Imunização de camundongos com antígeno de leishmania imobilizados em quitosana não induz proteção, mas induz inflamação local e morte celular.

PIRES, Alause Silva¹; **OLIVEIRA**, Rodrigo Borges; **OLIVEIRA**, Milton Adriano²;
FERNANDES, Kátia Flávia; **LIMA**, Glória Maria Collet

Palavras-chave: Leishmaniose, imunização, quitosana, SLA

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e são endêmicas em 88 países. Nos últimos anos, o número de casos de leishmaniose tem aumentado dramaticamente com o surgimento de cepas de parasitos resistentes às drogas tradicionais (REITHINGER, 2001), havendo uma tendência para a urbanização desta enfermidade (MORAIS & OLIVEIRA, 2000). Isto faz com que se torne cada vez mais necessário o desenvolvimento de vacinas mais eficientes para o controle do ciclo do parasito no ambiente doméstico. O desenvolvimento de novas vacinas e de melhores diagnósticos faz parte de uma estratégia de controle das doenças tropicais sugerida pela Organização Mundial de Saúde, incluindo a leishmaniose, (REMME *et al.*, 2002). Uma vacina adequada deveria oferecer uma resposta imune protetora contra o antígeno e manter a produção de células T de memória (SCOTT P. *et al.*, 2004). Nesse sentido, nós propusemos o uso da quitosana como adjuvante para vacina. A quitosana é um polissacarídeo biocompatível de grande interesse para a área farmacêutica e que tem sido utilizada para testes de liberação lenta de drogas bem como de genes (ÖZBAS-TURAN, S. *et al.*, 2003). Neste estudo este carboidrato foi usado na imobilização de antígeno solúvel de leishmania (SLA) com o objetivo de se avaliar as alterações na imunogenicidade de proteínas solúveis de *L. amazonensis* após a imobilização destas.

2. METODOLOGIA

Preparação de antígenos solúveis de *L. amazonensis* e sua imobilização em quitosana: Antígenos leishmania (SLA) foram obtidos a partir da lise de promastigotas de fase estacionária, sendo que 500 a 1000 µg desta proteína foi incubada com microesferas de quitosana (3-6 mg respectivamente) em PBS por 18 h. A quantidade de antígeno imobilizado foi determinado pelo método de BCA.

Vacinação e Desafio: Camundongos C57BL/6 foram injetados com 25 µg/animal de SLA imobilizado ou não em microesferas de quitosana (aprox. 140 µg), PBS ou somente quitosana (aprox.140 µg) na pata trazeira direita. As patas foram mensuradas a cada 72 horas e após 7 dias foi injetada a segunda dose da vacina. Três semanas após a primeira dose os animais foram desafiados com 1×10^5 *L. amazonensis* na pata trazeira esquerda. A lesão desencadeada pelo parasito foi mensurada semanalmente.

Estimulação de células peritoneais e linfócitos esplênicos com SLA, quitosana, quitosana+SLA ou ConA: Células peritoneais de animais sadios e linfócitos esplênicos de animais infectados foram cultivados em meio RPMI completo contendo 10% de soro bovino fetal. A cultura das células peritoneais foi feitas em

placas de 24 poços (5 x 10⁵/mL/poço) na presença de SLA, quitosana, SLA+quitosana ou ConA. Essas células foram mantidas em cultura por 24 horas ou por 5 dias quando se retirou todo o sobrenadante, lavou-se com PBS por 2 vezes e adicionaram-se os linfócitos (5 x 10⁶/mL/poço). Os sobrenadantes das culturas foram colhidos após 72 h para dosagens de IFN- γ e IL-4.

Avaliação da dose resposta de macrófagos à quitosana: Macrófagos peritoneais ou macrófagos J774A1 (5 X 10⁵/mL) foram cultivados e estimulados com quitosana nas concentrações de 0.5, 1, 2, 4 e 8 μ g/mL por 24 ou 48h. Para avaliar o metabolismo das células foi feito o ensaio colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma).

3.RESULTADOS e DISCUSSÃO:

Quitosana imobilizou SLA eficientemente e o liberou lentamente *in vitro*: A incubação de SLA com microesferas de quitosana possibilitou a imobilização de 85,0% de antígeno. A liberação do antígeno imobilizado foi lenta em cultura, em torno de 4 μ g/ dia sugerindo que o mesmo possa estar ocorrendo *in vivo*.

