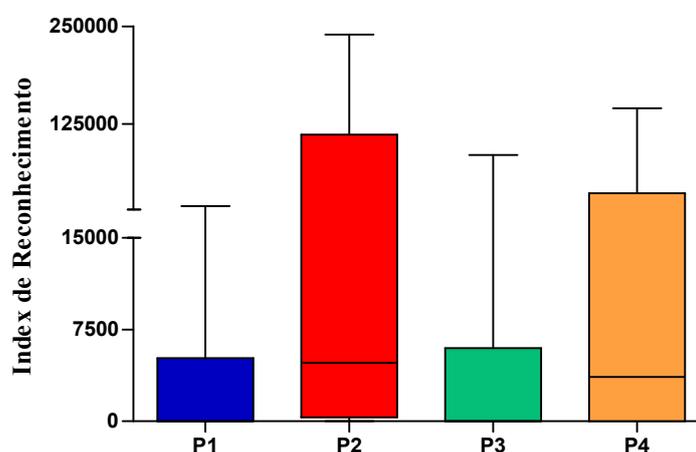


Figura 21– Perfil de imunodominância dos epitopos P1 (OmpC) e P2, P3 e P4 (OmpA). A análise de diferenças estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido do teste Kruskal-Wallis para todos os epitopos e o teste T para análise de diferenças entre P1 e P2. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

7. DISCUSSÃO

Peptídeos têm sido considerados bons candidatos a drogas. A Food and Drug Administration (FDA) tem aprovado fármacos à base de peptídeos e várias drogas estão em vários estágios de desenvolvimento (SHARMA et al., 2014). Peptídeos possuem várias propriedades desejáveis como toxicidade minimizada, diversidade química abundante, elevada especificidade e efeitos colaterais minimizados (RAUTA et al., 2016). Também tem sido atraentes como candidatos a vacina devido à relativa simplicidade de produção, estabilidade biológica, e a natureza não infecciosa (NAZ e DABIR, 2007).

O conceito de vacinas de peptídeos baseia-se na síntese de epitopos de células B e de células T que são imunodominantes e podem induzir respostas imunitárias específicas (PATRONOV e DOYTCHINOVA, 2013). Dessa maneira, com o aumento da compreensão do reconhecimento do antígeno a nível molecular, o desenvolvimento de vacinas de peptídeos sintéticos pode ser formulado para estimular uma resposta imune alvo (PATRONOV e DOYTCHINOVA, 2013; RAUTA et al., 2016).

Nos últimos anos, o avanço no desenvolvimento de vacinas tem sido acelerado pela aplicação de novas estratégias baseadas em genômica funcional, proteômica e química sintética, isto implica, em métodos *in silico* (RAUTA et al., 2016). A predição de epitopos imunogênicos traz novas perspectivas para a construção de vacina, pois isso diminui os custos e o tempo necessário para a seleção de candidatos a vacinas, e oferece novas chaves para aquelas doenças para as quais não estão disponíveis vacinas (RAUTA et al., 2016). Neste trabalho, técnicas computacionais foram utilizadas para prever novos candidatos a vacinas de peptídeo, contra cepas patogênicas de *Shigella flexneri*. Sendo assim, a identificação de epitopos pode ser útil para o desenvolvimento de uma vacina global de peptídeos contra *Shigella flexneri* através da indução de resposta imunitária.

