

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

Avaliação do uso vacinal de peptídeos baseados na proteína OmpA de *Shigella* spp.

JÉSSICA ARAÚJO MARQUES

MANAUS

2021

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

JÉSSICA ARAÚJO MARQUES

Avaliação do uso vacinal de peptídeos baseados na proteína OmpA de *Shigella* spp.

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

Orientador: Dr^a. Patrícia Puccinelli Orlandi

Co-orientador: Dr. Luís André Mariúba

MANAUS – AM

2021

Ficha Catalográfica

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

M357a Marques, Jéssica Araújo
Avaliação do uso vacinal de peptídeos baseados na proteína OmpA de Shigella spp. / Jéssica Araújo Marques . 2021
76 f.: il. color; 31 cm.

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

1. Vacina. 2. Shigella. 3. Peptídeo sintético. 4. Intranasal . 5. Intraperitoneal . I. Orlandi, Patrícia Puccinelli. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço, a Deus por sempre me dar forças para prosseguir nesta caminhada.

Agradeço à minha mãe, pai, irmãs, sogra e cunhadas, pelas palavras de conforto, risadas e por todo o apoio concedido a mim.

À minha orientadora, Dra Patrícia Orlandi pela orientação e apoio.

Ao meu co-orientador, Dr. Luis André Mariúba, pela paciência, compreensão e disposição em todos os momentos.

À Daniele Mota, pela amizade sincera, risadas e fofocas durante essa jornada.

Agradecimento especial a Késsia Alves, pelas ajudas nos experimentos laboratoriais, e acompanhamento ao biotério, e por sempre estar presente mesmo na situação pandêmica.

Aos meus amigos de trabalho, Aldenora Vasconcelos, Marjory Ximenes, e meu chefe Diego Regalado, por sempre serem compreensivos e me incentivarem a nunca desistir;

Ao meu noivo, Jander Matos, por me apoiar desde a graduação e nunca me desamparar, mesmo quando tudo parecia difícil e sem saída.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD / FIOCRUZ Amazônia) pela infraestrutura e amparo que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFAM pela excelente oportunidade.

Se sentir que chegou ao seu limite, lembre-se do motivo pelo qual você cerra os punhos, lembre-se porque resolveu trilhar este caminho e permita que essa memória o carregue além de seus limites.

All Might (Boku no Hero Academia)

RESUMO

A shigelose é uma doença diarreica ocasionada por bactérias gram-negativas do gênero *Shigella* sp. que ocorrem principalmente em crianças menores de 5 anos que contribuem para um elevado índice de morbidade e mortalidade infantil, dessa forma caracterizando um grave problema de saúde pública global. Diante disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) determinou prioridade para o desenvolvimento de novas estratégias para o combate contra shigelose. Dentre estas estratégias, a busca por vacinas efetivas e de baixo custo se enquadram como uma necessidade eminente. Assim, este estudo propôs imunizar camundongos da linhagem BALB/c, com um peptídeo sintético (P2) selecionado a partir de uma sequência da proteína de membrana externa A (OmpA) de *Shigella*, pelas vias: intranasal utilizando esporos de *Bacillus subtilis* como estrutura carreadora; e intraperitoneal utilizando a proteína carreadora KLH (*keyhole limpet hemocyanin*), e posteriormente desafiá-los com dose letal deste patógeno (*S. flexneri* 5a M90T), para avaliar a capacidade de proteção estabelecida pelas duas vias. Os anticorpos anti-peptídeo produzidos ao longo das imunizações e posterior ao desafio foram analisados por meio do teste imunoenzimático ELISA. Após o desafio, os camundongos foram avaliados em relação ao peso e vigilância de morte. Os resultados demonstraram que a imunização pela via intranasal não foi eficiente quanto a produção de anticorpos sistêmicos, e conseqüentemente pouco protetora frente a infecção por *Shigella*. Em contrapartida, a imunização de modo intraperitoneal apresentaram níveis elevados de anticorpos anti-peptídeo, e apresentou considerável capacidade de proteção na infecção ocasionada por este patógeno. Sendo assim, o peptídeo sintético P2, quando administrado pela via intraperitoneal, apresentou potencial imunogênico e protetor contra shigelose, confirmando ser um bom candidato a vacina.

Palavras-chave: Vacina; *Shigella*; Peptídeo sintético; Intranasal; Intraperitoneal.

ABSTRACT

Shigellosis is a diarrheal disease caused by gram-negative bacteria of the genus *Shigella* sp. that occurs mainly in children under 5 years old that contribute to a high rate of infant morbidity and mortality, thus characterizing a serious global public health problem. In view of this, the World Health Organization (WHO) determined a priority for the development of new strategies to combat shigellosis. Among these strategies, the search for effective and low-cost vaccines is an eminent need. Thus, this study proposed to immunize mice of the BALB/c lineage with a synthetic peptide (P2) selected from a sequence of the outer membrane protein A (OmpA) of *Shigella*, via: intranasal routes using *Bacillus subtilis* spores as carrier structure ; and intraperitoneally using the KLH carrier protein (keyhole limpet hemocyanin), and later to challenge them with a lethal dose of this pathogen (*S. flexneri* 5a M90T), to assess the protection capacity established by the two pathways. Anti-peptide antibodies produced during the immunizations and after the challenge were analyzed using the immunoenzymatic ELISA test. After the challenge, mice were evaluated for weight and death surveillance. The results showed that intranasal immunization was not efficient in the production of systemic antibodies, and consequently little protective against *Shigella* infection. In contrast, intraperitoneal immunization showed high levels of anti-peptide antibodies and showed considerable protective capacity against infection caused by this pathogen. Thus, the synthetic peptide P2, when administered intraperitoneally, showed immunogenic and protective potential against shigellosis, confirming that it is a good candidate for a vaccine.

Keywords: Vaccine; *Shigella*; Synthetic peptide; Intranasal; Intraperitoneal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Incidência de Shigelose por região geográfica (2012-2017)	19
Figura 02 – Patogênese celular de <i>Shigella</i> spp.....	23
Figura 03 – Estrutura de OmpA	26
Figura 04 – Visualização da previsão da posição do epítipo de OmpA no modelo tridimensional na <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T no programa Swiss PDBViewer.....	30
Figura 05 – Esquematização demonstrando as imunizações em camundongos Balb/c.....	35
Figura 06 – Perfil cromatográfico de P2 em coluna de fase reversa C18.....	38
Figura 07 – ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das 5 imunizações por via intranasal.....	39
Figura 08 – ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das 5 imunizações por via intraperitoneal.....	41
Figura 09 – Média de peso dos grupos nos dias mensurados para a via Intranasal.....	44
Figura 10 – Média de peso dos grupos nos dias mensurados para a via Intraperitoneal.....	45
Figura 11 – ELISA dos anticorpos IgG após o desafio com cepa virulenta de <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T por via Intranasal.....	49
Figura 12 – ELISA dos anticorpos IgG após o desafio com cepa virulenta de <i>Shigella flexneri</i> 5a M90T por via Intraperitoneal.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécies de <i>Shigella</i> e seus sorogrupos e sorotipos.....	16
Tabela 2 - Grupos de camundongos e vias de imunização.....	31
Tabela 3 – Regime de eutanásia e coleta de sangue dos camundongos.....	36
Tabela 4 – Número de camundongos mortos por grupo nos tempos observados para cada via de imunização utilizada.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variação

APCs – Células apresentadoras de antígenos

BSA – Albumina sérica bovina

CÉLULAS M – *microfold cells*

CEUA – Comitê de Ética em Pesquisa no Uso em Animais

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Da - Daltons

EDC – 1-[3-(diamino)propil-3-etilcarbodiimida

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva

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

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IEDB – *Immune Epitope DataBase and Analysis Reasource*

IFN – Interferon

IL – Interleucina

Ipas – Proteínas de invasão

Kb – Quilobases

kDa – Quilodaltons

KLH – *Keyhole Limpet Hemocyanin*

LPS – Lipopolissacarídeo

NHS – N-hydroxysulfosuccinimide

NLR – NOD-like receptors

Omp – Outer membrane protein (Proteína da membrana externa)

OmpA - Outer membrane protein A (Proteína da membrana externa A)

OMS – Organização Mundial da Saúde

P.M. – Peso molecular

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato Saline)

PMN – Polimorfonucleada

SST3 – Sistema de Secreção do Tipo 3

TFA – *Trifluoroacetic acid*

UFC – Unidade Formadora de Colônia

WHO – World Health Organization

Sumário

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>Shigella</i> spp.	15
2.2 Shigelose	17
2.3 Epidemiologia de <i>Shigella</i> spp.	18
2.4 Patogênese da <i>Shigella</i> spp.	21
2.5 Peptídeos sintéticos como candidatos vacinais para <i>Shigella</i>	24
2.6 Modelo experimental para estudos imunológicos com <i>Shigella</i> spp.	26
3. OBJETIVO GERAL	28
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
4. MATERIAL E METODOS	29
4.1 Aspectos éticos	29
4.2 Animais	29
4.3 Isolados de bactérias da <i>Shigella</i> sp.	29
4.4 Peptídeo sintético	30
4.5 Ensaio de imunização dos camundongos	31
4.5.1 Imunizações Intranasais	31
4.5.2 Imunizações Intraperitoneais	33
4.6 Infecção desafio com <i>Shigella</i> e Estudo de Proteção	34
4.7 Teste Imunológico de Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	36
4.8 Análises estatísticas	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Purificação do peptídeo	38
5.2 Avaliação dos anticorpos IgG anti-peptídeo via Intranasal	39
5.3 Avaliação dos anticorpos IgG anti-peptídeo via Intraperitoneal	41
5.4 Mensuração de peso e vigilância de morte dos camundongos após o desafio com <i>S. flexneri</i> 5a M90T	42
5.5 Avaliação dos anticorpos IgG após o desafio com <i>S. flexneri</i> 5a M90T	48
6. CONCLUSÃO	53
7. PERSPECTIVAS	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	72
Anexo 1 – Aprovação Comitê de Ética do INPA	72

Anexo 2 – Prorrogação da Aprovação do Comitê de Ética do INPA.....	73
Anexo 3 – Produtos obtidos durante o mestrado	74
Anexo 3.1 – Artigo Publicado.....	74
Anexo 3.2 - Patente utilizando os peptídeos	75
Anexo 3.3 – Capítulo de livro – Biomoléculas: Mapeando potenciais da Amazônia .	76

1. INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Shigella* sp. são agentes etiológicos causadores de disenteria bacilar que constituem o grupo de patógenos intracelulares facultativos (YANG, 2005), divididos em quatro espécies: *Shigella flexneri* (14 sorotipos e subsorotipos); *Shigella sonnei* (1 sorotipo); *Shigella dysenteriae* (15 sorotipos); e *Shigella boydii* (20 sorotipos) (JHONSON, 2018; BARRY et. al., 2013). A espécie *S. sonnei* têm predominância em países menos urbanizados; e o sorotipo 1 “Shiga bacillus” da espécie *S. dysenteriae* é responsável pelos altos índices de mortalidade em países de baixa renda (SANSONETTI, 2001). Estes diferentes grupos e sorotipos, demonstram similaridade fenotípica e patogenicidade devido a capacidade invasiva (THANH et. al., 2016). Estas bactérias gram-negativas, não-movéis, enteroinvasivas pertencente à família *Enterobacteriaceae*, são capazes de interagir com a superfície de células epiteliais do cólon humano resultando em um diversificado quadro clínico de diarreia, que variam de curta a longa duração, com febres, dores abdominais e presença de sangue nas fezes (SANSONETTI, 2001).

A shigelose é uma doença de fácil propagação de pessoa para pessoa por meio da rota via oral-fecal, onde cerca de 10 a 100 microrganismos podem causar a infecção (SHIFERAW et. al., 2004). A falta de saneamento básico e higiene com o alimento, é um fator de forte contribuição para a disseminação da doença. Esta é de principal ocorrência em crianças menores de 5 anos, contribuindo de maneira significativa com as taxas de mortalidade infantil (KIRK et. al., 2015; SANSONETTI, 2001). Desta forma é classificada como uma doença diarreica de grande problema para a saúde pública, com estimativa de 190 milhões de casos por ano, que resultam em aproximadamente 1.1 milhões de mortes no mundo (KIRK et. al., 2015), sendo mais de 99% dos casos acometidos em populações de países de baixa renda (WALKER et. al., 2017).

A shigelose também tem ocorrência em países de alta renda, como Estados Unidos, onde correspondem ao terceiro lugar das infecções bacterianas entéricas mais comuns (WALKER et. al., 2017). Na Europa e América do Norte as infecções são causadas pela espécie *S. sonnei*; no entanto espécies do tipo *S. boydii* e *S.*

dysenteriae representam menos de 5% de infecções por shigelose em escala global (THANH, 2016).

Na América Latina a prevalência dos casos de shigelose tem sido causada por espécies *S. flexneri* e *S. sonnei* (BARRANTES, 2016). No Brasil, a prevalência das espécies de shigelose é delimitada de acordo com as regiões geográficas, na qual regiões mais urbanizadas, como a Sudeste, é dominada pela espécie *S. sonnei*, e regiões menos desenvolvidas, como Norte e Nordeste, é frequente a *S. flexneri* (SOUSA et. al., 2010).

O tratamento convencional das infecções por *Shigella* sp. envolve o uso de antibióticos que minimizam a excreção bacteriana do paciente, mas estes têm se tornado ineficazes mediante a resistência desenvolvida pelas cepas (VUBIL, 2018; CRUZ et. al., 2014; SOUSA et. al., 2013; ASHKENAZI et. al., 2003). Desta forma se faz necessário pesquisas para a criação de novas estratégias terapêuticas e profiláticas.

A elaboração de vacinas eficazes com baixo custo é uma alternativa promissora (MANI et. al., 2016; ANAND, 2013) uma vez que estudos recentes sobre proteínas de superfície da membrana externa de bactérias gram-negativas evidenciaram a possibilidade de serem alvos importantes representando perspectivas para um antígeno vacinal (CHITRADEVI, 2016; ANAND, 2016).

Alguns artigos citam a presença de epítomos imunodominantes em vesículas ou domínios da membrana externa de *Shigella* sp. que configuram alvos de interesse na busca por candidatos vacinais eficazes e de baixo custo, (MITRA et. al., 2016; BHOWMICH et. al., 2014; PORE e CHAKRABARTI, 2014; PORE e CHAKRABARTI, 2013) uma vez que a problemática é voltada para países de baixa a média renda.

Em estudo anterior, Souza, (2018), realizaram um ensaio imunológico em camundongos, a fim de avaliar a capacidade protetora desenvolvida por peptídeos sintéticos desenhados a partir dos epítomos imunodominantes presentes nas membranas externas de *Shigella* sp. frente a infecções desafios com cepa virulenta de *Shigella* sp. Como resultado, um peptídeo se destacou por ser imunogênico como também protetor eficaz, tornando-o bom candidato vacinal.

Diante disso, o presente trabalho visa avaliar o potencial do peptídeo antigênico sintético, contra as infecções por *Shigella* sp. e, assim contribuir no desenvolvimento de vacinas profiláticas e/ou terapêuticas para o tratamento de shigelose.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Shigella* spp.

As espécies de *Shigella* são patógenos intracelulares gram-negativos facultativos, identificados como bacilos, não-esporulados, não-encapsulada, sem motilidade, enteroinvasivas, incapazes de fermentar a lactose. As bactérias deste gênero são os agentes etiológicos da shigelose ou disenteria bacilar (JOHNSON, 2018; MAGGIORE et. al., 2016; SAHL et. al., 2015; ANAND, 2013). Quanto a sua classificação taxonômica: pertencem ao filo Proteobacteria, classe Gammaproteobacteria, ordem Entereobacteriales e família Enterobacteriaceae (STROCKBINE e MAURELLI, 2015; MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2012).

Shigella pode ser identificada no laboratório clínico por meio de suas características morfológicas e testes bioquímicos, o qual é constantemente definido pela falta de motilidade, lactose e fermentação (SAHL et al., 2015). Entretanto em testes químicos, muitas vezes não é possível diferenciar *Shigella* e *Escherichia coli* enteroinvasivas (EIEC), visto que estas espécies compartilham estruturas do antígeno O idênticas. Os sintomas clínicos, por muitas vezes são similares dificultando a distinção de infecções ocasionadas por *Shigella* ou *E. coli* (SAHL et. al., 2015; LIU, 2008; JOHNSON, 2000).

No que se refere a descoberta de *Shigella*, os relatos iniciais de isolamento e caracterização destes patógenos, ocorreram em 1898 pelo Dr. Kiyoshi Shiga, que na época estudava um surto de disenteria bacilar recorrente no Japão. Essa descrição contribuiu para a diferenciação entre disenteria bacilar e disenteria amebica. (ADAM; PICKING, 2016; NYOGI, 2005; TROFA, 1999). A bactéria descoberta foi nomeada *Bacillus dysenteriae*, e publicada no Journal of Bacteriology (YABUUCHI, 2002). Atualmente esta espécie é conhecida como *Shigella dysenteriae* 1, o primeiro

membro identificado do gênero *Shigella* (TANEJA e MEWARA, 2016; LEVINE et al., 2007). Dando continuidade à descoberta relativo a este gênero, nas décadas seguintes os pesquisadores Simon Flexner, Mark Boyd e Carl Sonne notaram organismos similares que foram adicionados a novos grupos desta mesma espécie (TANEJA e MEWARA, 2016; SASAKAWA, 2010).