Vacinação de camundongos com antígenos de leishmania imobilizados em quitosana não induz proteção contra leishmaniose: Camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* três semanas após a imunização com SLA imobilizado em quitosana ou com os respectivos controles desenvolveram uma lesão crescente na pata infectada até a nona semana após a infecção. Em todos os grupos foi observado um decréscimo semelhante da lesão que atingiu o menor tamanho em torno da 14^a semana de infecção.

Quitosana induz inflamação no sítio inoculado: Embora não tenha sido observada proteção nos animais imunizados, o grupo de camundongos que recebeu quitosana ou quitosana+SLA apresentou uma reação inflamatória acentuada na pata, com um pico em 72 horas. Esta inflamação foi significativamente maior nos animais imunizados com quitosana+SLA que naqueles imunizados apenas com quitosana. Houve uma regressão da reação inflamatória 72 horas após a injeção de quitosana, entretanto, após a segunda dose de imunização houve nova indução da inflamação.

Efeitos da imobilização de SLA em quitosana sobre apresentação de antígenos *in vitro*: O IFN γ é uma citocina pró-inflamatória importante no controle de vários patógenos, incluindo a leishmania. Como era esperado, esplenócitos de camundongos infectados com *L. amazonensis* produziram IFN γ quando cultivados com células apresentadoras de antígeno (APC) primadas com 25 μ g de SLA. Uma menor produção desta citocina foi observada na presença de quitosana, porém, inesperadamente a associação de SLA e quitosana não aumentou a produção de IFN γ . APCs primadas com SLA+ quitosana ou SLA 5 dias antes da exposição aos linfócitos não induziram a produção IFN γ pelos linfócitos, sugerindo que a imobilização do antígeno em quitosana não prolonga a apresentação deste.

Efeitos da quitosana sobre células peritoneais em cultura. A diminuição da produção de IFN γ , quando o SLA foi adicionado juntamente com a quitosana levantou a hipótese de que este polímero pudesse estar induzindo morte das APCs. Para avaliar a toxicidade da quitosana em cultura, macrófagos foram cultivados na presença de diferentes concentrações de quitosana. Observou-se

que concentrações tão baixas quanto 0.5µg/mL de quitosana promoveu uma diminuição de atividade metabólica de macrófagos após 48h de incubação. Desde que a quantidade de quitosana necessária para imobilizar 25µg de SLA (quantidade utilizada para reestimar células esplênicas em cultura) era de aproximadamente 140 µg, a ausência da produção de IFN γ observada em células esplênicas cinco dias após a primagem por SLA imobilizado em quitosana se deve provavelmente por morte celular. De acordo com nossos resultados podemos observar que embora houvesse uma liberação lenta do antígeno, não foi observada mudança no perfil da lesão desencadeada pelo parasito e que o aumento no tempo de apresentação de antígeno não foi possível de ser observada *in vitro*, já que quantidades mínimas de quitosana induziram morte celular, o que pode justificar em parte a presença da inflamação no sítio da inoculação de quitosana.

4. CONCLUSÕES

- A quitosana imobiliza eficientemente o SLA *in vitro* e promove uma liberação lenta e homogênea deste
- SLA ou SLA imobilizado em quitosana não oferece proteção contra leishmaniose.
- Quitosana injetada no coxim plantar de camundongos desencadeia uma reação inflamatória que pode ser devida a indução de morte celular por este polímero

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- MORAIS, N. A.; OLIVEIRA, A. W. S. Leishmaniose Tegumentar Americana no Estado de Goiás. *Rev Soc. Brás. Med. Trop.*, v. 33, p. 282-283, 2000.
- ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, v. 20, p.175-182, 1999.
- ÖZBAS-TURAN, S. *et al.* Co-encapsulation of two plasmids in chitosan microspheres as a nov-viral gene delivery vehicle. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, v. 6, p. 27-32, 2003.
- REITHINGER, R. Protective saliva: sandfly spit delivers. *Trends Parasitol.*, v. 17, p. 513, 2001.
- SCOTT, P. *et al.* The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol Rev.*, v. 201, p. 318-38, 2004.

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

¹ Bolsista de iniciação científica. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Publica- Laboratório de cintocinas, alausepires@hotmail.com

² Orientador/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Publica/UFG, mapoliv@iptsp.ufg.br