OmpA e OmpC de bactérias Gram negativas são classes de OMPs que formam barris monoméricos ou triméricos para facilitar o transporte de nutrientes dentro da célula (KRISHNAN e PRASADARAO, 2012; JARZAB et al., 2013). O FimH, por sua vez, é uma proteína de dois domínios na ponta da pili tipo I (ou fimbria) que reconhece manoses terminais em glicoproteínas epiteliais (SAUER et al., 2016). Dessa maneira, um dos critérios para a escolha desses antígenos para o desenho de peptídeos, foi devido estes serem expostos à superfície bacteriana e consequentemente mais suscetíveis ao reconhecimento por anticorpo ou célula B e receptores de células T, além de também existirem relatos de trabalhos

utilizando estes antígenos com enfoque vacinal (PORE e CHAKRABARTI, 2013; JARZAB et al., 2013; HABIBI et al., 2015). Através do programa IEDB, 11 epitopos lineares foram preditos, sendo 5 epitopos do antígeno OmpA e 6 para o antígeno FimH, ambos de *Shigella flexneri*. Neste trabalho, o peptídeo P1 foi utilizado como controle positivo nos testes de ELISA e Citometria de Fluxo, este peptídeo P1 corresponde ao epitopo linear da proteína OmpC de *S. flexneri*, ele foi testado experimentalmente por Jarzab (2013), e de acordo com esses pesquisadores, o peptídeo P1 é um epitopo de célula B imunodominante desta proteína. Entre todos os 12 peptídeos preditos que foram triados por ELISA, 7 peptídeos (incluindo o peptídeo P1) foram reconhecidos pelo antissoro anti-*Shigella* (Tabela 4).

Acatando a necessidade desenvolver novas estratégias de vacinação para o controle da shigelose, uma vez que ainda não existe uma vacina segura, eficaz e licenciada (CHEN e KOTLOFF, 2016), o presente trabalho visou avaliar a resposta humoral de camundongos imunizando-os com os peptídeos sintéticos (P1, P2, P3, P4, P7, P10 e P12), os quais foram preditos pelo IEDB como potenciais epitopos de célula B e também foram reconhecidos por anticorpos presente no antissoro anti-*Shigella* no teste de triagem, dessa forma foi possível atribuir a sua capacidade imunogênica. A importância de selecionar os peptídeos mais imunogênicos ocorre pelo fato de vacinas peptídicas de subunidade, concebidas para incluir o mínimo de componentes microbianos, podem estimular uma resposta imunitária ótima, isso também diminui o risco de estimulação de uma resposta autoimune ou outros efeitos adversativos devido à presença dos componentes desnecessários (RAUTA et al., 2016).

Os tamanhos dos peptídeos selecionados na triagem, que variou de 6 a 18 resíduos de aminoácidos ($\pm 0,7$ a 1,8 kDa), teve a necessidade de utilizar uma molécula carreadora (neste trabalho foi utilizado o BSA) capaz de estimular uma resposta imune adaptativa específica, para cada peptídeo administrado na imunização dos camundongos. Tendo em vista que os peptídeos administrados livremente no organismo (soro ou intestino) sofrem alta susceptibilidade a ação de proteases, com rápida degradação e baixa solubilidade, em especial peptídeos catiônicos (SHARMA et al., 2014).

Os camundongos imunizados com os peptídeos P1, P2, P3 e P4 em combinação com BSA (peptídeo + BSA, via glutaraldeído) produziram níveis significativos de anticorpos IgG anti-peptídeo P1, P2, P3 e P4 após as imunizações, quando comparados com os peptídeos P7, P10 e P12 (Figura 15 e 16), como pode ser visto no resultado do ELISA indireto das três doses de imunização. A produção desses anticorpos demonstrou que mesmo após o acoplamento com BSA, estes mantiveram a sua imunogenicidade conservada, este resultado

corroborar com a literatura, pois a utilização de BSA como carreador antigênico tem sido relatada (MACHADO-DE-ÁVILA et al., 2004).

Também foi observado que além da produção dos anti-peptídeos no soro dos animais, houve a produção de anticorpos IgG anti-BSA, e para diminuir as reações indesejadas e aumentar a especificidade dos anti-peptídeos foi realizada a adsorção (BSA 5%) dos anti-BSA presente nas amostras de antissoros anti-peptídeos, anti-BSA e pré-imune. Os resultados da citometria na metodologia de adsorção contra *S. flexneri* 5a str. M90T demonstrou contribuir para evitar resultados falsos positivos devido à presença desses componentes desnecessários. Foi observado que o antissoro anti-BSA quando adsorvido (BSA 5%) equiparou-se ao antissoro pré-imune não adsorvido. Dessa maneira, os testes de ELISA e citometria de fluxo utilizaram as amostras de antissoros submetidas à adsorção com BSA 5%, para melhor avaliação dos resultados.