Na taxonomia oficial do gênero encontram-se quatro espécies descritas, e estes apresentam quatro sorogrupos, denominados: *S. dysenteriae* (sorogrupo A), *S. flexneri* (sorogrupo B), *S. boydii* (sorogrupo C) e *S. sonnei* (sorogrupo D) evidenciados na tabela 1 (JOHNSON, 2018; TANEJA e MEWARA, 2016).

Tabela 1. Espécies de *Shigella* e seus sorogrupos e sorotipos.

Espécies	Sorogrupos	Sorotipos	Referências
<i>S. dysenteriae</i>	A	15 sorotipos	Barry et. al., 2013;
<i>S. flexneri</i>	B	14 sorotipos	Jhonson, 2018;
<i>S. boydii</i>	C	20 sorotipos	Taneja e Mewara, 2016;
<i>S. sonnei</i>	D	1 sorotipos	Jhonson, 2018.

As espécies podem se diferenciar por testes bioquímicos e sorológicos, classificadas de acordo com a quantidade de sorotipo presente, sendo assim: *S. dysentariae* com 15 sorotipos; *S. flexneri* 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* 20 sorotipos e *S. sonnei* somente um sorotipo (JOHNSON, 2018; SAIMA et. al., 2018; MARTEYN; GAZI; SANSONETTI, 2015).

Os sorotipos são identificados com base na composição do antígeno O da cadeia lateral, constituinte do polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), característico das membranas externas de bactérias Gram-negativas (MAGGIORE et al., 2016; SAHL et. al., 2015; LEVINE et al., 2007).

2.2 Shigelose

A shigelose, também conhecida como disenteria bacilar, é a doença infecciosa acometida por *Shigella*. É descrita como uma infecção bacteriana aguda que afeta o intestino grosso e a porção distal do intestino delgado, resultando em diarreia acompanhada por febre, náuseas, vômitos e cólicas (RAMIREZ, 2001). No período de 24-48 horas se inicia a manifestação clínica, com duração normalmente de 5 a 7 dias, este intervalo de incubação pode se diferenciar conforme cada organismo (RODRIGUES et al., 2020; CDC, 2017; RIVERA ZARATE, 2017; TREPANIER et al., 2014). A gravidade e taxa de letalidade da doença é limitada ao estado do hospedeiro, (como idade, nutrição), e sorotipo. *S. dysenteriae* 1 (Shiga bacillus) produz uma potente citotoxina responsável por quadros de epidemias mortais, com letalidade de 20% entre os casos hospitalizados (SANSONETTI, 2011; RAMIREZ, 2001). Esta toxina acarreta um estado grave ao paciente devido a síndrome hemolítica-urêmica (RODRIGUES et al., 2020).

Os sintomas incluem: febre, cólicas abdominais, desidratação, vômitos, fezes contendo sangue e muco (LEOPOLDINO, 2020; CDC, 2017; RIVERA ZARATE, 2017; NIKFAR, 2017; ASHIDA e SASAKAWA, 2016). A shigelose é autolimitada, mas pode evoluir de um quadro simples a grave em pacientes imunocomprometidos ou se o tratamento médico adequado não estiver disponível, como em áreas de baixo nível econômico (MANI et al., 2016). As espécies *S. sonnei* e *S. boydii* causam diarreia leve em comparação a *S. flexneri* e *S. dysenteriae* (RAM et al., 2006).

A transmissão é principalmente pela via direta ou indireta fecal-oral, por alimentos e água contaminados, e em locais onde a eliminação de fezes humanas é inadequada, moscas podem atuar como vetores de shigelose (TANEJA e MEWARA, 2016; GUPTA et al., 2012; NIYOGI, 2005). *Shigella* pode causar grandes surtos, já que uma pequena dose (10-100 bactérias) é o suficiente para causar a infecção (SAIMA, 2018; SUR et al., 2004). Uma outra via de transmissão ocorre entre indivíduos do sexo masculino na faixa etária de 21-60 anos, devido a relações sexuais sem proteção (LEE et al., 2017; SIMMS et al., 2015).

O diagnóstico é realizado por métodos de aglutinação com identificação dos sorotipos (LIU et al., 2021). O tratamento primário para disenteria bacilar recomendado pela OMS é a reidratação, um método seguro e eficaz, importante

para reposição de líquidos e eletrólitos (NIYOGI, 2005; RAMIREZ, 2001). O uso de antibióticos é decidido de acordo com padrão de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Shigella* em circulação no local (NIYOGI, 2005). Os antibióticos comumente utilizados são a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprim (WHO, 2005; ASHKENAZI et al., 2003), embora há evidências de que os mecanismos de resistência microbiana tornam crescente a diminuição de sensibilidade das bactérias a esses fármacos em algumas regiões (BHATTACHARYA et al., 2014).

A resistência generalizada a quase todas as classes de drogas restringe a escolha de agentes antimicrobianos eficazes para o combate a shigelose (PUZARI et al., 2018), de forma que se faz necessário a busca por novos tratamentos alternativos.

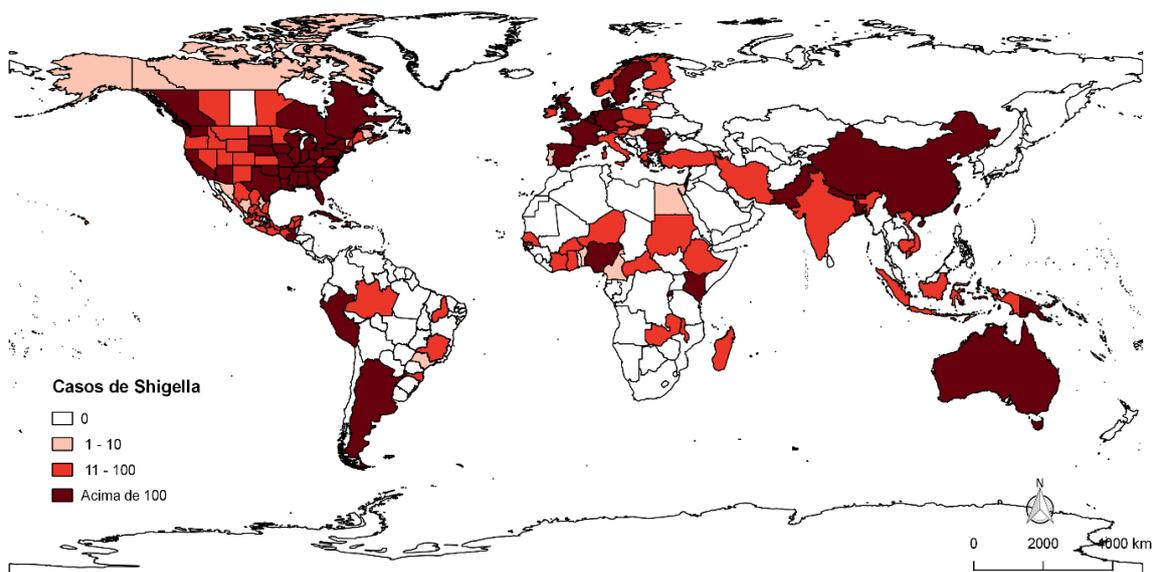
2.3 Epidemiologia de *Shigella* spp.

Shigelose é uma doença diarreica ocasionada por *Shigella* reconhecida como um grave problema de saúde pública no mundo. Globalmente, *Shigella* é responsável por 80-165 milhões de casos de doenças, dos quais 1,5 milhão são em países de alta renda e 163 milhões em países de baixa renda. Anualmente são relatadas 600 mil mortes, em sua maioria crianças (LUNELLI, 2020; SAIMA et al., 2018; PUZARI et al., 2018; KHAN et al., 2014).

Estudos epidemiológicos recentes têm ratificado que a shigelose permanece na lista dos principais enteropatógenos que causam diarreia em crianças, mesmo em áreas com condições sanitárias melhoradas (KOTLOFF, 2017; LIMA et al., 2015; KOTLOFF, 2013).

Na busca por dados atuais, o Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia, realizou uma revisão epidemiológica contendo um levantamento sobre a incidência mundial de *Shigella*, no período de 2012 a 2017 (DCDIA, 2017). Os relatos documentados nos continentes americanos, africano, europeu, asiático e Oceania foram os objetos de estudo (Figura 01).

Figura 01: Incidência de Shigelose por região geográfica (2012-2017). Dados de incidência analisados dos seguintes continentes: americano, africano, europeu, asiático e Oceania.



Fonte: DCDIA, 2017.

No Brasil, o estudo identificou incidências de 11 a 100 casos de *Shigella* sp. a cada 100.000 habitantes nos estados do Amazonas, Piauí, Minas Gerais, e Santa Catarina. Em São Paulo os números são menores, sendo de 1 a 10 casos (DCDIA, 2017).

A distribuição dos sorogrupos de *Shigella* pode ser determinada de acordo com o nível de desenvolvimento econômico de um país. *S. dysenteriae* geralmente se apresenta nas formas endêmicas e em surtos da doença. Já *S. flexneri* e *S. sonnei* são responsáveis pelas endemias em nações subdesenvolvidas e desenvolvidas, respectivamente, enquanto *S. boydii* predomina na Índia e países vizinhos (TANEJA e MEWARA, 2016; VENKATESAN e RANALLO, 2006).

Quantificando os índices de cada sorogrupo, pode se inferir que: o sorogrupo prevalente em países em desenvolvimento é *S. flexneri* (60%), seguido por *S. sonnei* (15%), *S. dysenteriae* (9,8%) e *S. boydii* com uma taxa de 5,7% (TANEJA e MEWARA, 2016; LIMA; HAVT; LIMA, 2015). E em países desenvolvidos, é evidente o domínio de *S. sonnei* (77%), por seguinte *S. flexneri* (16%), *S. boydii* (2%), e *S. dysenteriae* (1%) (TREPANIER et. al., 2014).

As causas para a dominância convencional de *S. sonnei* e *S. flexneri* em países mais ou menos urbanizados, respectivamente, é desconhecida. Entretanto, estudos sugerem que essa segregação ocorre pela presença da enterobactéria *Plesiomonas shigelloides* em regiões menos desenvolvidas. *P. shigelloides* e *S. sonnei*, compartilham a mesma cadeia lateral do lipopolissacarídeo O, um antígeno de superfície tido como principal alvo pelo sistema imune adaptativo durante a infecção ocasionada por *Shigella* (KLUBER-KIELB et al., 2008). Estes antígenos de superfície estabelecem uma reação cruzada que impede a penetração das bactérias *S. sonnei* nas células epiteliais do hospedeiro (JANDA et. al., 2016; THOMPSON, 2015; SACK et. al., 1994). *P. shigelloides* é comumente encontrada em águas não tratadas de ambientes tropicais. Em países de baixa renda o uso de águas não tratadas é frequente, desse modo a exposição a *P. shigelloides* proporciona uma proteção contra infecção por *S. sonnei* atuando como uma vacina natural (SACK et al., 1994).

No entanto, estudos demonstram que com progressos socioeconômicos e conseqüentemente melhorias nas qualidades de vida das populações de países pouco desenvolvidos, há um aumento na proporção de *S. sonnei* isolados quando comparados com *S. flexneri* (HOLT et al., 2012).

No Brasil, os maiores índices dos isolados de *Shigella* spp. são encontrados nas regiões Sudeste (40%) e Nordeste (34%), e os menores nas regiões Norte (13%), Centro-Oeste (10%) e Sul (3%) (SERIBELLI et. al., 2016; PEIRANO et. al., 2006). Estudos mostram as estirpes de *S. flexneri* e *S. sonnei* como principais agentes de shigelose, com a divisão de *S. sonnei* nas regiões mais urbanizadas (Sudeste), e *S. flexneri* nas regiões menos urbanizadas (Norte e Nordeste) (SOUSA et. al., 2010; ANGELINE et. al., 2009). Na região Sudeste o índice dos isolados de *S. sonnei* é de 62,7 %, e na região Norte e Nordeste 73,6% e 64,5% de isolados de *S. flexneri*, respectivamente (LEOPOLDINO, 2020). Essa delimitação das espécies de *Shigella* no país pode ser atribuída à diversidade geográfica, climática, econômica e social (RODRIGUES et. al., 2016).

Os óbitos por shigelose no Brasil, seguem a ordem decrescente de casos: Nordeste (37%), Sudeste (27%), Sul (23%), Norte (8%) e Centro-Oeste (5%). E

maior frequência entre crianças de 0-4 anos, e idosos de 60 anos (FRANCISCO et al., 2018).

Em Manaus (AM), o domínio das cepas de *S. flexneri* em isolados de crianças que sofrem de diarreia foi evidenciado, por meio de uma pesquisa realizada em 1.339 crianças de 0-10 anos, na qual foram identificados 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).

Outros estudos foram realizados na Região Norte, no estado do Pará, denotando a frequência de sorotipos de *S. flexneri*, com destaque para a *S. flexneri* 2a, a mais frequentemente isolada no período de 1979 a 2009 (BASTOS et al., 2012); e Porto velho, que descreveu o gênero *Shigella* como o terceiro agente etiológico causador de diarreia infantil com uma frequência de 8% dos casos em populações infantis periféricas (ORLANDI et al., 2001).

2.4 Patogênese da *Shigella* spp.

O mecanismo de patogênese de *Shigella* tem como base a presença de um grande plasmídeo de virulência de 220 kb (KILLACKEY et al., 2016), que durante sua história evolutiva, adquiriu vários fatores essenciais para a invasão e subversão das defesas do hospedeiro, tais como a capacidade de codificar o Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) que permite a entrada nas células do epitélio (THAHN et al., 2016; MARTEYN et al., 2012).

O SST3 é uma estrutura encontrada em bactérias Gram-negativas, gênero *Shigella* (TANNER et al., 2015), responsável pela injeção dos fatores de virulência nas células epiteliais do cólon do hospedeiro, promovendo a invasão bacteriana e destruição tecidual do revestimento epitelial (MARTEYN et al., 2012). O SST3 denominado complexo agulha, é uma nanomáquina em molde de seringa que apresenta um aparelho de exportação central e uma estrutura em forma de agulha oca revestidos por um sistema de dois anéis, pelo qual os fatores de virulência são transportados (LUNELLI, 2020). Ele também permite a injeção de moléculas denominadas “efetores”, que possuem a função de antagonizar as respostas imune inata e adaptativa, por meio do desarranjo dos componentes do citoesqueleto de

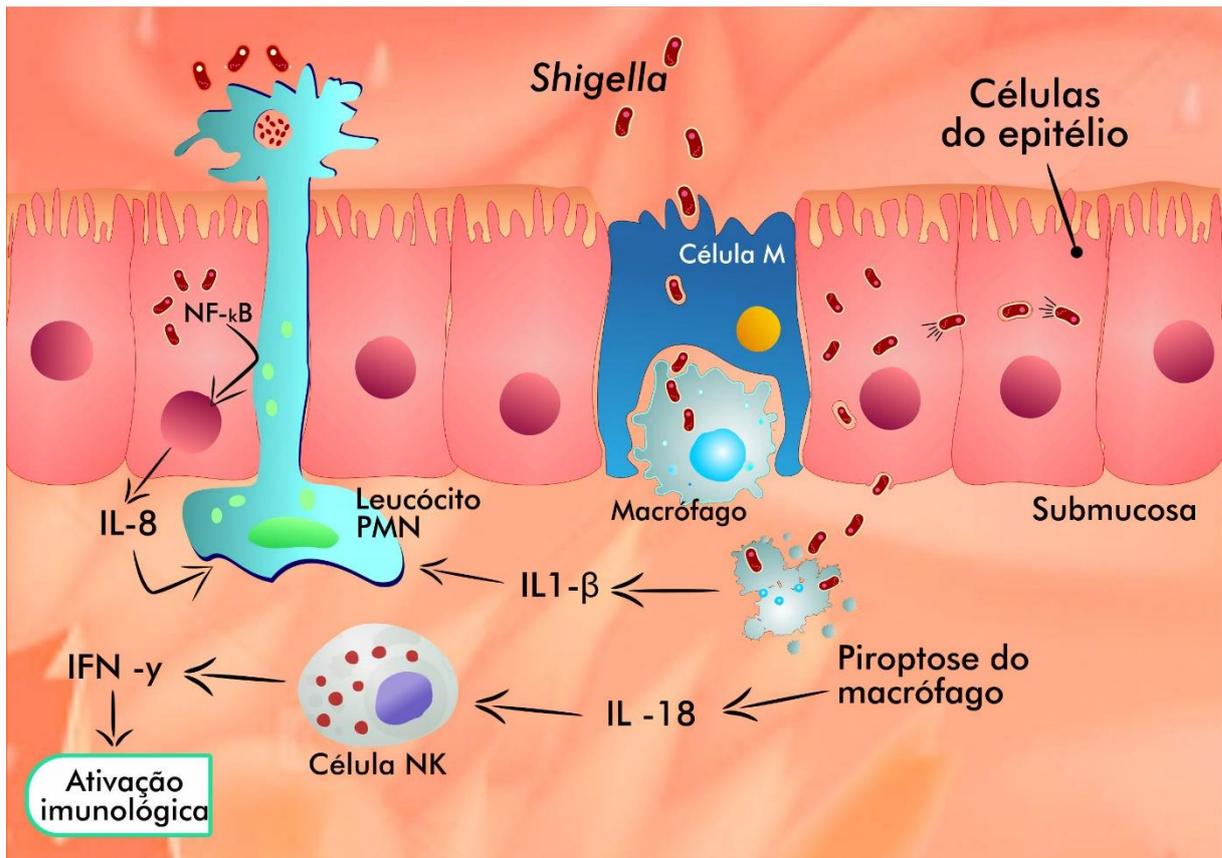
actina, e indução da morte celular de macrófagos (OGAWA et al., 2008; SANSONETTI, 2007).

