



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº PI 1103325-8

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 1103325-8

(22) Data do Depósito: 26/07/2011

(43) Data da Publicação Nacional: 23/07/2013

(51) Classificação Internacional: A61K 39/00; C07K 7/08; A61P 33/10.

(54) Título: VACINA CONTRA TENÍASE E CISTICERCOSE

(73) Titular: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS. CGC/CPF: 17217985000104. Endereço: Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, BRASIL(BR), 31270-901; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. CGC/CPF: 75095679000149. Endereço: PRPPG- Travessa Alfredo Bufren, 140, Curitiba, PR, BRASIL(BR), 80020-240; CENTRO DE PRODUÇÃO E PESQUISA DE IMUNOBIOLOGICOS. CGC/CPF: 08597121000174. Endereço: AV. SÃO ROQU, 716, JARDIM SNTA MÔNICA, PIRARAQUARA, PR, BRASIL(BR), 83302-200

(72) Inventor: CARLOS DELFIN CHAVEZ OLORTEGUI; JANAINA CAPELLI PEIXOTO; JOÃO CARLOS MINOZZO; JULIANA FERREIRA DE MOURA; LARISSA MAGALHÃES ALVARENGA; VANETE THOMAZ SOCCOL.

Código de Controle: 58AD0D142471E73C 2AE244B78E278B69

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 26/07/2011, observadas as condições legais

Expedida em: 24/11/2020

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

VACINA CONTRA TENÍASE E CISTICERCOSE

A presente invenção descreve uma composição imunogênica utilizada para vacinação contra teníase e cisticercose. Mais especificamente, a invenção descreve uma composição imunogênica vacinal que compreende uma
5 sequência peptídica selecionada por Phage Display, ou seus análogos, homólogos e derivados, capaz de mimetizar epitopo(s) de proteína(s) de *Taenia solium*.

O metacestódeo (larva) da *Taenia solium*, também conhecido como *Cysticercus cellulosae*, é responsável pela cisticercose muscular e cerebral
10 (neurocisticercose - NCC) em seres humanos. O ciclo da *T. solium* inclui os suínos como hospedeiros intermediários. Os seres humanos são os únicos hospedeiros definitivos conhecidos da forma adulta, mas podem agir como hospedeiros acidentais, através da contaminação fecal-oral com ovos do parasita (hetero ou auto-infecção). Dessa forma, os ovos do parasito eclodem
15 no intestino, e os embriões hexacantos penetram na mucosa intestinal, disseminam-se através da circulação sanguínea e alojam-se no músculo, em tecidos moles ou no sistema nervoso central (García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 2003; **362** 547-556).

A neurocisticercose, devido à *Taenia solium* é reconhecida como uma
20 importante causa de morbidade e mortalidade em humanos. As medidas actualmente disponíveis para o controle da doença são inadequados e há uma necessidade de novas alternativas. Estas novas alternativas podem ser realizadas através de uma nova geração de vacinas desempenhando um papel fundamental no controle da teniase veterinária ou humana.

A tecnologia de *Phage Display* foi empregada anteriormente para a
25 obtenção de alternativas para o diagnóstico sorológico para NCC, permitindo a identificação de uma seqüência de aminoácidos capaz de identificar pacientes com NCC através de ELISA indireto (Hell RC, Amim P, de Andrade HM *et al.* Immunodiagnosis of human neurocysticercosis using a synthetic peptide selected by phage-display. *Clin Immunol* 2009; **131** 129-38). Depois da síntese
30 química, o peptídeo NC-1 (SKSSITITNKRLTRK), mesmo sendo um mimotopo de *T. solium*, esse peptídeo conseguiu induzir uma resposta humoral em

camundongos, cujos anticorpos reconheceram proteínas da região do escólex de *C. cellulosae* por imuno-histoquímica.