A OmpA de *Escherichia coli* e outras Enterobactérias é a OMP melhor caracterizada, ela é expressa em níveis muito altos e possui múltiplas funções, desempenhando papéis patogênicos importantes, podendo funcionar como uma adesina e invasina, bem como escape de defesas do hospedeiro ou estimuladores da produção de citosina pró-inflamatória, podendo participar na formação de biofilme e servindo como um receptor para vários bacteriófagos (SMITH et al., 2007; CONFER e AYALEW, 2013). OmpA é uma proteína caracterizada por um grupo que se forma no domínio N-terminal, um β barril anti-paralela com oito cadeias, que está incorporado na membrana externa. O domínio C-terminal globular está localizado no espaço periplasmático (CONFER e AYALEW, 2013). Embora as características da estrutura e função de porina da OmpA foram bem estudadas, o papel de OmpA na patogênese de espécies de *Shigella* ainda estão em constante investigação (AMBROSI et al., 2012; KRISHNAN e PRASADARAO, 2012). Porém, em vários casos, proteínas da família OmpA estão sob avaliação como potenciais candidatos a vacinas para Shigelse (PORE e CHAKRABARTI, 2013; BHOWMICK et al., 2014).

Todos os antissoros (P1, P2, P3 e P4) foram capazes de reconhecer epitopos da proteína nativa presente em diferentes isolados selvagens de *S. flexneri*, com 92,3% (12/13) de reconhecimento, através de citometria de fluxo. Considerando o potencial imunogênico de OmpA, a mesma tem mostrado ser alvo do sistema imunitário com imunogenicidade relacionada com alças expostas à superfície da molécula (CONFER e AYALEW, 2013). Porém, no presente trabalho, os antissoros P1 (OmpC), P2, P3 e P4 (OmpA) testados contra vários isolados selvagens de *S. flexneri* por citometria de fluxo, mostrou que os anticorpos presente no antissoro P2 (OmpA) apresentou um index de reconhecimento mais elevado em

relação aos outros antissoros (P1, P3 e P4), quando foram testados contra vários isolados selvagens de *S. flexneri*, e a posição do epítipo P2 no modelo tridimensional de OmpA, previu a sua localização na região do domínio C-terminal globular no espaço periplasmático e não nas alças expostas na superfície da OmpA.

Reportando os resultados da predição dos epítipos lineares de célula B pelo IEDB, a análise dos parâmetros físico-químicos previu o epítipo P2 com alta acessibilidade, média hidrofiliçidade e baixa antigenicidade, em relação aos outros epítipos. Estes resultados demonstram que o epítipo P2 predito pode ser considerado o epítipo de OmpA mais imunodominante entre os epítipos avaliados, pois o antissoro P2 reconheceu 92,3 % (12/13) das cepas selvagens, além de apresentar diferença estatisticamente significativa com valor de $P < 0,0422$. Quando o epítipo P2 foi comparado com P1, aquele também demonstrou ser mais imunodominante com diferença estatisticamente significativa e o valor de $P < 0,0155$.

O epítipo P4, foi o único epítipo predito que corroborou com Confer e Ayalew (2013), quando eles disseram que a imunogenicidade OmpA tem sido relacionada com alças expostas à superfície da molécula. A previsão da posição do epítipo P4 na estrutura tridimensional de OmpA, mostra que este epítipo está localizado no domínio N-terminal em uma das alças expostas na superfície da OmpA. A predição do IEDB mostrou que o epítipo P4 possui média acessibilidade, alta hidrofiliçidade e baixa imunogenicidade, porém o antissoro P4 reconheceu 61,5 % (8/13) das cepas selvagens de *S. flexneri*. Sendo assim, estes resultados demonstram que o epítipo P4 foi realmente o segundo epítipo imunodominante.