Com a ingestão pela rota fecal-oral, os sorotipos de *Shigella* migram pelo intestino delgado em direção ao cólon e reto, onde atravessam a barreira epitelial por meio das células M – células epiteliais especializadas em apresentar antígenos do lúmen intestinal aos linfóides adjacentes, favorecendo o início de uma resposta imune quando necessário (KILLACKEY et al., 2016; OGAWA et al., 2008; SANSONETTI et al., 1996). Esse processo é chamado de transcitose, e permite a exposição das bactérias aos macrófagos na submucosa do trato gastrointestinal (THANH et al., 2016). O recurso de sobrevivência da bactéria consiste na indução da piroptose dos macrófagos, mecanismo que ativa os inflamassomas NLR, diferindo assim dos outros tipos de mortes celulares, como apoptose e necrose. Os inflamassomas NLR, medeiam o processamento de citocinas dependente da caspase-1, incluindo IL-1 β e IL-18, seguidos por ruptura da membrana plasmática e condensação nuclear (ASHIDA et al., 2011; BERGSBAKEN et al., 2009). Nesta primeira etapa, a lise dos fagossomos circundantes é mediada pelas proteínas efetoras IpaB, IpaC e IpaD (THAHN et al., 2016; KILLACKEY et al., 2016).

Essas citocinas lideram o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) para o local da inflamação (SANSONETTI, 2001), criando uma resposta inflamatória massiva e aguda, que desestabiliza a integridade da parede intestinal, de forma que as bactérias possam alcançar células epiteliais mais profundas (SCHROEDER e HILBI, 2008). Após a morte do macrófago, as bactérias são liberadas, para invadir as células epiteliais do intestino pelo lado basolateral; desencadear a endocitose mediada pelos efetores (THAHN et al., 2016); e se multiplicar no citoplasma (SCHROEDER e HILBI, 2008). Essa disseminação lateral para as células vizinhas, mantém a bactéria protegida contra as defesas extracelulares do hospedeiro (OLIVEIRA, 2013). A proteína IpaA, atua na polimerização de uma cauda de actina, que promove uma força propulsora necessária, permitindo a movimentação das bactérias entre as células do hospedeiro (OGAWA et al., 2008).

O ciclo de infecção está completo, quando há a passagem dos patógenos entre as células adjacentes. Este processo se repete até a destruição total da monocamada do epitélio intestinal (Figura 2) (PARSOT, 2015).

Figura 02: Esquema atual do ciclo de infecção da *Shigella*: ruptura, invasão e processo de destruição tecidual da mucosa. Ilustração dos processos de infecção das células epiteliais do cólon.



Fonte: Autoria própria, baseada em Bona, 2018.

A invasão das bactérias no hospedeiro resulta em um grave processo de inflamação. Estudos evidenciam a função desempenhada por IL-1β e IL-18 liberadas, após a ativação da capase-1 pela IpaB nos macrófagos infectados. IL-1β causa a ruptura da barreira epitelial e desestabilização da homogeneidade do tecido, favorecendo a difusão da bactéria. IL-18, um potente indutor do interferon (IFN)-γ, permite a estabilização do sistema imune inato para erradicar *Shigella* (SANSONETTI, 2001). Com isso, as células secretam uma série de citocinas, sejam pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, TNF-α e TNF-β) ou anti-inflamatórias (IL-10 e TGF-β).

como vias de sobrevivência contra o patógeno (KILLACKEY et al., 2016; GIRARDIN et al., 2001).

2.5 Peptídeos sintéticos como candidatos vacinais para *Shigella*.

Shigelose, uma grave doença diarreica com risco de vida, é um grande problema de saúde que afeta países alta e baixa renda (BASEER et al., 2017; JHA et al., 2013). Anualmente, 91 milhões de casos são relatados (KUO et al., 2008), e aproximadamente 600 mil crianças com idade até 5 anos morrem com a desidratação severa e disenteria no mundo (WALKER e CLIFFORD, 2015). Os episódios repetitivos dessa doença afetam a absorção de nutrientes no organismo, o que leva a desnutrição, baixa estatura e conseqüentemente deficiências no aprendizado da criança (PATH, 2015), afetando o seu desenvolvimento físico e cognitivo, que perpetua o ciclo de pobreza em áreas carentes (WALKER et al., 2012; GUERRANT et al., 2008).

S. sonnei e *S. flexneri* são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de shigelose (BASEER et al., 2017), e estas já apresentam um risco emergente de multirresistência a antibióticos utilizados no primeiro tratamento, tais como: ciprofloxacino, ampicilina e fluoroquinolona (NUESCH-INDERBINEN et al., 2016; BOWEN et al., 2015; GU et al., 2012). Com isso, tem crescido o interesse em vacina entérica no últimos anos, demonstrando ser o momento ideal para o desenvolvimento de uma nova estratégia o mais eficiente possível (WALKER e CLIFFORD, 2015).

Uma vacina adequada para a shigelose deve ser capaz de estimular o sistema imune mucosal e desenvolver imunidade protetora de longa duração, com um mínimo de efeitos colaterais. É importante também levar em consideração a relação custo-benefício, e a facilidade ao administrar a vacina, pois as crianças de países subdesenvolvidos serão os principais destinatários (JENNISON e VERMA, 2004).

Infelizmente, ainda não há nenhuma vacina disponível contra as infecções causadas por *Shigella* spp. (BASEER et al., 2017; MANI et al., 2016), mesmo com diversos estudos realizados (CAMACHO et al., 2013). Uma alternativa promissora, é

a elaboração de vacinas de peptídeos sintéticos. Estas são vacinas produzidas a partir de sequências de aminoácidos de proteínas de bactéria, sintetizadas em laboratório (KALIL et al., 2008). Os peptídeos sintéticos imitam epítomos, presentes nos antígenos de proteínas de um determinado patógeno, com capacidade para induzir uma resposta imunológica (GOMARA e HARO, 2007). A utilização desse tipo de vacina se faz vantajosa por proporcionar uma completa caracterização química, ausência de contaminantes, completa reprodutibilidade, baixo custo de produção e estabilidade, como também a ausência de mecanismos supressores, alérgicos ou autoimunes e de evasão, típicos de microrganismos (NEURATH et al., 1986).

Com relação aos antígenos candidatos às vacinas para shigelose, destaca-se a OMP (proteínas de membrana externa) existente nas espécies de *Shigella*. Isso porque a OMP de bactérias Gram-negativas constitui uma importante estrutura do patógeno em razão de sua acessibilidade aos mecanismos de defesa do hospedeiro (PORE e CHAKRABARTI, 2013) desempenhando uma função significativa na sua patogenicidade, progressão da infecção e desenvolvimento da resposta inflamatória (SANSONETTI, 2001).

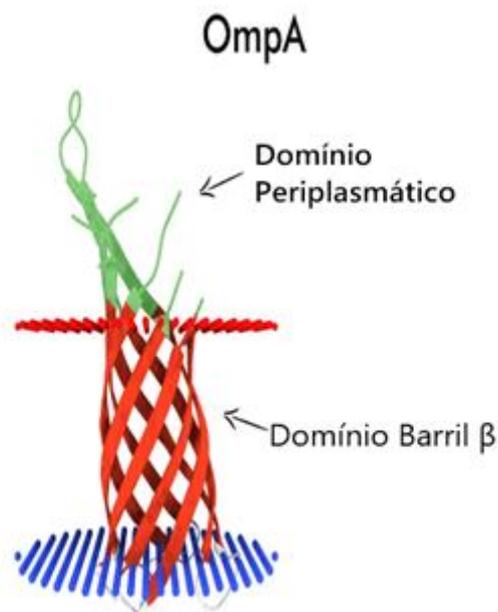
A proteína A da membrana externa (OmpA) é um candidato a antígeno vacinal promissor, por ser uma estrutura altamente conservadas entre as cepas de *Shigella* spp. e possuir um epítomo exposto na superfície da célula (PORE et al., 2011).

A OmpA é uma proteína monomérica de 35 kDa (AMBROSI et al., 2012; KRISHNAN e PRASADARAO, 2012) fundamental na integridade estrutural da membrana externa, também como um importante fator de virulência de vários patógenos (KRISHNAN e PRASADARAO, 2012; YUNG-HUNG et al., 2011; SMITH et al., 2007). Sua estrutura se constitui por dois domínios: um domínio N-terminal integrado a membrana externa, no qual as folha-beta pregueadas antiparalelas adquirem a forma de cilindro, denominado barril β de oito filamentos; e um domínio C-terminal, que é globular e está localizado no espaço periplasmático (CONFER e AYALE, 2013; YUNG-HUNG et al., 2011) (Figura 03).

Estudos recentes, demonstraram a capacidade de OmpA de interagir com diversos tecidos do hospedeiro, sendo considerada uma molécula pleiotrópica por atuar de diferentes maneiras nos mecanismos de virulência de bactérias

patogênicas (AMBROSI et al., 2012). OmpA também coordena respostas imune inata e adaptativa (PORE et al., 2009) e apresenta 1 possível epítipo de célula B capaz de estimular a resposta imune do hospedeiro (PARDO, 2016), indicando ser um antígeno promissor no desenvolvimento de vacinas.

Figura 03 – Estrutura de OmpA. Estrutura do domínio barril β (em vermelho) e do domínio periplasmático de OmpA (em verde).



Fonte: Protein Data Bank (PDB): <http://www.rcsb.org/structure/1QJP>.

2.6 Modelo experimental para estudos imunológicos com *Shigella* spp.

A compreensão do mecanismo de patogênese da shigelose em modelos animais que replicam os sintomas humanos, é essencial para a elaboração de uma vacina segura e eficaz (YANG et al., 2013). Diversos modelos experimentais são utilizados afim de mimetizar o processo de infecção em humanos, dentre eles o mais apropriado é o do macaco que desenvolve uma colite aguda (similar a observada em humanos) quando infectados pela via intragástrica (MARTEYN et al., 2012;

FONTAINE et al., 1988). Outros modelos se destacam por imitarem o processo de ruptura e invasão que ocorre na mucosa epitelial, sendo estes: o modelo de infecção pulmonar murino, a inoculação oral em camundongos recém-nascidos, a ceratoconjuntivite por infecção ocular em porquinhos-da-índia e a inflamação intestinal em coelhos (SHARMA et al., 2017; KIM et al., 2013; MARTEYN et al., 2012). O modelo de infecção em larvas de peixe-zebra permite o estudo da interação entre *Shigella* e fagócitos (KILLACKEY et al., 2016; MOSTOWY et al., 2013).

O modelo experimental utilizando camundongos é considerado o mais simples para o estudo da patogênese e imunobiologia da infecção ocasionada por *Shigella* (VAN DE BERG et al., 1995). Em testes científicos, os camundongos albinos da linhagem Balb/c (espécie *Mus musculus*) são os mais utilizados devido a sua produção de anticorpos monoclonais (PAIGEN, 1995).

Uma pesquisa utilizando cepas de *Shigella flexneri* 2a demonstrou que a infecção em camundongos pela via intraperitoneal, se assemelha a shigelose em humanos, apresentando os mesmo sintomas, como: perda de peso corporal, diminuição do comprimento do cólon, excesso de secreção e aumento da liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas (YANG et al., 2013). Em outro estudo utilizando a via intranasal, foi observado respostas humoral e celular similares as encontradas em humanos com disenteria bacilar (SHARMA et al., 2017; VAN DE BERG et al., 1995). Desse modo, ambas as vias se caracterizam como um local de entrada promissor para a *Shigella*, já que desenvolvem sintomas e características semelhantes a shigelose em humanos nos camundongos adultos.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito protetor do peptídeo oriundo de antígenos de OmpA contra infecções de *Shigella flexneri*, em modelo murino.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Purificar peptídeo sintético através da técnica imunocromatográfica;
- Avaliar a capacidade do peptídeo sintético em estimular resposta imune humoral através de imunização por via intranasal e intraperitoneal em modelo murinho;
- Avaliar a capacidade protetora da resposta imune promovida pelo peptídeo sintético.

4. MATERIAL E METODOS

4.1 Aspectos éticos

A autorização para o uso de animais neste trabalho e prorrogação da mesma foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (CEUA) do INPA sob o número 052/2018 conforme o documento no anexo 1 e anexo 2.

4.2 Animais

Nesta pesquisa, foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c fêmeas de aproximadamente 6-8 semanas de idade, pesando aproximadamente 25 g, obtidos e mantidos no Biotério Central do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Antes dos procedimentos experimentais os animais foram mantidos em isolamento por sete dias. Durante todo o experimento, os animais foram armazenados em microisoladores autoclaváveis, e alimentados com ração e água esterilizadas (por autoclave a 121 °C), em um número de 6 e 7 animais por microisolador. A limpeza foi realizada na frequência de 2 vezes na semana com a troca da maravalha e microisoladores por outros previamente esterilizados. Para a realização de cada procedimento, os animais foram devidamente anestesiados. Ao final do experimento, foi realizada a eutanásia em todos os animais por meio do deslocamento cervical, de acordo com o que preconiza as normas do CEUA.

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

4.3 Isolados de bactérias da *Shigella* sp.

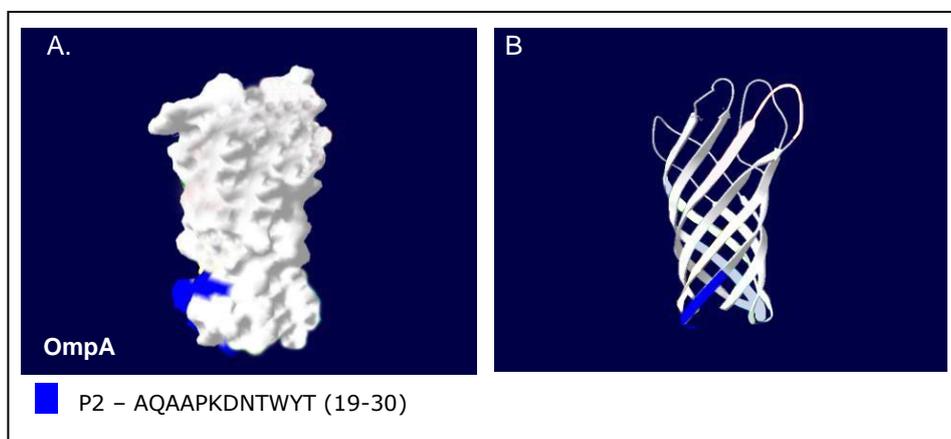
A cepa de bactéria padrão utilizada nesta pesquisa foi *Shigella flexneri* 5a M90T obtida da coleção de microrganismos do Instituto Leônidas & Maria Deane –

Fiocruz Amazônia (ILMD-Fiocruz Amazônia). As bactérias foram cultivadas para crescimento em meio LB à 37 °C.

4.4 Peptídeo sintético

A capacidade protetora de antígenos oriundos de membrana externa da *Shigella* sp. foi analisada utilizando um peptídeo sintético denominado P2, este foi desenhado para esta pesquisa proveniente de um estudo anterior realizado por Pardo, (2016). Utilizando a ferramenta IEDB, foi constatado que o peptídeo apresenta uma sequência peptídica de 13 aminoácidos correspondente a um epítipo linear exposto na superfície da proteína, com carga neutra, e peso molecular de 1365,45 (Figura 4).

Figura 04 – Visualização da previsão da posição epítipo de OmpA no modelo tridimensional da *Shigella flexneri* 5a M90T no programa Swiss PDB-Viewer. (A) Visualização do epítipo correlato ao peptídeo P2 na superfície da OmpA. (B) Demonstração do epítipo correspondente ao peptídeo P2 na estrutura de fita da proteína OmpA.



Fonte: Adaptado de PARDO, 2016.

Por apresentar um perfil hidrofílico, o peptídeo foi ressuspenso em 20 ml de água ultrapura (Milli-Q). A suspensão foi distribuída em um total de 20 alíquotas de 1 mL, e mantidas na geladeira (-20 °C) para uso posterior.

Seguindo a metodologia de Muhialdin e Algboory (2018) foi realizada a cromatografia de fase reversa para avaliação do grau de pureza do peptídeo sintético. As análises foram realizadas empregando duas fases móveis, Solução A (TFA 0,1%) e Solução B (acetronila 99,9% e TFA 0,1%). A fração II obtida por cromatografia de afinidade, foi liofilizada e solubilizada em Solução A para aplicação em cromatografia líquida de alta performance (CLAE) utilizando uma coluna C-18 (25 mm x 4,6 mm, Supelco), em sistema de cromatografia Akta Purifier 10[®] (GE Lifescience Healthcare). Primeiramente a coluna foi equilibrada com a solução A e a amostra eluída sob gradiente 0 a 70 % de Solução B (acetonitrila 99,9 % e TFA 0,1 %) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1mL/min, e detecção a 215 e 280 nm.