Considerando os estudos anteriores em que se comprovou a capacidade de peptídeos selecionados por *Phage Display* em induzir proteção contra toxinas, bactérias, vírus, fungos e parasitos, a presente invenção descreve o potencial do peptídeo sintético (NC-1), selecionado por meio de anticorpos produzidos contra *C. cellulosae*, em induzir uma resposta imunológica capaz de proteger camundongos contra a cisticercose murina (Hernandez R, Gazarian TG, Héron PS, Gazarian KG. Molecular localization and crossreactivity of two epitopes of noxiustoxin from scorpion *Centruroides noxius*, identified by a panel of monoclonal antibodies and peptide mimotopes. *Immunol Lett* 2002; **80** 97-103; Wang H, Gao Y, Gong Y *et al.* Identification and immunogenicity of an immunodominant mimotope of *Avibacterium paragallinarum* from a *Phage Display* peptide library. *Vet Microbiol* 2007; **119** 231-9; Chen X, Scala G, Quinto I *et al.* Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes. *Nat Med* 2001; **7** 1225-31; Datta K, Lees A, Pirofski LA. Therapeutic efficacy of a conjugate vaccine containing a peptide mimotope of cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan. *Clin Vaccine Immunol* 2008; **15** 1176-87; Wu HW, Hu XM, Wang Y *et al.* Protective immunity induced by *Phage Displayed* mitochondrial related peptides of *Schistosoma japonicum*. *Acta Trop* 2006; **99** 200-7).

Animais imunizados com o peptídeo NC-1 na forma sintética e solúvel e posteriormente desafiados com cisticercos de *T. crassiceps*, um componente da família Taeniidae usualmente empregado em estudos imunológicos e bioquímicos sobre a cisticercose ou como fonte de antígeno heterólogo em imunoensaios NCC, apresentaram proteção contra a cisticercose murina (Vinaud MC, Lino Rde S Jr, Bezerra JC. *Taenia crassiceps* organic acids detected in cysticerci. *Exp Parasitol* 2007; **116** 335-9; Castellanos-Sánchez VO, Gómez-Conde E, Rocha-Gracia RC, *et al.* Chorionic gonadotropin hormone receptors on *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci in culture. *J Parasitol* 2009; **95** 1287-94; Peralta RH, Espíndola NM, Pardini AX, *et al.*

Taenia crassiceps cysticerci: characterization of the 14-kDa glycoprotein with homologies to antigens from *Taenia solium* cysticerci. *Exp Parasitol* 2010; **124** 295-300; Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RMF *et al.* Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; **57** 354-7; Pardini AX, Vaz AJ, Machado LR, Livramento, JA. Cysticercus antigens in cerebrospinal fluid samples from patient with neurocysticercosis. *J Clin Microbiol* 2001; **39** 3368-72; Minozzo JC, de Moura J, Almeida SM, Thomaz-Soccol, VT. Crude antigen from *Taenia crassiceps* cysticerci used as heterologous antigen in ELISA and in EITB for neurocysticercosis diagnosis of patients from Paraná - Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 2008; **51** 1127-37).

A cisticercose murina foi escolhida como modelo na presente invenção devido à facilidade de manutenção de *T. crassiceps* em laboratório e de controle da carga parasitária, do baixo risco biológico e devido ao fato de *T. crassiceps* e *T. solium* serem filogeneticamente próximas.

Com base na imuno-histoquímica, os resultados obtidos revelaram que o perfil de reconhecimento dos antígenos de *C. longicollis* pelos anticorpos produzidos contra NC-1 confirma o fato de *Taenia crassiceps* ter antígenos em comum com *Taenia solium* (Minozzo e cols., 2008). Além disso, o potencial protetor do mimotopo sintético NC-1 indica que peptídeos selecionados por *Phage Display* podem ser importantes candidatos a vacinas contra parasitos humanos ou animais.

Assim, a presente tecnologia apresenta uma vacina sintética que pode prevenir a Teniase transmitida por porcos ou bovinos, hospedeiros intermediários naturais do parasito. Uma vacina altamente eficaz, capaz de prevenir a infecção e que apresenta baixo custo. Esta tecnologia foi completamente desenvolvida em laboratório, e por ser totalmente sintética não tem necessidade de cultura de parasitos ou bacterias para produzir antígenos vacinais. Além disso, o peptídeo apresenta apenas 15 aminoácidos o que facilita ainda mais sua síntese em escala industrial.

