



IMOBILIZAÇÃO E LIBERAÇÃO DE ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Leishmania amazonensis* EM MICROESFERAS DE QUITOSANA

OLIVEIRA, Rodrigo Borges de¹; PIRES, Alause da Silva²; JACOB, Maza Alves³;
SILVA, Kátia Flávia Fernandes⁴; OLIVEIRA, Milton Adriano Pelli⁵

Palavras-chave: Antígeno - Imobilização – *Leishmania* - Quitosana

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e são endêmicas em 88 países com uma prevalência de 12 milhões de indivíduos (DESJEUX, 1996). Dados da Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Goiás (SINAM) também demonstram o aumento do número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana neste Estado nos últimos 20 anos e uma tendência para a urbanização desta enfermidade. Macrófagos ativados são capazes de matar as leishmanias, enquanto macrófagos residentes permitem a multiplicação do parasito. IFN- γ tem se mostrado como a principal citocina capaz de ativar macrófagos para matar estes parasitos (GAZZINELLI *et al.*, 1998). Uma das medidas de controle da expansão da doença seria a obtenção de vacinas com maior eficácia. A imobilização de enzimas tem sido utilizada para aumentar a eficiência e estabilidade de enzimas. Assim, enzimas imobilizadas mostram-se muito mais resistentes à desnaturação frente a diversos agentes desnaturantes (CHIBATA *et al.*, 1978). O nosso objetivo é imobilizar antígenos solúveis de *Leishmania amazonensis* num polímero, a quitosana, para verificarmos se ocorre uma liberação lenta do antígeno de modo a prolongar a estimulação, esperando-se uma proteção imunológica duradoura. A quitosana foi escolhida por ser um polissacarídeo biodegradável, não-tóxico e com baixa imunogenicidade (ARAI *et al.*, 1968).

2. METODOLOGIA

2.1 – Parasitos

O isolado de parasitos de *Leishmania amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8) foi cultivado em estufa BOD a 25°C em meio de Grace, repicado a cada 3 dias a partir de 1×10^5 promastigotas/mL. Os parasitos foram utilizados na fase estacionária e foram colhidos cinco dias após o início da cultura.

2.2 - Preparação de antígenos solúveis de *L. amazonensis* (SLA)

Os SLA foram obtidos a partir da lise de promastigotas de fase estacionária por congelamentos e degelos repetitivos até que nenhum parasito íntegro fosse

identificado em microscopia óptica. O lisado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min e o sobrenadante filtrado em uma membrana de poro igual a 0,22 µm. A concentração dos antígenos foi avaliada seguindo o método de Bradford segundo recomendação do fabricante.

2.3 – Preparação de microesferas de quitosana

Quitosana (0,25% m/v) foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético (2% v/v) sob agitação por 18 h em temperatura ambiente. A solução foi filtrada à vácuo em papel de filtro. Adicionou-se 1 mL de Tween-80 à solução de quitosana (filtrado) e em seguida adicionou-se solução de sulfato de sódio 20% lentamente sob agitação a 500 rpm por mais ou menos 1 hora, até que a transmitância fosse 0%. As microesferas de quitosana formadas foram separadas por centrifugação a 4000 x g por 10 minutos. O sedimento (microesferas de quitosana) foi liofilizado e irradiado com radiação gama para garantir esterilidade e armazenado para uso posterior.

2.4 – Imobilização por adsorção do antígeno em quitosana

1000 µg de SLA foi adicionado às microesferas de quitosana (6 mg), os quais foram ressuspendidos para volume final de 800 µL em PBS. Após 18 h a 10°C a suspensão foi centrifugada a 4.000 x g por 10 min. O sedimento foi ressuspendido em PBS e usado para imunização dos animais. O valor de antígeno imobilizado foi obtido pelo método de Bradford fazendo-se a subtração da quantidade de antígeno remanescente no sobrenadante daquela adicionada inicialmente.

2.5 – Liberação de SLA imobilizado em quitosana in vitro

Da solução de SLA imobilizado em quitosana descrito anteriormente, retirou-se 200 µL, o que corresponde a 300 µg de SLA em 2 mg de quitosana. A suspensão foi submetida a centrifugação a 4000 x g por 10 min e o sobrenadante foi colhido para dosagem de antígenos através do método de Bradford. A quantidade de antígeno no sobrenadante corresponde à quantidade de antígeno liberado pela quitosana. Ao sedimento, adicionou-se 200 µL de PBS, homogeneizou-se e armazenou-se a suspensão a 4°C. Esse procedimento de dosagem de antígeno do sobrenadante repetiu-se por vários dias para verificar a eficiência da liberação de SLA.

2.6 – Vacinação dos Animais

Camundongos C57BL/6 (B6) foram injetados com PBS (controle); 25 µg de SLA; 140 µg de quitosana ou quitosana+SLA (25µg de SLA em 140µg de quitosana). A vacinação foi feita em duas doses, sendo que a segunda foi administrada uma semana após a primeira (administrações subcutânea na pata direita). Três semanas depois da última dose, os animais foram sacrificados para a análise de citocinas.