4.5 Ensaio de imunização dos camundongos

Foram utilizados um total de 65 camundongos, distribuídos em 5 grupos para a via intranasal e 5 grupos para a via intraperitoneal demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 – Grupos de camundongos e vias de imunização.

Intraperitoneal	Intranasal
P2 + Freund (6 camundongos)	P2 + PBS (6 camundongos)
P2 + KLH + Freund Acoplado (7 camundongos)	P2 + Esporos de <i>B. subtilis</i> Acoplado (7 camundongos)
KLH + PBS (6 camundongos)	Esporos de <i>B. subtilis</i> (6 camundongos)
Freund + PBS (6 camundongos)	PBS (7 camundongos)
P2 + KLH + Freund Sem Acoplar (7 camundongos)	P2 + Esporos de <i>B. subtilis</i> + PBS Sem Acoplar (7 camundongos)

4.5.1 Imunizações Intranasais

As imunizações intranasais foram feitas de acordo com o protocolo de imunização de Pore et al., (2011), diferindo na utilização de vesículas de lipossomas

por esporos da cepa comercial de *Bacillus subtilis* KO7 para apresentação do epítipo.

Para a obtenção dos esporos foi utilizado o método de escassez dos nutrientes em meio DS (Difco-Sporulation). A cultura foi recolhida 24h após o início da esporulação e tratadas com lisozimas para purificação, e posteriormente lavada 2 vezes em 1 M NaCl, 1 M KCl e água. Para a inibição da ação de proteases foi utilizado PMSF (0.05 M). Os esporos foram suspensos em água e tratados a 65 °C por 1 h para eliminar qualquer resíduo de células vegetativas, seguindo a metodologia de Potocki et al., 2017. A suspensão de esporos foi titulada e constatado que através dessa metodologia foram produzidos 1×10^3 esporos por microlitro.

Para as imunizações, foi necessário realizar a adsorção dos peptídeos à superfície do esporo por meio de ligação covalente (ALVES et al., 2018). A preparação dos esporos para tal ligação, se deu pela centrifugação de uma suspensão de 1×10^4 de esporos, com o descarte do sobrenadante, e aproveitamento do pellet de esporos para ressuspensão em 250 μ L de EDC (1-[3-(diamino)propil-3-etilcarbodiimida) durante 15 minutos. Após esse processo foram adicionados 250 μ L de NHS e a suspensão incubada por 30 min em temperatura ambiente, os esporos foram então centrifugados e o EDC e NHS removidos. Foi adicionada à solução com os esporos prontos o peptídeo numa concentração final de 75 μ g, e incubados *overnight* sob agitação em temperatura ambiente, posteriormente lavados 3 vezes com PBS 1X e ressuspensos em 140 μ L da mesma solução. Para o grupo de camundongos que foram imunizados com esporos e o peptídeo sem a reação de acoplamento, foi dispensada a realização das etapas que utilizam os reagentes EDC e NHS.

Os grupos controles foram preparados de acordo com suas especificações e volume final de 140 μ L:

- P2 + PBS na proporção de 1:1 dos reagentes;
- Esporos de *B. subtilis* na proporção de 1×10^4 de esporos; e
- PBS na concentração de 1X.

Os camundongos foram imunizados 1 vez ao dia pela via intranasal com o auxílio de uma micropipeta, em intervalos de 15 dias, totalizando 5 imunizações antes da infecção desafio. O soro anestésico foi preparado utilizando 375 µL de Quetamina e 750 µL de Xilasina, adicionados a 3.875 µL de PBS completando o volume final de 5 mL. Cada camundongo foi sedado com 0,1 ml de dose anestésica e então foram inoculados com 1×10^4 de esporos acoplados com P2, 10 µg de P2 e PBS, em uma dose total de 20 µL distribuídos gentilmente em 3 ou 4 microgotas em cada narina.

Os animais imunizados foram submetidos à coleta de sangue nos dias 0º, 14º, 28º, 42º e 56º no período de imunização com os mesmos. O sangue foi coletado via retro-orbital, durante as imunizações e antes de ocorrer o sacrifício. Após a coagulação, o sangue foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos. O soro foi retirado e armazenado à -20 °C até a dosagem de anticorpos específicos por ELISA.

4.5.2 Imunizações Intraperitoneais

As imunizações intraperitoneais foram feitas seguindo a metodologia utilizada em estudo anterior por Souza, 2018.

Para as imunizações, o peptídeo foi acoplado com a proteína carreadora KLH (*Keyhole Limpet Hemocyanin*) por meio da ligação covalente estabelecida entre os agentes químicos EDAC [cloreto de 1-etil-3(3-dimetilaminopropil)carbodiimida] e NHS (N-hidroxissuccinimida) ambos em concentração de 11 µL, adicionados a 110 µL de tampão MOPS [ácido 3-(N-mofolino)propanesulfônico], 280,5 µL de água Milli-Q, 27,5 µL de KLH e 110 µL do peptídeo, incubados em temperatura ambiente por 2 horas. Foi então adicionado Adjuvante de Freund (1:1), e depois utilizou-se o vortex até a emulsão total da solução. Foram dispensadas as reações utilizando EDAC, NHS, MOPS e água Milli-Q para o grupo de camundongos imunizados com o P2 e KLH sem acoplamento.

Os grupos controles P2 + Freund, PBS + Freund e KLH + PBS foram preparados na concentração de 1:1 dos reagentes e volume final de 700 µL.

Foram realizadas 5 imunizações antes a infecção desafio, em intervalos de 15 dias. A via de administração foi intraperitoneal utilizando uma seringa de 1 mL,

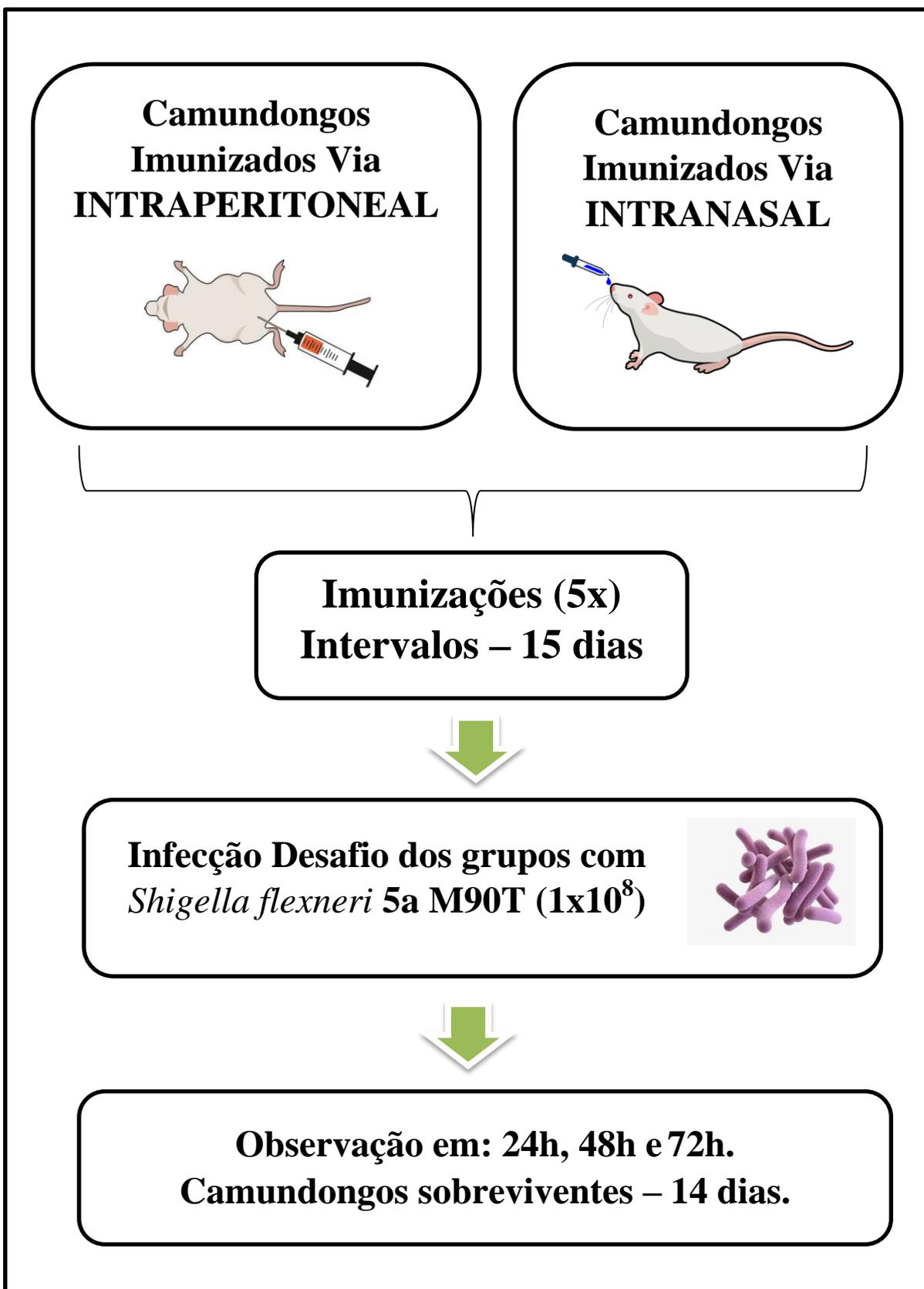
para aplicar 40 µg de P2, Freund e PBS, em uma dose total de 0,1 mL em cada camundongo.

O sangue foi coletado via retro-orbital durante o período de imunização nos dias 0^o, 14^o, 28^o, 42^o e 56^o. As amostras de sangue foram centrifugadas, o soro reservado e armazenado como descrito anteriormente até ser utilizado.

4.6 Infecção desafio com *Shigella* e Estudo de Proteção

Para avaliar a capacidade protetora dos peptídeos, os animais imunizados foram submetidos à infecção desafio com a cepa padrão de *S. flexneri* M90T virulenta via intranasal e via intraperitoneal após o término do protocolo de imunização. Os animais de cada grupo vacinal e controle, uma semana após última imunização (63^o dia) receberam doses de 1×10^8 CFU/mL de *Shigella*. Posterior a infecção desafio, os camundongos foram observados durante 3 dias, em 24h, 48h e 72h, indivíduos com peso inferior a 20g foram eutanasiados. Os camundongos sobreviventes foram observados por até 14 dias após o desafio (70^o dia), com a medição do peso ao final para comparação posterior com o peso inicial, taxa de mortalidade e o número de sobreviventes. (Figura 05). Foi realizada a coleta de sangue via retro-orbital em todos os camundongos.

Figura 05 - Esquemática demonstrando as imunizações em camundongos Balb/c.
Imunização dos camundongos pelas vias intraperitoneal e intranasal e infecção desafio com a cepa padrão de *S. flexneri* 5a M90T virulenta.



4.7 Teste Imunológico de Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

As amostras biológicas (soro das imunizações e do sangue total) utilizadas nesta pesquisa foram acondicionadas em recipiente refrigerado para o transporte do Biotério Central do INPA até o Laboratório Biodiversidade em Saúde da Fiocruz Amazônia - Instituto Leônidas & Maria Deane, e foram submetidos ao processamento através do teste imunológico ELISA.

O ensaio de imunoabsorção enzimático indireto (ELISA) foi realizado como método de avaliação da resposta imune humoral do peptídeo administrado, os anticorpos dos soros dos camundongos foram testados para anticorpos sistêmicos da classe Imunoglobulinas G (IgG).

Para a execução do ELISA indireto todas as amostras foram testadas em duplicatas utilizando microplacas de 96 poços, de alta capacidade de adsorção. A sensibilização das placas foi realizada com 5 µg do peptídeo P2 acoplado com BSA (albumina sérica bovina), diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), e deixado *overnight* por 16 horas a 4 °C. Após esse processo, a placa foi lavada três vezes com solução de lavagem (PBS e Tween 0,05%). Os sítios livres foram bloqueados com 200 µL de PBS 1X e BSA 3% e incubados a 37°C por 2 horas. Foram distribuídos nos poços, 50 µL dos soros testes, diluídos em 1/100 no mesmo tampão de bloqueio, onde permaneceram por 60 minutos à 37°C, em câmara úmida. Após a lavagem com PBS 1X Tween 0,05% (seis vezes) foi adicionado 50 µL do conjugado anti IgG-Mouse biotilado KPL diluído em 1:2000 no mesmo tampão de bloqueio, e incubados a 37 °C em câmara úmida por 1h, seguido de 3 lavagens com solução de lavagem. Foram distribuídos nos poços 50 µL de estreptavidina KPL diluída 1/2000 em tampão de bloqueio, e mantido sob as mesmas condições de incubação, por 1 hora. Em seguida a placa foi lavada como já descrito, e as reações foram reveladas pela adição em cada poço de 50 µL do substrato, uma solução de Tetrametilbenzidina 1M (TMB – Sigma) e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) por 10 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ a 2M. A leitura da densidade óptica foi determinada utilizando uma leitora de ELISA (*Thermo*®) a 450 nm de comprimento de onda.

4.8 Análises estatísticas

Os dados estatísticos foram analisados utilizando o software R na versão 4.0.2, usando o Rstudio 1.1.4, com pacotes diversos (tidyverse, lme4, sjPlot e hnp), e nível de significância estatística com P value menor 0.05.

Foi empregado um teste de regressão linear com efeito aleatório, onde o efeito aleatório é colocado nas medidas retiradas de cada camundongo, devido aos dados apresentarem dependência longitudinal.

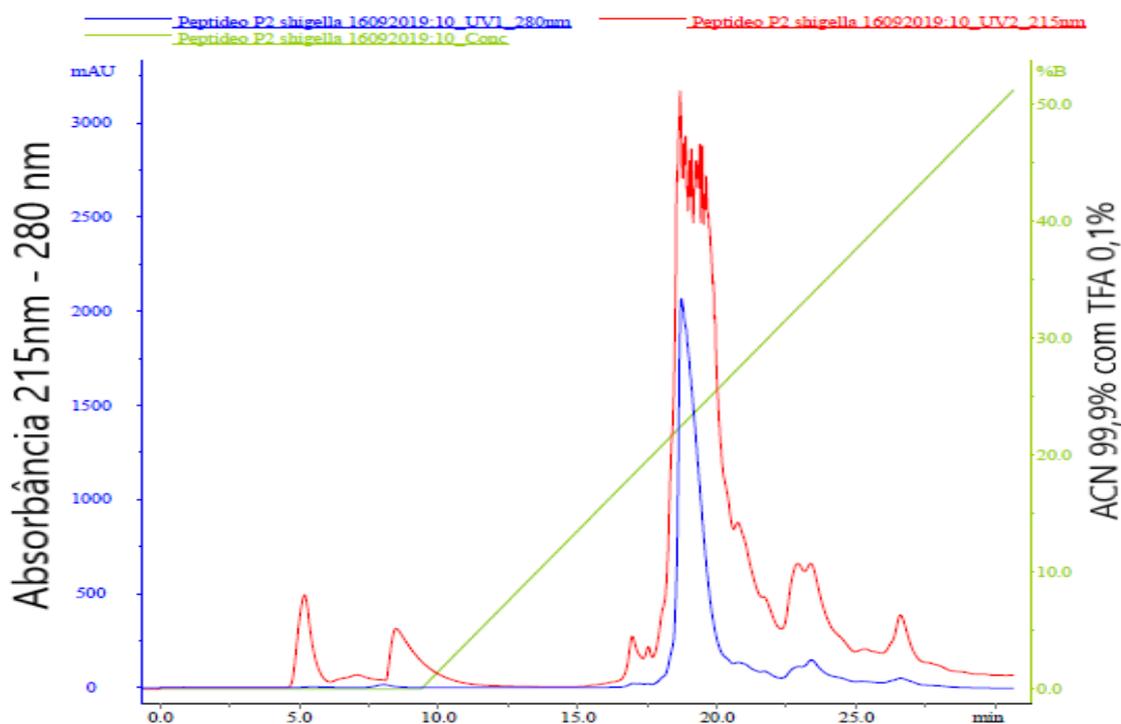
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Purificação do peptídeo

Para avaliação da integridade do peptídeo sintético, uma fração deste foi submetida a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), e os resultados obtidos foram analisados de acordo com o tempo de retenção das amostras na coluna C18.

Na figura 06, o perfil cromatográfico demonstrou picos após 16 min de eluição (eixo X, cor preta) e com 23,5% de acetonitrila (eixo Y, cor verde) monitorado com o comprimento de onda de 215 nm (perfil na cor vermelha), característicos da presença de peptídeos (CONCEIÇÃO et al., 2018); e picos monitorados com comprimento de onda de 280 nm (perfil na cor azul), característicos da presença de aminoácidos com anéis aromáticos. Deste modo, a não identificação de outros compostos na fração peptídica analisada após submissão em CLAE-FR confirma a pureza do mesmo.

Figura 06 – Perfil cromatográfico de P2 em coluna de fase reversa C18. Peptídeo submetido a análise em CLAE-RF para confirmação de sua pureza.