Algumas patentes, pedidos de patente e vários artigos científicos descrevem o uso de vacina contra teníase e cisticercose, mas nenhum deles emprega o peptídeo sintético da presente invenção:

- 5 • O documento 2008006604 consiste na expressão de proteínas recombinantes em células embriogênicas de mamão e o uso dessas proteínas na proteção contra teníase e cisticercose.
- O documento 0175448 descreve polipeptídeos antigênicos sintéticos de origem larval para uso como imunodiagnóstico e para proteger humanos e animais contra infecção por *T. solium*.
- 10 • O documento WO9008958 descreve um método de obter antígenos de *cysticercus cellulosae*.
- Xuepeng Cai e cols. (2007) descreve o uso do peptídeo TSOL18 glicosilado na proteção contra cisticercose. (Xuepeng Cai, Gailing Yuan, Yadong Zheng, Xuenong Luo, Shaohua Zhang, Juntao Ding,, Zhizhong
15 Jing, Chengping Lu; Effective Production and Purification of the Glycosylated TSOL18 Antigen, Which Is Protective against Pig Cysticercosis_INFECTION AND IMMUNITY, Feb. 2008, p. 767–770).
- Aluja A. S. e cols. (2005) descrevem o uso de uma vacina sintética S3Pvac composta de três peptídeos (GK1, KETc1 e KETc12) na
20 proteção contra cisticercose. (Aline S. de Aluja, Nelly M. Villalobos, Gabriela Nava, Andrea Toledo, José Juan Martínez, Agustín Plancarte, Luis Felipe Rodarte, Gladis Fragosob, Edda Sciutto; Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against
Taenia solium cysticercosis in pigs; Vaccine 23 (2005) 4062–4069).
- 25 • Toledo A. e Cols (1999) demonstraram que, dos três peptídeos que constituem o antígeno recombinante KETc7, GK-1, GK-2 e GK-3, apenas GK-1 induziu proteção contra *T. crassiceps*. (Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto
30 E., Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis; Infect Immun. 1999 May;67(5):2522-30).

Breve descrição das Figuras

Figura 1. Reatividade de soros hiperimunes de camundongos imunizados com peptídeo NC-1 carregado com BSA (■), antígeno bruto de *T. crassiceps* ou TaCa (□) ou BSA (■). As diferenças individuais entre os grupos de soro foram determinadas por ANOVA e pelo teste post-hoc de Tukey. A reatividade dos anticorpos das amostras da primeira sangria não foi a mesma entre os grupos ($p < 0,05$). A análise estatística está representada por letras minúsculas diferentes (a, b, c). Entre as amostras da segunda sangria não houve diferença significativa. Este resultado é ilustrado por barras com letras minúsculas iguais.

Figura 2. Influência da imunização dos camundongos sobre o tamanho de cisticercos de *T. crassiceps* recuperados após o desafio. Os camundongos foram imunizados intraperitonealmente com 20 μ g de cada imunógeno em intervalos de duas semanas. Sete dias após a última imunização, os camundongos foram desafiados com cinco cisticercos de *T. crassiceps*. A carga parasitária foi avaliada 30 dias após o desafio e os cistos foram classificados por tamanho. Os resultados são expressos como a média \pm DP de sete a oito animais. Diferença significativa entre os grupos foi determinada pelo teste do qui-quadrado ($p < 0,0001$)

Figura 3. Imunofluorescência da fase larval de *T. crassiceps*. Cortes de 7 mm foram incubados com anticorpos contra BSA (G), contra TcCa (H) ou contra NC-1/BSA (I) e posteriormente com anticorpo anti IgG de camundongo marcado com Alexa 488. Em ambas as imagens (H e I) uma intensa fluorescência pode ser vista no tegumento, mas somente anticorpos produzidos contra TcCa foram capazes de reconhecer proteínas do parênquima uniformemente (H). Cada linha de imagens mostra o mesmo corte com imagem obtida na de luz visível e utilizando-se um filtro de contraste de interferência diferencial (DIC) (A, B, C) e núcleos evidenciados com DAPI (D, E, F). Barra de escala = 20 mM.