A OmpA de *S. flexneri* é uma proteína com características muito promissoras como antígeno vacinal e para a identificação de epítipos imunogênicos específicos. Estudos realizado por Pore e Chakrabarti (2013), observaram que OmpA de *S. flexneri 2a* é um antígeno de reação cruzada e comum entre cepas de *Shigella* sp., possuindo epítipos expostos na superfície bem como sendo capaz de evocar imunidade protetora em 100% camundongos desafiados com a cepa virulenta de *S. flexneri 2a*. A imunidade protetora envolve a participação de ambas as respostas imunes humoral e celular, OmpA também coordena respostas imune inata e adaptativa Typ1-1, por fim, TLR2 desempenha papel fundamental na convergência de imunidade inata e adaptativa. Portanto, a identificação de epítipos imunogênicos da OmpA de *S. flexneri* pode contribuir para o desenvolvimento de um candidato a vacina através da tecnologia peptídica, e uma vacina efetiva deverá incluir epítipos capazes de induzir resposta protetora na maioria dos indivíduos e excluir aqueles epítipos que causem imunopatologia ou resposta indesejada. Os anticorpos produzidos contra os peptídeos P2 e P4 foram capazes de reconhecer os isolados selvagens de *S. flexneri*, este

resultado possibilita inferir que esses peptídeos possuem potencial para um candidato a vacina regional, porém estudos com desafio de camundongos imunizados com esses peptídeos contra cepas virulentas da bactéria e/ou ensaios de fagocitose são necessários, para consolidar esta inferência.

8. CONCLUSÃO

- A proteína OmpA de *Shigella flexneri* apresenta três possíveis epitopos de célula B (P2, P3 e P4), pois indicou sua capacidade de estimular a resposta imune do hospedeiro;
- A predição dos epitopos de célula B utilizando o IEDB aliado à predição da estrutura tridimensional das proteínas pelo Swiss-model corroborou com os resultados obtidos na citometria de fluxo;
- O protocolo de adsorção das amostras de antissoros com BSA 5% possibilitou minimizar as reações de antígeno-anticorpo indesejadas, diminuindo os resultados falsos positivos;
- Houve reconhecimento dos anticorpos anti-peptídeos P1, P2, P3 e P4 pela proteína nativa presente nos isolados selvagens de *S. flexneri*;
- O epitopo P2 foi o mais imunodominante entre os epitopos preditos com diferenças estatisticamente significativas ($P < 0,0422$);
- Epitopos de OmpA são mais reativos que o P1 de ompC, isso pode ser explicado em parte, por OmpA ser mais abrangente na superfície bacteriana.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados alcançados neste trabalho abrem novas oportunidades para a utilização de peptídeos sintéticos, que imitam epitopos de célula B, como candidato vacinal da proteína OmpA de *Shigella flexneri*. Experimentos usando camundongos deveram ser realizados:

- Realizar a predição de epitopos de célula B lineares e/ou conformacionais, explorando toda a região de alças da OmpA. Sintetizar os peptídeos correspondentes e imunizar camundongos imunocompetentes;
- Testar métodos de imunização oral dos camundongos;
- Avaliar a resposta imune humoral e celular, e o padrão de citocinas pró-inflamatórias dos camundongos imunizados;
- Otimizar o protocolo de acoplamento que utiliza carreador BSA via glutaraldeído visando minimizar ao máximo os efeitos do BSA no antissoro dos animais;
- Analisar a capacidade opsonizante dos anticorpos anti-peptídeos através de ensaio de fagocitose;
- Testar por citometria de fluxo os antissoros de camundongos imunizados contra diferentes espécies de *Shigella* além de outras bactérias patogênicas e comensais humanas, a fim de avaliar reatividade cruzada;
- Verificar o nível de proteção dos animais imunizados realizando testes de desafio contra diferentes cepas virulentas de *Shigella* sp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSI, C.; POMPILI, M.; SCRIBANO, D. et al. Outer Membrane Protein A (OmpA): A New Player in *Shigella flexneri* Protrusion Formation and Inter-Cellular Spreading. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49625, 2012.