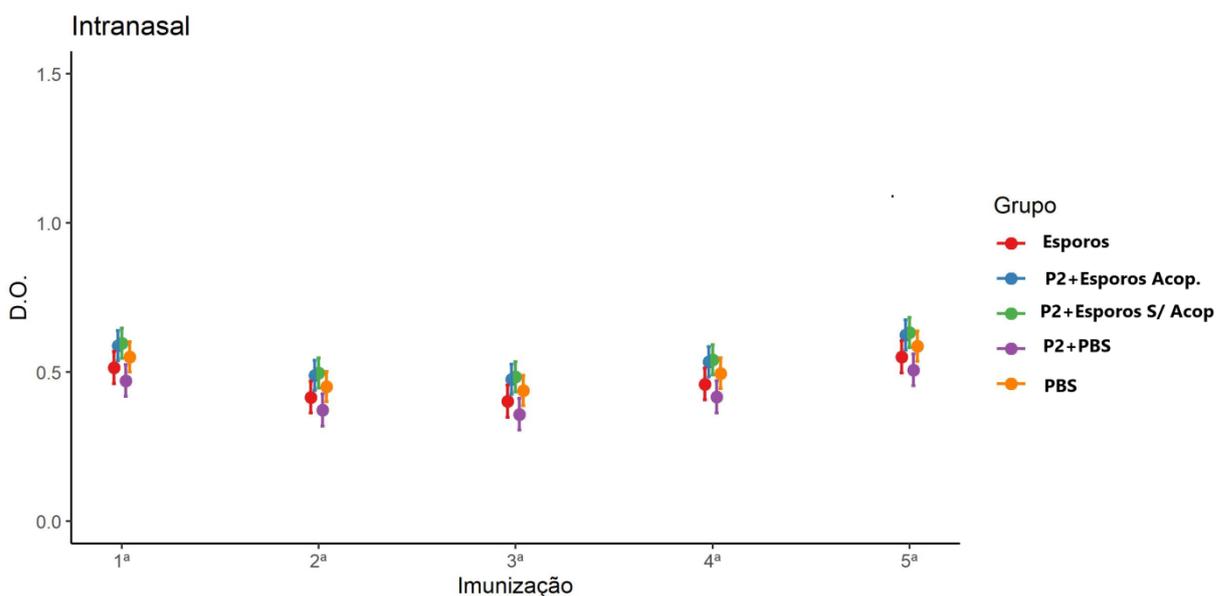


5.2 Avaliação dos anticorpos IgG anti-peptídeo via Intranasal

A imunização por via intranasal utilizando esporos de *Bacillus subtilis* como carreador para P2, demonstrou níveis baixos de IgG sérico em todos os grupos testados. Na figura 07, pode se observar que os valores médios da densidade óptica (D.O.) caracterizam uma suave curva em parábola, onde a 1ª imunização difere da 2ª, 3ª e 4ª imunização, contudo não difere da 5ª imunização.

Os grupos controles (PBS, P2+PBS e Esporos de *B. subtilis*) e os grupos testes (P2+Esporos Acoplado e P2+Esporos Sem Acoplamento) não apresentaram diferenças significativas de anticorpos IgG entre si. No entanto, os grupos P2+Esporos Acoplado e P2+Esporos Sem Acoplamento demonstraram níveis moderadamente acima dos demais, denotando a relevância para o uso do peptídeo e esporos na via utilizada.

Figura 07 – ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das 5 imunizações por via Intranasal. O teste empregado foi o de regressão linear com intervalo de confiança de 95%.



O delineamento desta pesquisa se baseou no estudo realizado por Pore et al., (2011) que demonstrou uma potente imunidade protetora para pneumonia pulmonar, e altos níveis de imunidade sistêmica e de mucosa, em camundongos quando vacinados com a proteína OmpA de forma intranasal. No entanto, como dito anteriormente, nossos resultados não revelaram respostas imunológicas

significativas. Esta dificuldade na elicitaco das respostas imunolgicas sistmicas pode ser devido a seleo do sistema carreador ou ainda a seleo do antígeno empregado.

No estudo proposto por Pore et al., (2011) a proteína OmpA foi alocada no interior das lipossomas (vesículas fosfolipídicas) que atuaram como estrutura carreadora, diferentemente do nosso grupo que empregou a adsoro do peptídeo sintético P2 a superfície dos esporos de *B. subtilis*. As lipossomas so descritas como um eficiente carreador vacinal de modo intranasal devido a excelente versatilidade no transporte de diferentes tipos de antígenos (DAI et al., 2020; MAI et al., 2020; QU et al., 2018). De mesmo modo, o uso de esporos de *B. subtilis* j foi evidenciado em diversos estudos como um modelo eficaz capaz de gerar anticorpos sistêmicos e de mucosa (POTOCKI et al., 2017; AMUGUNI e TZUPORI, 2012; BARNES et al., 2007), além de ser um método no-invasivo, seguro e de baixo custo (FUJIHASHI et al., 2002). Entretanto mesmo com considerveis vantagens, estes no foram capazes de estimular o sistema imune contra o peptídeo P2 através da metodologia aqui empregada.

Acreditamos que a adsoro de P2 a superfície dos esporos no tenha sido efetiva, dificultando assim a elicitaco das respostas imunes no organismo, provavelmente por isso todos os grupos apresentaram níveis de anticorpos similares.

A seleo do tipo de antígeno representa um ponto importante, visto que estes devem mimetizar uma infeco natural, através da ativao de linfócitos B e/ou T, que so determinantes para o desenvolvimento das respostas humoral e celular, respectivamente (CHAGAS et al., 2019). Pore et al., (2011) utilizou a proteína nativa e recombinante de OmpA, que foram antígenos eficazes quanto a produo de anticorpos IgG e IgA. Contudo, nesta pesquisa o peptídeo sintético no foi apresentado ao sistema imunolgico, logo uma alternativa para facilitar esta apresentao do antígeno utilizando os esporos, seria a expresso de OmpA na superfície dos esporos de *B. subtilis*. Uma metodologia semelhante com resultados satisfatórios foi realizada por Yagnik et al., (2017) que imunizou camundongos de modo intranasal com OmpA oriunda de *Shigella dysenteriae* tipo 1 expressas por *Lactococcus lactis* recombinante.

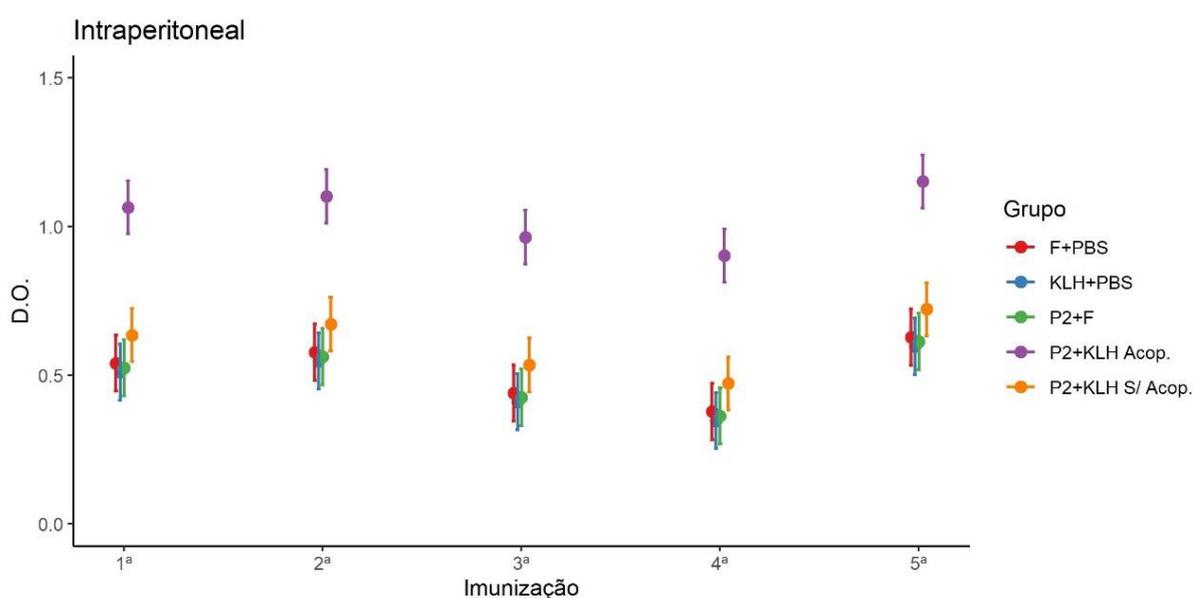
Vale ressaltar, que a aplicação de vacinas por via intranasal possui vantagens esperadas, como forte imunidade de mucosa e respostas imunes sistêmicas, que atuam como primeira defesa contra infecções instituídas em mucosas (WANG et al., 2015).

Dessa forma, a utilização desta via para aplicação vacinal, pode não ser de todo modo desprezada, uma vez que a reformulação da metodologia empregada possibilita resultados eficazes na proteção imunitária do hospedeiro ao patógeno.

5.3 Avaliação dos anticorpos IgG anti-peptídeo via Intraperitoneal

As imunizações intraperitoneais apresentaram níveis de anticorpos anti-peptídeo satisfatórios no grupo teste P2+KLH Acoplado, observado na Figura 08. O segundo grupo teste P2+KLH Sem Acoplamento, não alcançou resultados próximos a P2+KLH Acoplado, porém atingiu níveis relativamente superiores aos obtidos pelos grupos controles. Isso demonstra a importância da realização do acoplamento do peptídeo com a proteína carreadora mediante as reações de ligação covalente utilizando os reagentes EDAC, NHS, MOPS e água Milli-Q.

Figura 08 – ELISA anti-mouse IgG anti-peptídeo das 5 imunizações por via Intraperitoneal. O teste empregado foi o de regressão linear com intervalo de confiança de 95%.



Os grupos controles P2+F, F+PBS e KLH+PBS, apresentaram níveis semelhantes entre si nos soros coletados nas 5 imunizações. Ainda assim, o grupo P2+F demonstrou o menor percentual de anticorpos, que pode ser justificado pelo fato de o peptídeo ser pouco imunogênico quando sozinho, e para isto se faz necessário o uso do complexo carreador e adjuvante, e estes devem ser capazes de incitar o sistema imunológico e simultaneamente proteger contra degradações externas e transportar o antígeno até o local tencionado (SKWARCZYNSKI e TOTH, 2016)

A proteína OmpA quando isolada de *S. flexneri* 2a, possui propriedades imunogênicas e protetoras, que as classificam como um antígeno vacinal (PORE et al., 2011), eficiente na ativação das células B e modulação da resposta imune humoral (BHOWMICK et al., 2014). Diante disso, Souza, (2018) demonstrou a capacidade de P2 em incitar níveis relevantes de anticorpos IgG anti-peptídeos nos camundongos, de mesmo modo a produção de anticorpos sistêmicos e reconhecimento elevado de epítomos de OmpA presente nos diferentes isolados de *S. flexneri* também foi evidenciado no trabalho de Pardo, (2016). Assim ambos os estudos corroboram os resultados desta pesquisa, uma vez que o grupo de camundongos imunizados com P2+KLH Acoplado atingiu elevada dosagem de anticorpos sistêmicos desde a 1ª imunização.

De mesmo modo, os resultados obtidos nesta pesquisa assemelham-se aos já descritos anteriormente nos trabalhos de Jarzab et al., (2013) e (2018), no qual os soros dos camundongos atingiram altos níveis de anticorpos IgG após regime de imunização intraperitoneal com um peptídeo cíclico oriundo da proteína OmpC.

5.4 Mensuração de peso e vigilância de morte dos camundongos após o desafio com *S. flexneri* 5a M90T

Os camundongos foram monitorados quanto a variação de peso após o desafio com cepa virulenta de *S. flexneri* 5a M90T. Para esta análise o peso inicial antes de serem desafiados (Peso 0) foi empregado como parâmetro comparativo em relação ao peso final pós-desafio (14 dias) de cada camundongo em seu respectivo grupo.

Essa mensuração tem por finalidade avaliar a perda de peso ocasionada pela infecção com dose letal de 1×10^8 de *S. flexneri* 5a M90T e posterior recuperação do peso, caso haja proteção imunológica efetiva pela via de imunização utilizada. A dose letal empregada de 1×10^8 de patógenos é a mais eficiente em acarretar diarreia severa e estimular respostas inflamatórias nas duas vias de imunização (SHARMA et al., 2017).

Paralelo a mensuração dos pesos, foram realizadas coletas dos órgãos (pulmão e baço) dos grupos de camundongos, e estes armazenados em tubos falcons com formol a 10% para posterior análises histológicas. Seguindo o regime de coleta foram eutanasiados: 20 camundongos anterior ao desafio (2 indivíduos para cada um dos 5 grupos por via utilizada); camundongos com peso inferior a 20g no período de até 72 horas posterior ao desafio; e 20 camundongos ao final de 14 dias (2 indivíduos para cada um dos 5 grupos por via), demonstrado na tabela 3. Entretanto estas análises não puderam ser realizadas devido ao fechamento da UFAM como medida de prevenção a propagação de Covid-19.

Tabela 3 – Regime de eutanásia e coleta de sangue dos camundongos.

Tempo	Intraperitoneal	Intranasal
PRÉ (Anterior ao Desafio)	2 animais para cada um dos 5 grupos = 10 camundongos	2 animais para cada um dos 5 grupos = 10 camundongos
PÓS 1 (Até 72 hrs após o desafio)	Animais com fortes sintomas de shigelose ou peso inferior a 20 g.	Animais com fortes sintomas de shigelose ou peso inferior a 20 g.
PÓS 2 (14 dias após o desafio)	2 animais para cada um dos 5 grupos = 10 camundongos	2 animais para cada um dos 5 grupos = 10 camundongos

Analisando os resultados dispostos na Figura 09, observa-se que todos os grupos de camundongos imunizados de modo intranasal perderam peso de forma gradativa durante os dias mensurados. Diferentemente, os grupos de camundongos

imunizados de modo intraperitoneal, apresentaram uma recuperação gradual nos pesos aferidos (Figura 10).

Figura 09 – Média de peso dos grupos nos dias mensurados para a via Intranasal. Os camundongos foram observados em 24h, 48h, 72h e 14 dias após a infecção desafio.