Figura 4. Imunofluorescência da fase final das larvas de *T. crassiceps*. Cortes de 7 mm foram incubados com anticorpos produzidos contra BSA (G), contra TcCa (H) ou NC-1/BSA (I) e posteriormente com anticorpos contra

imunoglobulinas de camundongos marcadas com Alexa 488. Uma marcação uniforme pode ser vista quando os anticorpos contra TcCa (H) foram testados, mas com uma intensidade muito menor do que aquela na qual anticorpos contra o peptídeo NC-1/BSA foram utilizados (I). Cada linha de imagens mostra o mesmo corte. As imagens foram obtidas em luz visível com um filtro de contraste de interferência diferencial (DIC) (A, B, C) e os núcleos foram evidenciados com DAPI (D, E, F). Barra de escala = 20 mM.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A sequência peptídica NC-1 selecionada por *Phage Display* que mimetiza epitopo(s) de proteínas de *Taenia solium* foi quimicamente sintetizada e carregada à albumina bovina sérica para ser utilizada como imunógeno em camundongos. Posteriormente, esses animais foram desafiados com cisticercos de *T. crassiceps*, um modelo experimental da cisticercose causada pela *T. solium*. A vacinação com NC-1 reduziu a parasitemia em 74%. A influência da imunização também foi observada sobre o tamanho e sobre o estágio de desenvolvimento do parasito. Através de imuno-histoquímica, os anticorpos de camundongos imunizados com o peptídeo NC-1 reconheceram proteínas do tegumento da fase do cisticerco conhecida como reprodutiva por apresentar brotos, enquanto uma intensa imunomarcação foi observada na fase final da larva de *T. crassiceps*. A capacidade protetora de NC-1 e sua reatividade frente às proteínas de tegumento mostram que este mimotopo é um candidato em potencial para uma vacina contra cisticercose humana e animal.

Animais

Camundongos com sete a oito semanas de vida foram mantidos no Biotério do Centro de Pesquisa e Produção de Imunobiológicos (CPPI), Piraquara - PR, de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, certificado nº 507. Os animais foram divididos em três grupos contendo sete ou oito indivíduos cada um, que tiveram acesso *ad libitum* à ração e água.

Preparação dos antígenos

O peptídeo sintético NC-1 foi obtido como descrito por Hell *et al.*, 2009 e carregado à albumina sérica bovina (BSA). Primeiramente, a BSA na concentração de 10 mg/ml foi diluída em tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4) contendo cloreto de sódio 0,15 M para que fosse acoplada ao ligante sulfosuccinimidil 4 - (N maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC, Pierce Chemical Co., Rockford , IL). A solução foi mantida à temperatura ambiente durante 1 h sob agitação. O reagente em excesso foi removido por eluição através de uma coluna PD-10 descartável. A BSA ativada com sulfo-SMCC foi ligada ao peptídeo (5 mg/ml) por meio da cisteína contida nele. A reação aconteceu em temperatura ambiente por 2 h sob agitação e protegida da luz. Após a incubação, 1 mM de cisteína foi adicionado. O peptídeo carregado à BSA foi aliquoteado e estocado a - 20 °C.

O antígeno bruto da cepa de *T. crassiceps* (TcCa) foi obtido após passagens consecutivas de cisticercos pela cavidade peritoneal de camundongos e processado conforme descrito por Vaz *et al.* 1997 (Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RMF *et al.* Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg* 1997; **57** 354-7).