ANGELINI, M.; STEHLING, E. G.; MORETTI, M. L. et al. Molecular Epidemiology of *Shigella spp* Strains Isolated in two Different Metropolitan Areas of Southeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 685-692, 2009.

ÁVILA, R. A. M. Predição de Epitopos Descontínuos ou Conformacionais em Proteínas através da Bioinformática Estrutural. 2011. 17-24p. **Tese de Doutorado**, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioinformática, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

BARRY, E. M.; PASETTI, M. F.; SZTEIN, M. B. et al. Progress and pitfalls in *Shigella* vaccine research. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 10, p. 245-255, 2013.

BEYENE, G. e TASEW, H. Prevalence of intestinal parasite, *Shigella* and *Salmonella* species among diarrheal children in Jimma health center, Jimma southwest Ethiopia: a cross sectional study. **Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 1, n. 10, 2014.

BHATTACHARYA, D.; BHATTACHARYA, H.; THAMIZHMANI, R.; D. S. et al. Shigellosis in Bay of Bengal Islands, India: clinical and seasonal patterns, surveillance of antibiotic susceptibility patterns, and molecular characterization of multidrug-resistant *Shigella* strains isolated during a 6-year period from 2006 to 2011. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, Issue 2, p. 157-170, 2014.

BHOWMICK, R.; PORE, D.; CHAKRABARTI, M. K. Outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a induces TLR2-mediated activation of B cells: involvement of protein tyrosine kinase, ERK and NF- κ B. **PLoS One**, v. 9, n. 10, e109107, 2014.

BIASINI, M.; BIENERT, S.; WATERHOUSE A. et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. **Nucleic Acids Research**; v. 42, n. W1, p. W252-W258; 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive methodo for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS (CDC). Capter 3, Infectious Diseades Related to Travel. Disponível em: <http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2016/Infectious-diseases-related-to-travel/shigellosis>. Acesso em: 15 de nov. de 2016.

CHAKRABORTY, S.; CHAKRAVORTY, R.; AHMED, M. et al. A computacional approach for identification of epitopes in dengue vírus envelop protein: a step towards designing a universal dengue vaccine targeting endemic regions. **In Silico Biology**, v. 10, n. 5-6, p. 235-46, 2010.

CHANG, Z.; LU, S.; CHEN, L. et al. Causative Species and Serotypes of Shigellosis in Mainland China: Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS ONE**, v. 7, n. 12, e52515, 2012.

CHEN, W. H. e KOTLOFF, K. L. *Shigella* Vaccine Development: Finding the Path of Least Resistance. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 23, Issue 11, 2016.

CHENA, X.; CHOUDHARI, S. P.; MARTINEZ-BECERRAA, F. J. Impact of Detergent on Biophysical Properties and Immune Response of the IpaDB Fusion Protein, a Candidate Subunit Vaccine against *Shigella* Species. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 292-299, 2015.

CONFER, A. W. e AYALEW, S. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. **Veterinary Microbiology**, v. 163, n. 3-4, p. 207-22, 2013.

CRUZ, C. B. N.; SOUZA, M. C. S.; SERRA, P. T. et al. Virulence Factors Associated with Pediatric Shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, 2014.

CULQUIA, D. R.; GARCÍA-DE-OLALLA-RIZOB, P.; ALVA-CHAVEZC, K. P. et al. Análisis del patrón epidemiológico de la shigelosis en Barcelona entre 1988 y 2012: ¿es una infección de transmisión sexual emergente? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.09.013>>, 2014.