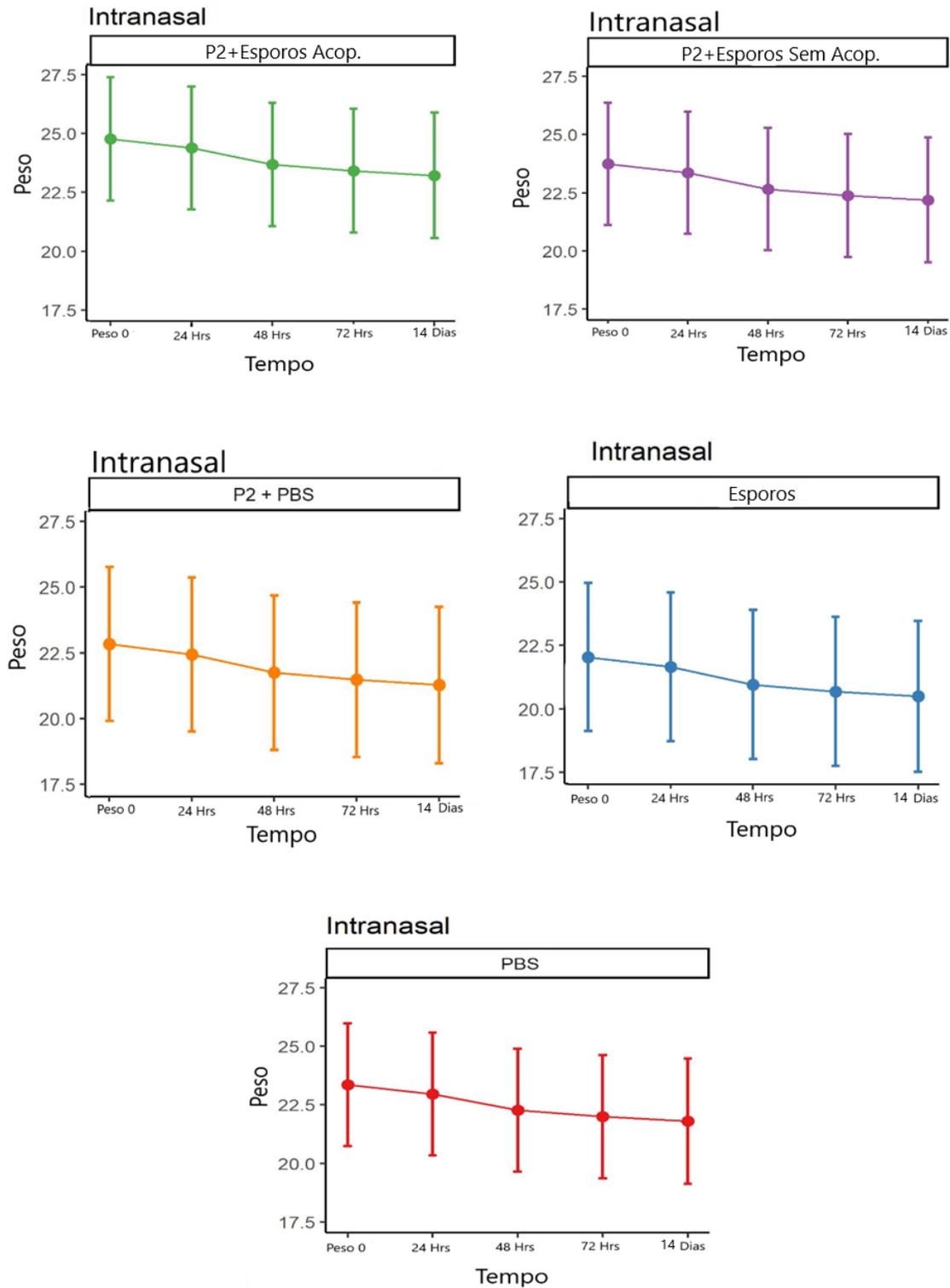
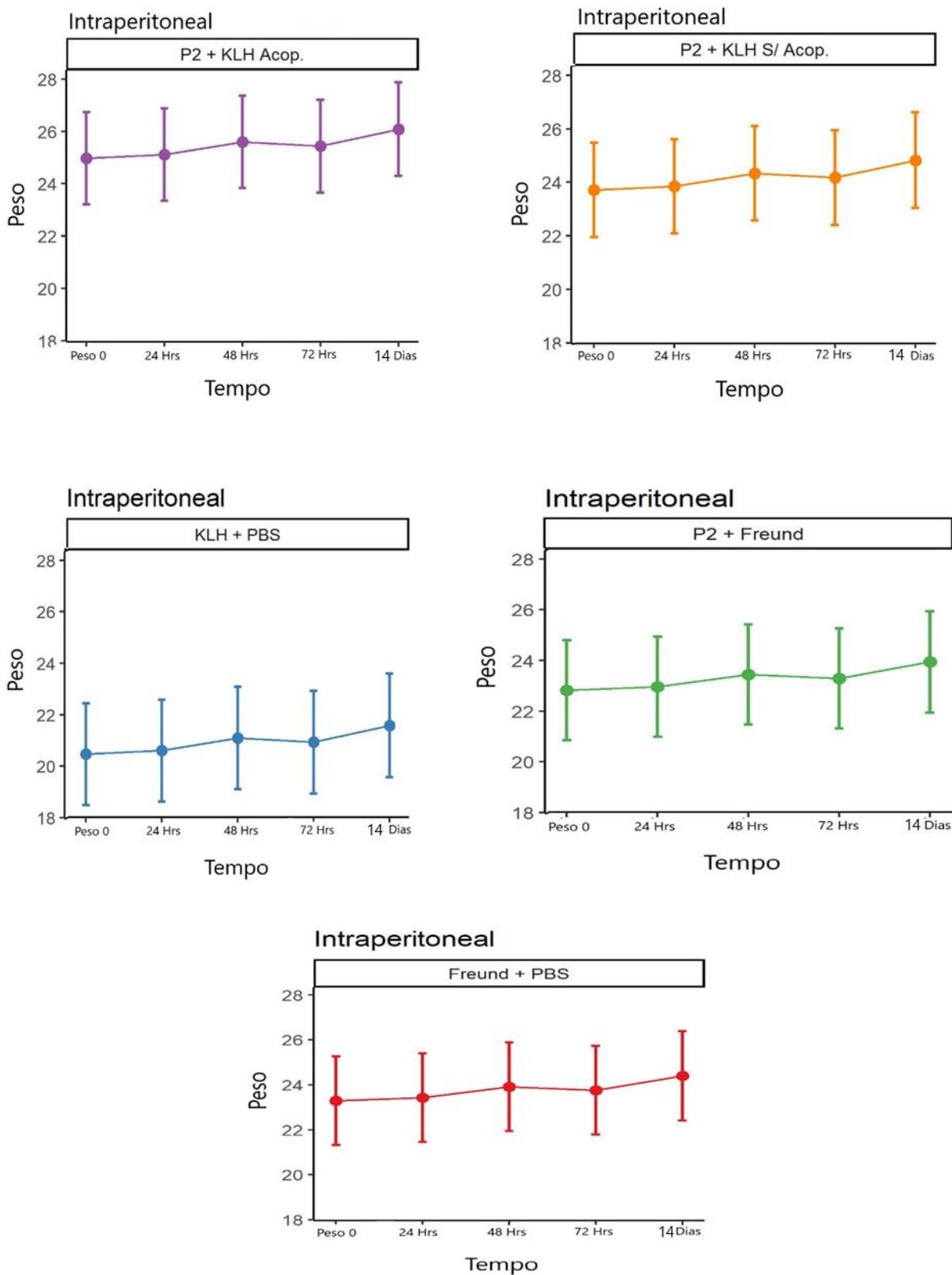


Figura 10 – Média de peso dos grupos nos dias mensurados para a via Intraperitoneal. Os camundongos foram observados em 24h, 48h, 72h e 14 dias após a infecção desafio.



No estudo de Pore et al., (2011), no 7º dia após o desafio, os camundongos recuperaram 60% do peso inicial, e taxa de sobrevivência de 100% entre os indivíduos, inferindo em uma forte capacidade protetora frente a infecção por *Shigella*. Posto isto, os dados obtidos neste trabalho, remetem a uma ineficiente capacidade protetora nos camundongos quando imunizados pela via intranasal utilizando P2 adsorvidos na superfície dos esporos, isto pode ser notado pela dificuldade quanto a recuperação dos pesos em relação aos pesos iniciais, provavelmente devido aos baixos níveis de anticorpos produzidos por essa via, uma vez que os esporos de *B. subtilis* não foram eficazes como um complexo *delivery* do peptídeo ao sistema imunológico do hospedeiro.

Outro indicativo para esta ineficaz proteção, pode ser constatada pelo alto número de mortes nos grupos imunizados de modo intranasal, durante os dias após o desafio, sendo 10 animais, enquanto nos grupos intraperitoneais somente 3 camundongos morreram, demonstrado na Tabela 4. Porém, entre os grupos imunizados de modo intraperitoneal, o grupo controle KLH+PBS apresentou mais mortes, com um total de 75% de camundongos mortos após o desafio. A alta mortalidade observada neste grupo, sugere que a proteção efetiva contra a shigelose observada no grupo P2+KLH Acoplada pode ser atribuída a produção de anticorpos IgG específicos para o peptídeo sintético desenhado a partir da proteína OmpA. Estes resultados são similares aos já descritos por Jarzab et al., (2018), onde a produção de anticorpos IgG de alta afinidade para *S. flexneri* foram obtidas após imunização intraperitoneal com peptídeos cíclicos delineados a partir da proteína OmpC.

No trabalho realizado por Souza, (2018), os camundongos desafiados com a cepa virulenta M90T, demonstraram recuperação significativa dos pesos, com valores próximos ao peso inicial, quando previamente imunizados pela via intraperitoneal com o peptídeo P2. O mesmo ocorreu neste estudo com os grupos de camundongos imunizados de modo intraperitoneal, por conseguinte corroborando a eficiência de P2 como um candidato vacinal ao conferir proteção imunitária nos animais contra *Shigella*.

Estas mesmas propriedades protetoras de peptídeos derivados de OMPs em camundongos desafiados com *Shigella*, foram observadas na pesquisa de Jarzab et

al., (2013), que ao tratar camundongos com sequências de peptídeos oriundos de OmpC pela via intraperitoneal e subcutânea, pode constatar que os únicos animais sobreviventes foram os imunizados de modo intraperitoneal, denotando assim a relevância da via utilizada na eliciação da resposta imune.

Posto isto, a proteção imunitária adquirida por estes animais pode ser atribuída aos anticorpos sistêmicos anti-peptídeo incitados pela imunização via intraperitoneal, em níveis moderadamente mais elevados em relação aos anticorpos obtidos de modo intranasal.

Tabela 4 – Número de camundongos mortos por grupo nos tempos observados para cada via de imunização utilizada.

INTRAPERITONEAL						
<i>Grupo</i>	Nº de Camundongos	24h	48h	72h	14 dias	Total de mortos
<i>P2 + KLH + Freund Sem Acoplar</i>	5	0	0	0	0	0
<i>P2 + KLH + Freund Acoplado</i>	5	0	0	0	0	0
<i>KLH + PBS</i>	4	0	2	1	0	3
<i>P2 + Freund</i>	4	0	0	0	0	0
<i>Freund + PBS</i>	4	0	0	0	0	0
INTRANASAL						
<i>Grupo</i>	Nº de Camundongos	24h	48h	72h	14 dias	Total de mortos
<i>P2 + Esporos de B. subtilis Acoplado</i>	5	0	1	1	0	2
<i>P2 + Esporos de B. subtilis Sem Acoplar</i>	5	1	0	1	0	2
<i>Esporos de B. subtilis</i>	4	0	1	0	1	2
<i>P2 + PBS</i>	4	1	0	1	0	2
<i>PBS</i>	5	0	0	1	1	2

5. 5 Avaliação dos anticorpos IgG após o desafio com *S. flexneri* 5a M90T

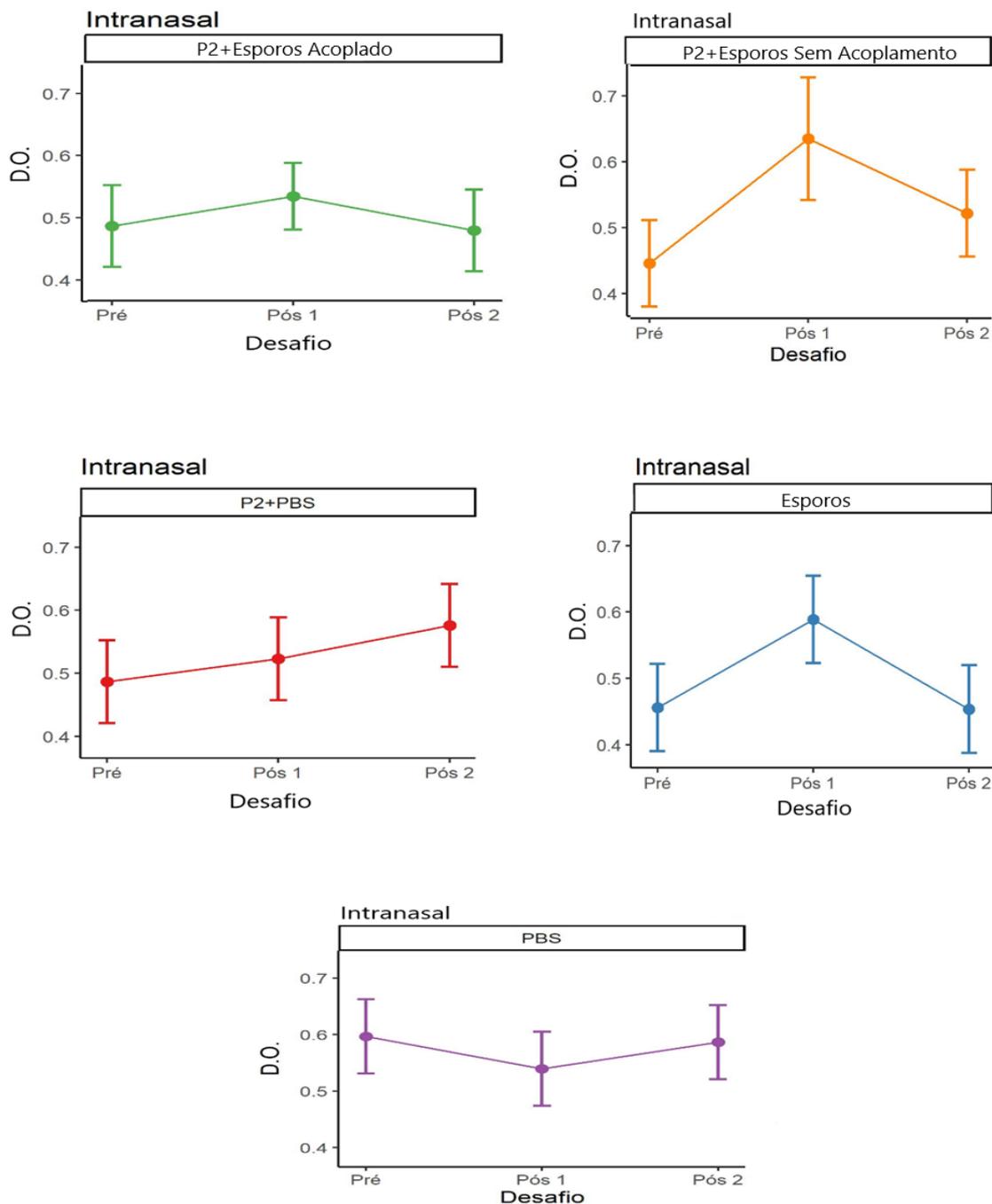
Para avaliação da capacidade protetora adquirida pela imunização com P2 empregando as vias intraperitoneal e intranasal, os grupos de camundongos foram submetidos ao protocolo de infecção desafio, descrito no tópico 5.5, e posteriormente estes foram eutanasiados em diferentes tempos e o sangue coletado para análise dos anticorpos IgG pelo teste de ELISA.

Anterior ao desafio, foram coletados o sangue de 2 indivíduos por grupo nas vias imunizadas (Pré), e no período de até 72 hrs foram coletados o sangue de animais apresentando fortes sintomas de shigelose ou peso inferior a 20g (Pós 1). Por último foram coletados o sangue de 2 indivíduos sobreviventes até 21 dias após o desafio (Pós 2).

Analisando os gráficos obtidos pela via intranasal dispostos na figura 12, observamos nos grupos testes P2+Esporos de *B. subtilis* Acoplado e P2+Esporos de *B. subtilis* Sem Acoplamento um aumento da resposta imunitária do tempo Pré para Pós 1, e posteriormente um declínio desta resposta em Pós 2, sugerindo uma leve proteção contra shigelose.

Entretanto os grupos controles apresentaram resultados similares quando comparado aos grupos testes, assinalando a pouca eficiência da resposta imunitária conferida por esta via de imunização utilizada. Diferentemente, o estudo de Pore et al., 2011, com o grupo teste demonstrou uma progressão dos níveis de anticorpos sistêmicos (IgG) e de mucosa (IgA) desde a primeira imunização até o desafio, além da elicitação significativa de antígenos específicos para OmpA, mediante a administração intranasal da proteína recombinante OmpA em camundongos, enquanto o grupo salino (controle) apresentou baixa titulação de ambos anticorpos (IgG e IgA).

Figura 11 – ELISA dos anticorpos IgG após o desafio com cepa virulenta de *Shigella flexneri* 5a M90T por via Intranasal. Pré – sangue dos camundongos coletados antes do desafio. Pós 1 – sangue coletado até 72 hrs posterior ao desafio. Pós 2 – sangue coletado ao final de 14 dias após o desafio.

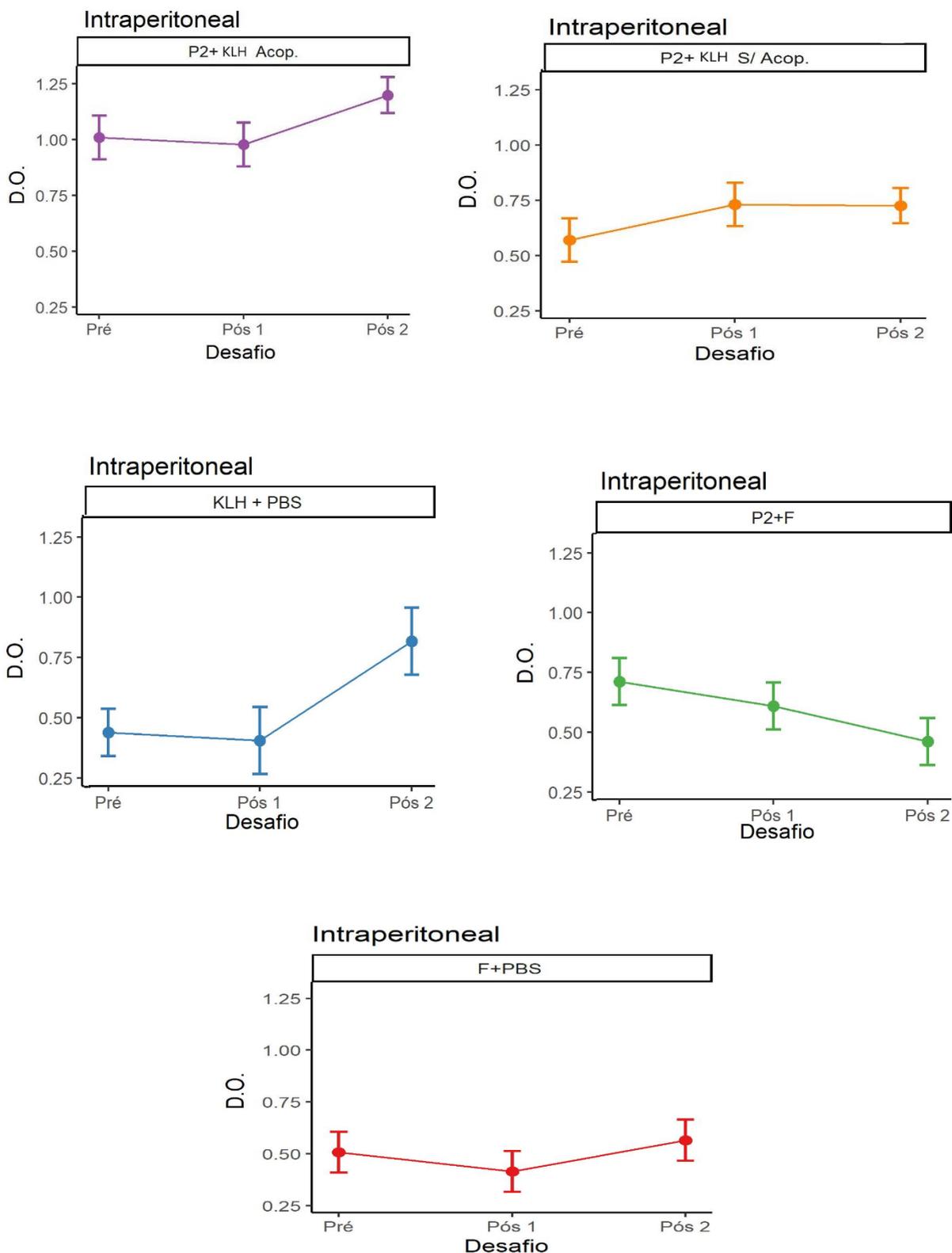


Na análise dos gráficos da via intraperitoneal (figura 13) o grupo teste P2+KLH Sem Acoplamento apresentou níveis de anticorpos relativamente elevados quando comparado com os grupos controles (P2+F, F+PBS e KLH+PBS). Em contrapartida, o grupo teste P2+KLH Acoplado se destaca entre os demais grupos com altos níveis de anticorpos IgG antes ao desafio (Pré) e após o desafio nos dois tempos averiguados (Pós 1 e Pós 2), denotando a eficiência protetora promovida pelo peptídeo, também ratificada pela recuperação do peso dos camundongos neste grupo, uma vez que a vacina ideal deve ser capaz de produzir no hospedeiro altas respostas sistêmicas e específicas no local da infecção (LI et al., 2019). Esta capacidade protetora de P2 acoplado a proteína KLH quando administrado de modo intraperitoneal já foi evidenciada por Souza, (2018) no qual os soros dos camundongos alcançaram altas dosagens de anticorpos IgG, e expressão de interleucinas como IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-17, essenciais para a determinação da proteção eficiente a patógenos específicos (KIDD et al., 2003), além de taxa de 100% de sobrevivência quando infectados com a cepa virulenta.