20 Comparação da sequência peptídica de NC-1 com sequências depositadas no banco de dados BLAST

A sequência de aminoácidos de NC-1, SKSSITITNKRLTRK (Hell e cols., 2009), foi analisada para se avaliar a similaridade com outras sequências peptídicas conhecidas de espécimes da família Taeniidae através do algoritmo de busca BLAST (Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA *et al.* "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs" *Nucleic Acids Res* 1997; **25** 3389-402) no banco de dados público do NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Cada pesquisa foi limitada a apenas um único organismo.

30 A busca foi realizada no banco de dados dos seguintes Taeniidae: *Taenia crassiceps*, *T. solium*, *T. saginata*, *T. hydatigena*, *T. multiceps* e *T. asiatica*.

Os pontos isoelétricos (pI) teóricos e a massa molecular (MM) das proteínas de *Taenia* sp foram obtidos a partir do programa Compute pI/Mw Program at the Expasy (http://expasy.org/tools/pi_tool.html).

5 Através da análise por bioinformática, a seqüência de aminoácidos do peptídeo NC-1 foi comparada com seqüências primárias de proteínas de espécimes do gênero *Taenia* depositadas no banco de dados (Tabela 1).

Tabela 1- Alinhamento da seqüência de aminoácidos de NC-1 com proteínas de *Taenia* sp.

Peptídeos	Seqüências
NC-1	SKSSITITNKRLTRK
Citocromo c oxidase subunidade III (<i>T. crassiceps</i>)	ILLGSSITITAFHHLLG 102 107
Citocromo c oxidase subunidade III (<i>T. solium</i>)*	VLLGSSITVTAFHHLLG 102 107
NADH desidrogenase subunidade IV (<i>T. crassiceps</i>)*	VLIKSSINGINLIMIVV 316 323

Os aminoácidos em negrito significam o consenso entre as seqüências.

*Resultados idênticos foram obtidos no alinhamento com outras espécies do gênero *Taenia*.

10

Como se pode observar, as pesquisas utilizando seqüências peptídicas curtas podem ter grande semelhança e geralmente apresentam alinhamentos com alto valor de E. Foi estipulado um valor mínimo e máximo de E, ou seja, somente alinhamentos com valor entre 0,04 e 5,0 foram listados. Embora o banco de dados de espécimes Taeniidae seja escasso, algumas seqüências de proteínas mitocondriais de *Taenia* sp tiveram similaridade com a seqüência de NC-1, como por exemplo subunidades da citocromo c oxidase e NADH desidrogenase, além de uma proteína estrutural dos músculos de invertebrados, a paramiosina (Tabela. 2).

15

20 **Tabela 2-** Alinhamento da seqüência peptídica NC-1 com seqüências de proteínas de *Taenia* SP.

Proteínas	p//MM (kDa) teóricos	Espécie de <i>Taenia</i> /Acesso
Citocromo c oxidase subunidade III	4.8 /24.9	<i>T. crassiceps</i> (NP_066229.2)
	5.3 / 24.4	<i>T. solium</i> (NP_659225.1)

	4.9 / 24.3	<i>T. hidatigena</i> (YP_003001995.1)
	4.9 / 24.4	<i>T. taeniaeformis</i> (YP_004062129.1)
	5.0 / 24.3	<i>T. multiceps</i> (YP_003001970.1)
NADH desidrogenase subunidade II	4.8 / 34.7	<i>T. crassiceps</i> (NP_066234.2)
	5.7 / 48.7	<i>T. crassiceps</i> (NP_066232.2)
	5.8 / 48.1	<i>T. saginata</i> (YP_001527637.1)
NADH desidrogenase subunidade IV	5.4 / 46.0	<i>T. hydatigena</i> (YP_003001998.1)
	5.7 / 48.1	<i>T. multiceps</i> (YP_003001973.1)
NADH desidrogenase subunidade V	5.8 / 60.0	<i>T. saginata</i> (YP_0015277645.1)
	6.0 / 59.8	<i>T. multiceps</i> (YP_003001981.1)
Paramiosina	5.3 / 98.8	<i>T. solium</i> (AAT94289.1) <i>T. saginata</i> (P35418.2)

Acesso ao banco de dados em dezembro de 2010. Alinhamentos com valor de E entre 0,04 e 5,0 estão listados. Ponto isoelétrico (pI) teórico e massa molecular (MM) das proteínas calculados com base na estrutura primária, por meio do programa ExPASy Compute pI/MW pedagógico ([www. http://expasy.org/tools/pi_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html)). Número do código de acesso em parêntesis.