DAVIES, M. N. e FLOWER, D. R. Harnessing bioinformatics to discover new vaccines. **Drug Discov Today**, v. 12, n. 9-10, p. 389-395, 2007.

DHIMAN, G.; LOHIA, N.; JAIN, S. et al. Metadherin peptides containing CD4⁺ and CD8⁺ T cell epitopes as vaccine candidate against cancer. **Microbiology and Immunology**, v. 60, Issue 9, p. 646–652, 2016.

EDWARDS, A. M.; ARROWSMITH, C. H.; CHRISTENDAT, D. Protein production: feeding the crystallographers and NMR spectroscopists. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 7, p. 970-972, 2000.

FARAG, T. H.; FARUQUE, A. S.; WU, Y. et al. Housefly population density correlates with shigellosis among children in Mirzapur, Bangladesh: a time series analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, e228, 2013.

FELICIANO, N. D.; RIBEIRO, V. S.; GONZAGA, H. T. et al. Short epitope-based synthetic peptides for serodiagnosis of human strongyloidiasis. **Immunology letters**, v. 172, p. 89-93, 2016.

FOSTER, R. A.; CARLIN, N. I. A.; MAJCHER, M. et al. Structural elucidation of the O-antigen of the *Shigella flexneri* provisional serotype 88-893: structural and serological similarities with *S. flexneri* provisional serotype Y394 (1c). **Carbohydrate Research**, v. 346, Issue 6, 1, p. 872–876, 2011.

GAO, J. e KURGAN, L. Computational prediction of B cell epitopes from antigen sequences. **Methods in Molecular Biology**, n. 1184, p. 197-215, 2014.

GOMARA, M. J. e HARO, I. Synthetic peptides for the immunodiagnosis of human diseases. **Current Medicinal Chemistry**, n. 14, v. 5, p. 531-546, 2007.

HABIBI, M.; ASADI, M. R.; SHOKRGOZAR, M. A. et al. Intranasal immunization with fusion protein MrpH·FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Molecular Immunology**, v. 64, n. 2, p. 285-94, 2015.

HUANG, J. e HONDA, W. CED: a conformational epitope database. **BMC Immunology**, v. 7, n. 7, p. 7, 2006.

JARZAB, A., WITKOWSKA, D.; ZLOMEK, E. 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, Issue 8, e70539, 2013.

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

JENNISON, A. V.; RAQIB, R.; VERMA, N. K. Immunoproteome analysis of soluble and membrane proteins of *Shigella flexneri* 2457T. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n. 41, p. 6683-6688, 2006.

JOFFRE O. P.; SEGURA, E.; SAVINA, A. et al. Cross-presentation by dendritic cells. **Nature Review Immunology**, v. 12, p. 557–569, 2012.

JOHNSON, J. R. *Shigella* and *Escherichia coli* at the crossroads: machiavellian masqueraders or taxonomic treachery?. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, p. 583-585, 2000.

KALIL, J.; CUNHA-NETO, E.; GUILHERME, L. Novas Estratégias de Vacinas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, Suplemento 1, p. 65-71, 2008.

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. 16, p. S1045-1056, 30038-0, 2016.

KHAN, M. A.; HOSSAIN, M. U.; RAKIB-UZ-ZAMAN, S. M. et al. Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Ebola viruses: an immunoinformatics study. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 82, n. 1, p. 25-34, 2015.

KIM, Y.; PONOMARENKO, J.; ZHU, Z. et al. Immune epitope database analysis resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, Web Server issue, W525–W530, 2012.

KLONTZ, K. C. e SINGH, N. Treatment of drug-resistant *Shigella* infections. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 13, n. 1, p. 69-80, 2015.