No trabalho realizado por Jarzab et al., (2018) os camundongos não alcançaram um número satisfatório de sobreviventes após administração de uma dose letal de bactérias, onde mesmo com altos níveis de anticorpos IgG específicos anti-OmpC, os anticorpos monoclonais apresentaram dificuldades na proteção contra *S. flexneri* 3a, provavelmente devido a uma fraca opsonização ao patógeno. Diferentemente, nesta pesquisa a imunização de modo intraperitoneal resultou em bons níveis de anticorpos IgG anterior e posterior ao desafio, como também proteção satisfatória frente ao patógeno, sugerindo possivelmente uma opsonização eficiente a *S. flexneri* 5a.

Resultados similares foram evidenciados por PADH et al., (2021), no qual camundongos demonstraram significativas respostas humoral IgG e IgA, além de proteção imunitária bem-sucedida frente a infecção atenuada com *Shigella*, após imunização com um candidato vacinal sintetizado quimicamente com 5 peptídeos oriundos de regiões conservadas das proteínas OmpA e OmpC denominado EpiMix.

Figura 12 – ELISA dos anticorpos IgG após o desafio com cepa virulenta de *Shigella flexneri* 5a M90T por via Intraperitoneal. Pré – sangue dos camundongos coletados antes do desafio. Pós 1 – sangue coletado até 72 hrs posterior ao desafio. Pós 2 – sangue coletado ao final de 14 dias após o desafio.



Vale ressaltar, que as proteínas de membrana externa são fatores imunogênicos amplamente empregados no desenvolvimento de vacinas (HAJIALIBEIGI et al., 2021; PORE e CHAKRABRATI, 2013). Os peptídeos delineados a partir de epítomos expostos nas superfícies destas proteínas configuram um alvo importante como candidatos vacinais capaz de induzir a resposta imune celular e humoral (HAJIALIBEIGI et al., 2021; FARHANI et al., 2019).

Diante disso, inúmeros estudos demonstraram em modelo murino a capacidade de elicitar respostas imunes de mucosa e sistêmicas quando utilizada a via intranasal (RODRIGUES et al., 2020; SEM-KILIC et al., 2019; NAEEM et al., 2018), e o mesmo pode ser observado pela via intraperitoneal (AKBAR et al., 2018; OVERGAARD et al., 2017), contudo nesta pesquisa ao traçar um comparativo entre as duas vias, pode se constatar que a imunização intraperitoneal destaca-se com melhor eficiência quanto a produção de anticorpos IgG e proteção imunitária frente a shigelose.

Assim sendo, o peptídeo sintético P2 quando administrado de modo intraperitoneal revelou o seu potencial uso vacinal, denotando ser um promissor candidato à vacina contra infecções ocasionadas por espécies de *Shigella*.

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados alcançados neste trabalho, concluímos que:

- A metodologia empregada para separação do peptídeo sintético P2 permitiu a obtenção desta molécula com grau de pureza satisfatório para realização dos ensaios de estimulação do sistema imune humoral dos camundongos.
- O peptídeo P2 quando inoculado em camundongos de modo intraperitoneal utilizando a proteína carreadora KLH, evidenciou seu potencial imunogênico através da estimulação da resposta imune humoral conferindo proteção efetiva ao hospedeiro quando desafiado com cepa virulenta de *Shigella*.
- A imunização pela via intranasal utilizando esporos de *Bacillus subtilis* como carreadores de P2 não demonstrou níveis satisfatórios quanto a produção de anticorpos IgG, inferindo em uma baixa capacidade de proteção imunológica frente a infecção desafio com *Shigella*.

7. PERSPECTIVAS

A realização deste trabalho, denota o potencial vacinal deste peptídeo sintético oriundo de OmpA, permitindo que outras pesquisas sejam efetivadas a fim de buscar novas estratégias vacinais, tais como:

- Realizar a imunização intranasal utilizando lipossomas como carreadores dos peptídeos sintéticos de OmpA de *Shigella flexneri*.
- Investigar o potencial de *B. subtilis* como carreador, por meio da expressão da proteína OmpA em sua superfície.
- Avaliar o perfil das citocinas secretadas, anterior e posterior ao desafio com cepa virulenta de *S. flexneri* nas 2 vias de imunização estabelecidas.
- Realizar análise imuno-histoquímica de tecidos dos órgãos (baço e pulmão) dos camundongos desafiados.
- Estabelecer método de imunização via oral em camundongos.
- Traçar comparativo entre as vias oral, intranasal e intraperitoneal.
- Testar novos peptídeos oriundos de proteínas, como OmpA e FimH.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABKAR, Morteza et al. Intraperitoneal immunization with Urease loaded N-trimethyl Chitosan nanoparticles elicits high protection against *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* infections. **Immunology letters**, v. 199, p. 53-60, 2018.

ADAM, P. R.; PICKING, W. D. *Shigella* and shigellosis. **Shigella**, p. 7, 2016.

AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168, p. 57–62, 2014.

ALVES, Kessia Caroline Souza et al. *Bacillus subtilis*: uma versátil ferramenta biotecnológica. **Scientia Amazonia**, v. 7, n. 2, p. 15-23, 2018.

AMBROSI, C. 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.

AMUGUNI, Hellen; TZIPORI, Saul. *Bacillus subtilis*: a temperature resistant and needle free delivery system of immunogens. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 8, n. 7, p. 979-986, 2012.

ANAND, Y; PANDE, S; GORE, D. Reverse vaccinology: An approach to search vaccine leads of *Shigella sonnei*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7, n. 7, p. 576-581, 2013.

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.

ASHIDA, H.; OGAWA, M.; KIM, M.; SUZUKI, S.; SANADA, T.; PUNGINELLI, C.; ... SASAKAWA, C. *Shigella* deploy multiple countermeasures against host innate immune responses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n.1, p. 16–23, 2011.

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

BARNES, Andrew GC et al. *Bacillus subtilis* spores: a novel microparticle adjuvant which can instruct a balanced Th1 and Th2 immune response to specific antigen. **European journal of immunology**, v. 37, n. 6, p. 1538-1547, 2007

BARRANTES, K; ACHÍ, R. The importance of integrons for development and propagation of resistance in *Shigella*: the case of Latin America. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 4, p. 800-806, 2016.

BASEER, Shehneela et al. Towards a peptide-based vaccine against *Shigella sonnei*: A subtractive reverse vaccinology based approach. **Biologicals**, v. 50, p. 87-99, 2017.

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

BERGSBAKEN, T; FINK, S. L, COOKSON, B. T.: Pyroptosis: Host cell death and inflammation. **Nat Ver Microbiol**.v. 7, p. 99-109, 2009.

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, p. 109-107, 2014.

BONA, M. D. Infecção por *Shigella/escherichia coli* enteroinvasiva, genes de virulência e copatógenos em crianças de estudo caso-controle no semiárido brasileiro. 114 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

BRAVO, V. et al. Distinct mutations led to inactivation of type 1 fimbriae expression in *Shigella* spp. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0121785, 2015.

BOWEN, A. et al. Importation and domestic transmission of *Shigella sonnei* resistant to ciprofloxacin-United States, May 2014-February 2015. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 64, n. 12, p. 318-320, 2015.

CAMACHO, A. I.; IRACHE, J. M.; GAMAZO, C. Recent progress towards development of a *Shigella* vaccine. **Expert review of vaccines**, v. 12, n. 1, p. 43-55, 2013.

CDC. *Shigella* - Shigellosis, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/shigella/symptoms.html/>. Acessado em: 07/02/2019.

CHAGAS, Sarah Rodrigues et al. Vacinas e suas reações adversas: revisão. **Pubvet**, v. 13, p. 153, 2019.

CHANDRASEKARAN, L. et al. A study of different buffers to maximize viability of an oral *Shigella* vaccine. **Vaccine**, v. 33, n. 46, p. 6156-6160, 2015.

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.

CHITRADEVI, S. T. S. et al. Development of recombinant vaccine candidate molecule against Shigella infection. **Vaccine**, v. 34, n. 44, p. 5376-5383, 2016.

CONCEIÇÃO, Milena Barbosa da. Síntese e estrutura do peptídeo antimicrobiano Pantinina-3 e de seus análogos. 2018.

CONFER, A. W.; AYALEW, S. The OmpA family of proteins: roles in bacterial pathogenesis and immunity. **Veterinary microbiology**, v. 163, n. 3-4, p. 207-222, 2013.

CRUZ, C. B. N. et al. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed research international**, 2014, 2014.

DAI, Charles C. et al. Polyethylenimine: an intranasal adjuvant for liposomal peptide-based subunit vaccine against Group A Streptococcus. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 9, p. 2502-2512, 2020.

DCDIA. Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia - Instituto Leônidas e Maria Deane - Fiocruz Amazônia. 2017.

FARHANI, Ibrahim; NEZAFAT, Navid; MAHMOODI, Shirin. Designing a novel multi-epitope peptide vaccine against pathogenic Shigella spp. based immunoinformatics approaches. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p. 541-553, 2019.

FERNANDEZ, M. I. et al. A newborn mouse model for the study of intestinal pathogenesis of shigellosis. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 7, p. 481-491, 2003.

FONTAINE, A.; ARONDEL, J.; SANSONETTI, P. J. Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery, studied by using a Tox-mutant of Shigella dysenteriae 1. **Infection and immunity**, v. 56, n. 12, p. 3099-3109, 1988.

FRANCISCO, Maria Isabella Spindola et al. FREQUENCIAS DAS OCORRÊNCIAS DE ÓBITOS POR SHIGELOSE NAS DIFERENTES MACRORREGIÕES DO BRASIL. In: **Anais Colóquio Estadual de Pesquisa Multidisciplinar (ISSN-2527-2500) & Congresso Nacional de Pesquisa Multidisciplinar**. 2018.

FUJIHASHI, Kohtaro et al. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. **Vaccine**, v. 20, n. 19-20, p. 2431-2438, 2002.

GIRARDIN, S. E. et al. CARD4/Nod1 mediates NF- κ B and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. **EMBO reports**, v. 2, n. 8, p. 736-742, 2001.

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

GU, B. et al. Comparison of resistance to third-generation cephalosporins in *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2012. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 13, p. 2687-2699, 2015.

GUERRANT, R. L. et al. Malnutrition as an enteric infectious disease with long-term effects on child development. **Nutrition reviews**, v. 66, n. 9, p. 487-505, 2008.

GUPTA, A. K. et al. Phylogenetic characterization of bacteria in the gut of house flies (*Musca domestica* L.). **FEMS microbiology ecology**, v. 79, n. 3, p. 581-593, 2012.

HAHN, E. *et al.* Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 *pili*. **Journal of molecular biology**, v. 323, n. 5, p. 845-857, 2002.

HAJIALIBEIGI, Abolfazl; AMANI, Jafar; GARGARI, Seyed Latif Mousavi. Identification and evaluation of novel vaccine candidates against *Shigella flexneri* through reverse vaccinology approach. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 3, p. 1159-1173, 2021.

HOLT, K.E. et al. *Shigella sonnei* genome sequencing and phylogenetic analysis indicate recent global dissemination from Europe. **Nature Genetics.**, v. 44, p. 1056-1061, 2012.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L.; MCIVER, C. J. *Plesiomonas shigelloides* revisited. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 2, p. 349-374, 2016.

JARZĄB, A et al. *Shigella flexneri* 3a outer membrane protein C epitope is recognized by human umbilical cord sera and associated with protective activity. **PloS one**, v. 8, n. 8, p. 70539, 2013.

JARZĄB, Anna et al. Cyclic OmpC peptidic epitope conjugated to tetanus toxoid as a potential vaccine candidate against shigellosis. **Vaccine**, v. 36, n. 31, p. 4641-4649, 2018.

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

JHA, P. et al. Disease control priorities in developing countries. **Chapter**, v. 37, p. 707-721, 2013.

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.

JOHNSON, D. I. *Shigella* spp. In: *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors*. Springer, Cham, p. 363-379, 2018.

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

KARAM, M. R. A. et al. Vaccination with recombinant FimH fused with flagellin enhances cellular and humoral immunity against urinary tract infection in mice. **Vaccine**, v. 31, n. 8, p. 1210-1216, 2013.

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

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

KILLACKEY, S. A.; SORBARA, M. T.; GIRARDIN, S. E. Cellular aspects of *Shigella* pathogenesis: focus on the manipulation of host cell processes. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, p. 38, 2016.

KIM, J. Y. et al. *Shigella* vaccine development: prospective animal models and current status. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 14, n. 10, p. 903-912, 2013.

KIRK, M. D., et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis. **PLoS medicine**, v. 12, n. 12, p. 1001921, 2015.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27-35, 2000.

KOTLOFF, K. L. 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, n. 9888, p. 209-222, 2013.

KOTLOFF, K. L. *Shigella* infection in children and adults: a formidable foe. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 12, p. 1166–1167, 2017.

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

KUBLER-KIELB, J. et al. The elucidation of the structure of the core part of the LPS from *Plesiomonas shigelloides* serotype O17 expressing O-polysaccharide chain identical to the *Shigella sonnei* O-chain. **Carbohydrate research**, v. 343, n. 18, p. 3123-3127, 2008.

KUO, C-Y. et al. Antimicrobial susceptibility of *Shigella* isolates in eight Asian countries, 2001-2004. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 41, n. 2, p. 107-111, 2008.

LEE, Y. T.; CHEN, S. C.; CHAN, C. H. Reemergence of Sexually Transmitted Antimicrobial Resistant Shigellosis in Men Who Have Sex with Men. **Int J Clin Med Microbiol**, v. 2, n. 126, p. 2, 2017.

LEOPOLDINO, Janaina Lopes. Ocorrência de doenças diarreicas agudas causadas por *shigella* sp no período de 2014 a 2018 no Brasil. In: **Ocorrência de doenças diarreicas agudas causadas por shigella sp no período de 2014 a 2018 no Brasil**. 2020. p. 43-43.

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

LI, Yan et al. Intranasal immunization with recombinant outer membrane protein A induces protective immune response against *Stenotrophomonas maltophilia* infection. **Plos one**, v. 14, n. 4, p. e0214596, 2019.

LI, W. et al. Peptide vaccine: progress and challenges. **Vaccines**, v. 2, n. 3, p. 515-536, 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.

LIU, B. et al. Structure and genetics of *Shigella* O antigens. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. 627-653, 2008.

LIU, Jie et al. Evaluation of Molecular Serotyping Assays for *Shigella flexneri* Directly on Stool Samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 59, n. 2, p. e02455-20, 2021.

LUNELLI, Michele et al. Cryo-EM structure of the *Shigella* type III needle complex. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 2, p. e1008263, 2020.

MAI, Yaping et al. Intranasal delivery of cationic liposome-protamine complex mRNA vaccine elicits effective anti-tumor immunity. **Cellular immunology**, v. 354, p. 104143, 2020.

MAGGIORE L. et al. Quantitative proteomic analysis of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA) reveals highly pure preparations. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 306, n.2, p. 99-108, 2016.