2.7 – Obtenção de células de linfonodo, reestimulação com SLA e dosagem de IFN-γ

As células foram obtidas por rompimento mecânico da cápsula dos linfonodos poplíteos. O macerado foi ressuspendido em meio RPMI 1640. Estas células foram cultivadas na concentração de 5 x 10⁶ células/mL e re-estimuladas ou não com 50µg/mL de SLA ou concanavalina A 5µg/mL. Após 72 horas o sobrenadante de cultura das células foi colhido e a dosagem de IFN-γ feita através de ELISA.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 – Liberação de SLA imobilizado em quitosana *in vitro*

A formação de microesferas de quitosana foi confirmada por visualização das mesmas em microscopia óptica e apresentavam tamanhos que variavam de 0,5-3,0 μm . Após a produção de 1,2 g de microesferas de quitosana, foi feita a imobilização de 1000 μg de SLA para cada 6 mg de quitosana (o rendimento foi de 85% de imobilização, ou seja, $850 \pm 51,3$ μg de SLA em 6 mg de microesferas de quitosana). A quitosana libera pequenas quantidades de antígenos diariamente *in vitro* (Figura 1), o que sugere que esse mesmo fenômeno pode ocorrer *in vivo*.

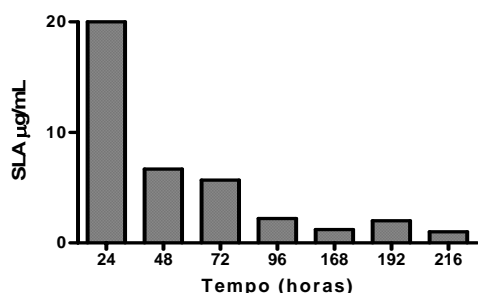


FIGURA 1: Liberação de SLA por quitosana *in vitro*. A liberação de SLA pela quitosana em PBS nos três primeiros dias foi maior que nos dias subsequentes, ou seja, a quitosana liberou um total de 32,4 μg de SLA depois de 3 dias e a liberação do antígeno do 4^o ao 10^o dia foi de $1,62 \pm 0,59$ $\mu\text{g}/\text{dia}$.

3.2 – Quantificação de $\text{IFN-}\gamma$ produzidas por células de linfonodo

Os resultados da quantificação de $\text{IFN-}\gamma$ estão apresentados na figura 2. Nenhuma produção de $\text{IFN-}\gamma$ foi detectada quando as células do linfonodo foram estimuladas por um estimulador policlonal, a concanavalina A, o qual deveria estimular a produção de $\text{IFN-}\gamma$ nas células dos animais de todos os grupos. Este último dado pode ser justificado por algum erro experimental durante a ativação com a concanavalina A.

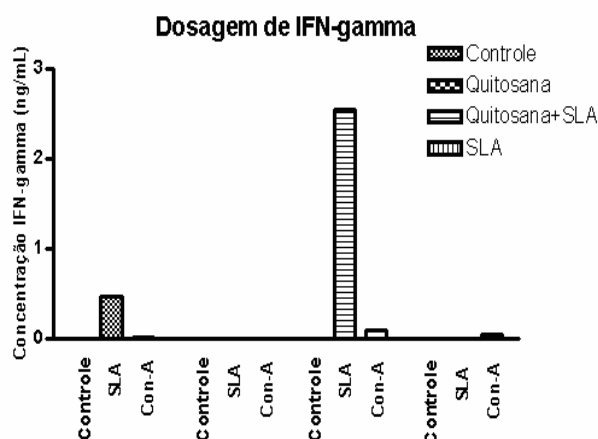


FIGURA 2: Células do camundongo imunizado com SLA + quitosana produzem mais $\text{IFN-}\gamma$ que células dos outros animais. Após 3 semanas de imunização, os animais que receberam SLA + quitosana possuíam células capazes de produzir mais $\text{IFN-}\gamma$ em seu linfonodo após o re-estímulo com SLA, indicando uma possível vacinação dos animais.

4. CONCLUSÃO

A imobilização de SLA com quitosana promove uma liberação mais lenta do antígeno, o que indica que este polímero pode ser útil como adjuvante. As Células do animal que recebeu SLA imobilizado em quitosana produziram mais $\text{IFN-}\gamma$ que os demais animais, indicando que a imunização foi mais eficiente neste animal,

provavelmente porque a quitosana libera o antígeno lentamente, o que prolonga a resposta imunológica, o que é ideal para uma vacina eficaz contra a leishmaniose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAI, K.; KUNUMAKI, T.; FUGITA, T. Toxicity of Chitosan. Bull. Tokai Reg. Fish. Lab., [S.l], v. 43, p. 89-94, 1968.

CHIBATA, I., T. TOSA, T. SATO e T. MORY. Definition of immobilized enzymes.

In: Immobilized Enzymes - Research and Development, New York : John Wiley and Sons, 1978. p. 17.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Public health aspects and control, Clin Dermatol, v. 14, p. 417-23, 1996.

GAZZINELLI, R. T.; TALVANI, A.; CAMARGO, M. M.; SANTIAGO, H. C.; OLIVEIRA, M. A.; VIEIRA, L.Q.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S. Induction of cell-mediated immunity during early stages of infection with intracellular protozoa, Braz J Med Biol Res., v. 31, n. 1 p. 89-104, jan. 1998.

FONTE DE FINANCIAMENTO: CNPq/PIBIC – FUNAPE

¹ Bolsista de Iniciação Científica. IPTSP / UFG – Laboratório de Citocinas rodrigolevita@yahoo.com.br

² Aluna de Iniciação Científica. IPTSP / UFG – Laboratório de Citocinas alausepires@hotmail.com

³ Aluna de Iniciação Científica. IPTSP / UFG – Laboratório de Citocinas mazajacob@pop.com.br

⁴ Co-Orientadora. Inst. de Ciências Biológicas / UFG – Lab. de Química de Proteínas katia@icb.ufg.br

⁵ Orientador. IPTSP / UFG – Laboratório de Citocinas mapoliv@iptsp.ufg.br