KOTLOFF K. L.; WINICKOFF, J. P.; IVANOFF, B. et al. Global burden of *Shigella* infections: implications for vaccine development and implementation of control strategies. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 77, p. 651–666, 1999.

KOTLOFF, K. G.; NATARO, J. P.; BLACKWELDER, W. C. et al. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **The Lancet**, v. 382, Issue 9888, n. 20-26, p. 209-222, 2013.

KRISHNAN, S. e 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.

LEVINE, M. M.; KOTLOFF, K. L.; BARRY, E. M.; PASETTI, M. F. & SZTEIN, M. B. 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, Jul. 2007.

LI, N.; LI, C. P.; DIAO, J. D. et al. Prediction and identification of linear B-cell epitopes in major group 3 allergen derived from *Dermatophagoides farinae*. **ZhongguoXue Xi Chong Bing fangZhiZhiZa** (chinês), v. 26, n. 3, p. 296-9, 307, 2014.

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.

LINDBERG, A. A.; KARNELL, A.; WEINTRAUB, A. The lipopolysaccharide of *Shigella* bacteria as a virulence factor. **Reviews of infectious diseases**, v. 13, p. S279–S28, 1991.

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

MACHADO-DE-ÁVILA, R. A.; ALVARENGA, L. M.; TAVARES, C. A. et al. Molecular characterization of protective antibodies raised in mice by *Tityus serrulatus* scorpion venom toxins conjugated to bovine serum albumin. **Toxicon**, v. 44, n. 3, p. 233-41, 2004.

MANI, S.; WIERZBA, T.; WALKER, R. I. Status of vaccine research and development for *Shigella*. **Vaccine**, v. 34, Issue 26, p. 2887-28943, 2016.

NAZ, R. K. e DABIR, P. Peptide vaccines against cancer, infectious diseases, and conception. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 12, p. 1833-44, 2007.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 133-143, 2005.

OMS. Guidelines for the control of shigellosis, including epidemics due to *Shigella dysenteriae* 1. Geneva: **World Health Organization**, 2005, 64p.

PATRONOV, A. e DOYTCHINOVA, I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. **Open Biology**, v 3:, n 120139, 2013.

PHALIPON, A. e SANSONETTI, P. J. *Shigella's* ways of manipulating the host intestinal innate and adaptive immune system: a tool box for survival?. **Immunology & Cell Biology – Nature**, v. 85, p. 119–129, 2007.

PONOMARENKO, J. V. e BOURNE, P. E. Antibody-protein interactions: benchmark datasets and prediction tools evaluation. **BMC Structural Biology**, n. 7, p. 64, 2007.

PORE, D. e CHAKRABARTI, M. K. Outer membrane protein A (OmpA) from *Shigella flexneri* 2a: A promising subunit candidate. **Vaccine**, v. 13, Issue 36, p. 3644-3650, 2013.

PORE, D.; MAHATA, N.; PAL, A. et al. Outer Membrane Protein A (OmpA) of *Shigella flexneri* 2a, Induces Protective Immune Response in Mouse Model. **PLoS One**, v. 6, Issue 7, e22663, 2011.

RAM, P. K.; CRUMP, J. A.; GUPTA, S. K. et al. Part II. Analysis of data gaps pertaining to *Shigella* infections in low and medium human development index countries, 1984–2005. **Epidemiology & Infection**, v.136, p. 577–603, 2008.

RAUTA, P. R.; ASHE, S. E DEBASIS NAYAK 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.

SAHL, J. W.; MORRIS, C. R.; EMBERGER, J. et al. Defining the phylogenomics of *Shigella* species: A pathway to diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 951-60, 2015.

SANSONETTI, P.J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 3-14, 2001.

SAUER, M. M.; JAKOB, R. P.; ERAS, J. et al. Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. **Nature Communications**, v. 7, n. 10738, 2016.

SCHROEDER, G. N. e 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, 2008.

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N. et al. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3381-3385, 2003.