MARTEYN, B.; GAZI, A.; SANSONETTI, P.J. *Shigella*: a model of virulence regulation in vivo. **Gut microbes**, v. 3 n. 2, p. 104-120, 2015.

MANI, S.; WIERZBA, T.; WALKER, R. I. Status of vaccine research and development for *Shigella*. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2887-2894, 2016.

MEDEIROS, P. H. Q. S.; LIMA, A. Â. M.; GUEDES, M. M.; HAVT, A.; BONA, M. D.; REY, L. C.; ... LIMA, I. F. N. Molecular characterization of virulence and antimicrobial resistance profile of *Shigella* species isolated from children with moderate to severe diarrhea in northeastern Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 3, p. 198–205, 2018.

MITRA, S. et al. Development of a cost-effective vaccine candidate with outer membrane vesicles of a tolA-disrupted *Shigella boydii* strain. **Vaccine**, v. 34, n. 15, p. 1839-1846, 2016.

MOSTOWY, S. et al. The zebrafish as a new model for the in vivo study of *Shigella flexneri* interaction with phagocytes and bacterial autophagy. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 9, p. e1003588, 2013.

MUHIALDIN, Belal J.; ALGBOORY, Hussein L. Identification of low molecular weight antimicrobial peptides from Iraqi camel milk fermented with *Lactobacillus plantarum*. **PharmaNutrition**, v. 6, n. 2, p. 69-73, 2018.

NAEEM, Huma et al. Induction of Th1 type-oriented humoral response through intranasal immunization of mice with SAG1-*Toxoplasma gondii* polymeric nanospheres. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. sup2, p. 1025-1034, 2018.

NEURATH, A. R. et al. Antibodies to a synthetic peptide from the preS 120–145 region of the hepatitis B virus envelope are virus-neutralizing. **Vaccine**, v. 4, n. 1, p. 35-37, 1986.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 43, n. 2, p. 133-143, 2005.

NÜESCH-INDERBINEN, M. et al. *Shigella* antimicrobial drug resistance mechanisms, 2004–2014. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 6, p. 1083, 2016.

OGAWA, M. et al. The versatility of *Shigella* effectors. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 11, 2008.

OLIVEIRA, P. L. **Caracterização de bacteriocina sintetizada por amostra de *Shigella sonnei* isolada de criança com diarreia aguda**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.

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

ORLANDI, P. P et al. Enteropathogens Associated with Diarrheal Disease in Infants of Poor Urban Areas of Porto Velho, Rondônia: a Preliminary Study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.96, n. 5, p. 621-625, 2001.

OVERGAARD, Nana H. et al. Low antigen dose formulated in CAF09 adjuvant Favours a cytotoxic T-cell response following intraperitoneal immunization in Göttingen minipigs. **Vaccine**, v. 35, n. 42, p. 5629-5636, 2017.

PADH, Harish et al. EpiMix Based Novel Vaccine Candidate for Shigella: Evidence of Prophylactic Immunity in Balb/c Mice. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 1095-1110, 2021.

PAIGEN, B. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 2, p. 458S-462S, 1995.

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

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

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

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

PEIRANO, G.; SOUZA, F. S.; RODRIGUES, D. P.; SHIGELLA STUDY GROUP. Frequency of serovars and antimicrobial resistance in *Shigella* spp. from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 245-260, 2006.

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

PORE D.; CHAKRABARTI M. K. An Approach to Identify and Characterize a Subunit Candidate *Shigella* Vaccine Antigen. In: Thomas S. (eds) Vaccine Design. Methods in Molecular Biology, **Humana Press**, v. 1403, 2016.

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

PORE, D. et al. Purification and characterization of an immunogenic outer membrane protein of *Shigella flexneri* 2a. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5855-5864, 2009.

POTOCKI, Wojciech et al. The combination of recombinant and non-recombinant *Bacillus subtilis* spore display technology for presentation of antigen and adjuvant on single spore. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2017.

PUZARI, M.; SHARMA, M.; CHETIA, P. Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. **Journal of infection and public health**, v. 11, n. 4, p. 451-454, 2018.

QU, Wenjing et al. Cationic DDA/TDB liposome as a mucosal vaccine adjuvant for uptake by dendritic cells in vitro induces potent humoral immunity. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. sup1, p. 852-860, 2018.

RAMÍREZ, S. L. Shigelosis (disentería bacilar). **Salud en tabasco**, v. 7, n. 3, p. 0, 2001.

RIVERA ZÁRATE, T. J.; TOVAR OVIEDO, J. Presentación: Caso clínico de la bacteria *Shigella sonnei*. 2017.

RODRIGUES, Gabriela Meira et al. ATUAÇÃO DA ENFERMAGEM NA PREVENÇÃO DA SHIGELOSE. **Revista Liberum accessum**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2020.

RODRIGUES, M. F. et al. Incidência de gastroenterite infantil por *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. **Revista Científica da Faminas**, v. 2, n. 2, 2016.

RODRIGUES DOS SANTOS JUNIOR, Samuel et al. Intranasal Vaccine Using P10 Peptide Complexed within Chitosan Polymeric Nanoparticles as Experimental Therapy for Paracoccidioidomycosis in Murine Model. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 160, 2020.

SAHL, J. W.; MORRIS, C. R.; EMBERGER, J. et al. Defining the phylogenomics of *Shigella* species: A pathway to diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, Manuscrito Aceito e Postado Online em 14 de Janeiro 2015.

SAIMA, A. S. et al. 27. Isolation & identification of *Shigella* species from food and water samples of Quetta, Pakistan. **Pure and Applied Biology (PAB)**, v. 7, n. 1, p. 227-235, 2018.

SASAKAWA, C. A. New paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, v. 86, n. 3, p. 229-243, 2010.

SANSONETTI, P. J. Microbes and Microbial Toxins: Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions. III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 280, p. G319–G323, 2001.

SANSONETTI, P. J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote-eukaryote cross-talks. **FEM Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p.3-14, 2001.

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.

SEN-KILIC, Emel et al. Intranasal peptide-based FpvA-KLH conjugate vaccine protects mice from *Pseudomonas aeruginosa* acute murine pneumonia. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 2497, 2019.

SERIBELLI, A. A. et al. Molecular and phenotypic characterization of strains of *Shigella sonnei* isolated over 31 years suggests the circulation of two prevalent subtypes in São Paulo State, Brazil. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 7, p. 666-677, 2016.

SHARMA, Drashya et al. Shigellosis murine model established by intraperitoneal and intranasal route of administration: a comparative comprehension overview. **Microbes and infection**, v. 19, n. 1, p. 47-54, 2017.

SHIFERAW, B., et al. Trends in population-based active surveillance for shigellosis and demographic variability in FoodNet sites, 1996–1999. **Clinical infectious diseases**, v. 38 Supplement_3, p. S175-S180, 2004.

SIMMS, I. et al. Intensified shigellosis epidemic associated with sexual transmission in men who have sex with men-*Shigella flexneri* and *S. sonnei* in England, 2004 to end of February 2015. **Eurosurveillance**, v. 20, n. 15, p. 21097, 2015.

SMITH, S. G. J. et al. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. **FEMS microbiology letters**, v. 273, n. 1, p. 1-11, 2007.

SOUSA, M. A. B. et al. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. **Apmis**, v. 118, n. 2, p. 125-135, 2010.

SOUSA, M. A. B., 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, n. 1, p. 30-35, 2013.

SOUZA, A. R. D. Avaliação do potencial vacinal de peptídeos de antígenos de Shigella spp. 2018.

STROCKBINE, N. A.; MAURELLI, A. T. Shigella. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, p. 1–26, 2015.

SUR, D. et al. Shigellosis: challenges & management issues. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, n. 5, p. 454, 2004.

SKWARCZYNSKI, Mariusz; TOTH, Istvan. Peptide-based synthetic vaccines. **Chemical science**, v. 7, n. 2, p. 842-854, 2016.

TANEJA, N.; MEWARA, A. Shigellosis: Epidemiology in India. **The Indian journal of medical research**, v. 143, n. 5, p. 565-76, 2016.

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

THANH, D. P. et al. The genomic signatures of Shigella evolution, adaptation and geographical spread. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235, 2016.

THOMPSON, C. N.; DUY, P. T.; BAKER, S. The rising dominance of Shigella sonnei: an intercontinental shift in the etiology of bacillary dysentery. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003708, 2015.

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.

TROFA A. F.; OLSEN-UENO H.; OIWA R.; YOSHIKAWA M.; Dr. Kiyoshi Shiga: Discoverer of the Dysentery Bacillus, **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 5, p. 1303-1306, 1999.

WALKER, R. I. et al. Vaccines against Shigella and enterotoxigenic Escherichia coli: A summary of the 2016 VASE Conference. **Vaccine**, v. 35, n. 49, p. 6775-6782, 2017.

WANG, Shujing et al. Intranasal and oral vaccination with protein-based antigens: advantages, challenges and formulation strategies. **Protein & cell**, v. 6, n. 7, p. 480-503, 2015

WIZEMANN, T. M.; ADAMOU, J. E.; LANGERMANN, S. Adhesins as targets for vaccine development. **Emerging infectious diseases**, v. 5, n. 3, p. 395, 1999.

WOODWARD, D. L.; RODGERS, F. G. Surveillance of Antimicrobial Resistance in Salmonella, Shigella, and *Vibrio cholerae* in Latin America and the Caribbean: A Collaborative Project. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 181-185, 2000.

VALENSKI, M. L. et al. The Product of the fiml gene is necessary for Escherichia coli type 1 pilus biosynthesis. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 16, p. 5007-5011, 2003.

VAN DE VERG, L. L. et al. Antibody and cytokine responses in a mouse pulmonary model of Shigella flexneri serotype 2a infection. **Infection and immunity**, v. 63, n. 5, p. 1947-1954, 1995.

VENKATESAN M. M.; RANALLO R. T. Live-attenuated *Shigella* vaccines. **Expert Vaccines**. v. 5, p. 669–86, 2006.

VUBIL, D. et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of shigella isolates recovered from children aged less than 5 years in Manhica, Southern Mozambique. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 6, p. 881-887, 2018.

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.

YAGNIK, B. et al. Immunization with r-Lactococcus lactis expressing outer membrane protein A of *Shigella dysenteriae* type-1: evaluation of oral and intranasal route of administration. **Journal of applied microbiology**, v. 122, n. 2, p. 493-505, 2017.

YANG F.; YANG J. Genome dynamics and diversity of *Shigella* species, the etiologic agents of bacillary dysentery. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 9, p. 6445-6458, 2005.

YANG, J.-Y., LEE, S.-N., CHANG, S.-Y., KO, H.-J., RYU, S., & KWEON, M.-N. A Mouse Model of Shigellosis by Intraperitoneal Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 2, p. 203–215, 2013.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação Comitê de Ética do INPA

13/12/2018

SEI/MCTIC - 3519210 - Parecer Técnico



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO
DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "**Validação em modelo animal de peptídeos Vacinais**", registrada com o nº **052/2018, SEI 01280.001769/2018-46**, sob a responsabilidade de **Jéssica Araújo Marques** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de **29/10/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 03/01/2019 a Final: 01/03/2020
Espécie/linhagem/raça:	Camundongos isogênicos Balb C / <i>Mus musculus</i>
Número de animais:	90
Peso/Idade:	6 - 8 semanas / 25 - 40g
Sexo:	Fêmeas
Origem:	Biotério Central do INPA
Inoculação:	Shigela SP

Data de liberação do Parecer: **30.10.2018**

Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 194/2017



Documento assinado eletronicamente por **Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia**, em 05/11/2018, às 13:53, conforme art. 3º, III, "b", das Portarias MC nº 89/2014 e MCTIC nº 34/2016.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **3519210** e o código CRC **CDD797CC**.

Referência: Processo nº 01280.001769/2018-46

SEI nº 3519210

Anexo 2 – Prorrogação da Aprovação do Comitê de Ética do INPA

23/03/2020

SEI/MCTIC - 5305203 - Parecer Técnico



MINISTÉRIO DA
CIÊNCIA, TECNOLOGIA,
INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "**Validação em modelo animal de peptídeos Vacinais**", registrada com o nº **052/2018, SEI 01280.001769/2018-46**, sob a responsabilidade de **Jéssica Araújo Marques** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de **27/02/2020**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização:	Início: 03/01/2019 a Final: 29/06/2020
Espécie/linhagem/raça:	Camundongos isogênicos Balb C / <i>Mus musculus</i>
Número de animais:	90
Peso/Idade:	6 - 8 semanas / 25 - 40g
Sexo:	Fêmeas
Origem:	Biotério Central do INPA
Inoculação:	Shigela SP

Data de liberação do Parecer: **27.02.2020**

Raimunda Liege Souza de Abreu - Presidente CEUA-INPA - PO 011/2020



Documento assinado eletronicamente por **Raimunda Liege Souza de Abreu, Pesquisador(a) em Ciência e Tecnologia**, em 23/03/2020, às 12:15 (horário oficial de Brasília), com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <http://sei.mctic.gov.br/verifica.html>, informando o código verificador **5305203** e o código CRC **81C43DED**.

Referência: Processo nº 01280.001769/2018-46

SEI nº 5305203



The Original by FUNPEC-RP

CRISPR/Cas Class 2 systems and their applications in biotechnological processes

D.S. Mota¹, J.M. Marques¹, J.M. Guimarães¹ and L.A.M. Mariúba²

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil

²Núcleo de Inovação Tecnológica, Instituto Leônidas & Maria Deane – Fiocruz Amazônia, Manaus, AM, Brasil

Corresponding author: L.A.M. Mariúba
E-mail: lamariuba@hotmail.com

Genet. Mol. Res. 19 (1): gmr18478
Received August 21, 2019
Accepted March 11, 2020
Published March 31, 2020
DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr18478>

ABSTRACT. Since 2012, CRISPR/Cas technologies have revolutionized the field of modern molecular biology and biotechnology due to their ability to direct a Cas nuclease to cleave specific nucleic acid sequences with a guide RNA (crRNA), providing dynamic tools for many applications, being naturally derived from the adaptive immune system of prokaryotes. The most widely used toolbox for genome editing, modulation, and detection contains types II, V and VI of class 2 systems, categorized and characterized by Cas9, Cas12, and Cas13, respectively. In recent years, given the wide application of Class 2 CRISPR-Cas systems as molecular tools, there has been a focus on the discovery, characterization, and specificity of Cas effector nucleases from these systems, generating even more possibilities for the development of new applications. We reviewed the scientific literature on current knowledge of CRISPR-Cas systems and recent advances in biotechnology involving class 2 systems between 2000 and 2019. For this, we searched for original articles indexed in the following databases: PubMed, Scopus, SciELO, Periodicos Capes and Google Scholar, and used keyword combinations such as “CRISPR / Cas Class 2 systems”, “Cas9”, “Cas12”, “Cas13”, “Genome editing” and “diagnostic detection”. Eighty original articles were obtained, 55 of

Anexo 3.2 - Patente utilizando os peptídeos



11/03/2020 870200032639
10:11
29409161916461360

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 004814 7

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 33781055000135

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AV. BRASIL, 4365

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 21045900

País: Brasil

Telefone: 0000-0000

Fax:

Email:

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 11/03/2020 às 10:11, Petição 870200032639

**UMA ABORDAGEM SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE ESPÉCIES VEGETAIS
NATIVAS DA FLORESTA AMAZÔNICA BRASILEIRA.**

Jéssica Araújo Marques ¹, Jander Matos Guimarães ², Elison de Souza Sevalho ^{3*}

Resumo

Nos últimos anos, os radicais livres vêm sendo discutidos devido a sua capacidade de desestabilizar biomoléculas como lipídios, proteínas e DNA, causando doenças degenerativas, artrite, inflamação, envelhecimento precoce, câncer e problemas cardiovasculares. Para inibir e reduzir a formação desses radicais, existem as substâncias antioxidantes, os quais ocupam um lugar de destaque tanto no meio acadêmico como em setores industrias, sendo importante a realização de pesquisa sistematizada desses compostos. Dessa forma, esta mini revisão bibliográfica tem o objetivo de enfatizar a capacidade antioxidante *in vitro* de determinados extratos e biomoléculas extraídas de espécies vegetais nativas da região amazônica. De maneira geral, as plantas amazônicas destacadas nessa revisão apresentaram o potencial antioxidante expressivo. Os diferentes métodos analíticos empregados na análise antioxidante *in vitro* foram necessários para triagem inicial de moléculas ativas de compostos fenólicos, a qual se destacam os flavonoides e ácidos fenólicos. A reunião dos resultados descritos por essa revisão podem ser úteis para contribuição de estudos posteriores, pois, revela a capacidade promissora dos componentes de cada extrato ativo e moléculas isoladas com propriedades antioxidantes. Essas aplicações poderão viabilizar a comercialização dessas espécies, gerando emprego e renda à população local, favorecendo a ampliação industrial, minimizando o desperdício e promovendo a geração de coprodutos.

Palavras-chave: Biomoléculas; Propriedades antioxidantes; Plantas amazônicas.

1 INTRODUÇÃO

Até onde sabemos por meio de vários estudos científicos, o desequilíbrio no corpo humano ocasionado pelo estresse oxidativo leva à formação de compostos potencialmente tóxicos e