SHARMA, A.; SINGLA, D.; RASHID, M. et al. Designing of peptides with desired half-life in intestine-like environment. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 282, 2014.

SINGARAVELU, 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. et al. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS Microbiology Letters**, v. 273, p. 1-11, 2007.

SOUSA, M. A.; MENDES, P. T.; COLLARES, G. B. et al. *Shigella* in Brazilian children with acute diarrhoea: prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 30–35. 2013.

SUH, M.; KUNTUMALLA, S.; YU, Y. et al. Proteomes of pathogenic *Escherichia coli/Shigella* group surveyed in their host environments. **Informa Healthcare**, v. 11, n. 5, p. 593-609, 2014.

TANNER, K. A.; BRZOVIC, P.; ROHDE, J. R. The bacterial pathogen–ubiquitin interface: lessons learned from *Shigella*. **Cellular Microbiology**, v. 17, Issue 1, p. 35-44, 2015.

TOAPANT, A. F. R.; SIMON J. K.; BARRY, E. M. et al. Gut-Homing Conventional Plasmablasts and CD27(-) Plasmablasts Elicited after a Short Time of Exposure to an Oral Live-Attenuated *Shigella* Vaccine Candidate in Humans. **Frontiers in Immunology**, v. 20, p. 5-374, 2014.

TRÉPANIÉ, S.; BUI, Y. G.; BLACKBURN, M. et al. Travel-Related Shigellosis in Quebec, Canada: An Analysis of Risk Factors. **Journal of Travel Medicine**, v. 21, Issue 5, p. 304–309, 2014.

TYRER, P. C.; RUTH, F. A.; KYD, J. M. et al. Receptor mediated targeting of M-cells. **Vaccine**, v. 25, p. 3204–3209, 2007.

UD-DIN, A. I. M. S.; WAHID, S. U. H.; LATIF, H. A. et al. Changing Trends in the Prevalence of *Shigella* Species: Emergence of Multi-Drug Resistant *Shigella sonnei* Biotype g in Bangladesh. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, e82601, 2013.

VALCANIS, M.; BROWN J. D.; HAZELTON, B. et al. Outbreak of locally acquired azithromycin-resistant *Shigella flexneri* infection in men who have sex with men. **Pathology**, v. 47, n. 1, p. 87-8, 2015.

WANG, T. Y. H.; LI, M. et al. Immunoproteomics of outer membrane proteins and extracellular proteins of *Shigella flexneri* 2a 2457T. **Proteomics**, v. 5, p. 4777-4793, 2005.

WEST, N. P.; SANSONETTI, P.; MOUNIER J. et al. Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. **Science**, v. 307, n 5713, p. 1313-7. 2005.

YABUUCHI, E. *Bacillus dysentericus* (sic) 1897 was the first rather than *Bacillus dysenteriae* 1898. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, n. 1041, 2002.

ZAIDI, M. B. e ESTRADA-GARCÍA, T. *Shigella*: A Highly Virulent and Elusive Pathogen. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 2, p. 81–87, 2014.

ZHAO, L.; LIU, L.; LENG, W.; WEIL, C. e JIN, Q. A proteogenomic analysis of *Shigella flexneri* using 2D LC-MALDI TOF/TOF. **BioMed Central Genomics**, v. 12, n. 528, 2011.

ANEXO 1



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

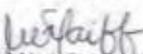
Número do Protocolo: 027/2014	Data de Entrada: 01/12/2014
Pesquisador Responsável: MAYANA CRISTINA DA SILVA PARDO	
Título do Projeto: Identificação de Epítomos imunogênicos associados à proteção contra invasão de <i>Shigella sp.</i>	
Instituição Responsável: INPA - FIOCRUZ	

RECOMENDAÇÃO FINAL

Indicação: APROVADO

Data de liberação do Parecer: 15.1.2015.

Atenciosamente,


Mariclaide de Farias Nairf
Vice-Presidente CEUA/INPA
PO N° 008/2013