- 5 A presente invenção pode ser melhor compreendida, de forma não limitante, através dos exemplos que se seguem:

Exemplo 1: Imunizações

O peptídeo sintético NC-1 carregado à BSA, o antígeno bruto de *T. crassiceps* (TcCa) e a proteína BSA usada como controle negativo foram emulsionados com adjuvante de Freund completo para a primeira imunização. Uma dose correspondente a 20 µg de cada imunógeno foram injetados sub-

cutâneamente nos camundongos. Em intervalos de duas semanas, os animais receberam novas doses intraperitoniais dos imunógenos emulsificados com adjuvante incompleto de Freund. Uma semana após a quarta e oitava imunização, cerca de 20 µl de sangue foram coletados dos camundongos para que a reatividade de seus soros fosse avaliada por ELISA.

Exemplo2: Reatividade dos anticorpos produzidos após a 4^a e 8^a imunizações

Placas de 96 poços (Falcon) foram sensibilizadas com 10 µg/ml de cada um dos três diferentes antígenos (peptídeo NC-1 não carregado à BSA, TcCa e BSA). Após o bloqueio da placa com caseína a 2% diluída em PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), diluições seriadas dos soros dos camundongos foram feitas em tampão de incubação (PBS-T contendo 0,25% de caseína), adicionadas aos poços e incubadas a 37°C durante 1 h.

A reação antígeno-anticorpo foi verificada com a adição de imunoglobulina de coelho contra imunoglobulina de camundongo conjugada à peroxidase em diluição 1:4000. A reação enzimática foi revelada utilizando-se ortofenilenodiamina (OPD) e H₂O₂ e inibida com a adição de 20 µL de ácido sulfúrico 2N. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 492 nm.

Após a quarta imunização, foi observada a presença de anticorpos em todos os grupos de camundongos; no entanto, os animais imunizados com TcCa apresentaram reatividade inferior quando comparados aos outros dois grupos. Com o emprego do teste ANOVA (análise de variância), a diferença de reatividade foi significativa entre os três grupos ($p < 0,05$), considerando os três imunógenos (NC-1/BSA, TcCa e BSA) e a interação entre os grupos. Essa interação foi interpretada como se as diferenças entre os imunógenos não fossem as mesmas nas duas sangrias. Para verificar esta interação, a análise foi complementada com a comparação das médias utilizando o teste post-hoc de Tukey.

A desigualdade entre os grupos mudou após a última dose de reforço dos imunógenos. O teste de Tukey mostrou que, após a 8^a imunização, a reatividade média dos anticorpos foi semelhante (Figura 1). Estes resultados

significam que, no momento do desafio dos camundongos com os parasitos, esses animais apresentavam-se nas mesmas condições de imunização, independentemente do imunógeno.

5 **Exemplo 3: Proteção induzida pelo peptídeo NC- 1 e Influência da imunização no desenvolvimento de cisticercos**

Uma semana após a última dose de reforço, os camundongos foram desafiados com cinco cisticercos de *T. crassiceps*.

10 A fim de analisar o potencial protetor do peptídeo NC-1, os camundongos foram imunizados com o peptídeo sintético carregado à BSA (NC-1/BSA), somente com BSA (como controle) ou com TcCa. Quatro semanas após o desafio, os animais foram sacrificados e submetidos à lavagem peritoneal com tampão fosfato e salina (0,01 M tampão fosfato de sódio, 0,15 M NaCl, pH 7,2) para a remoção dos cisticercos que foram contados.

15 Como resultado da imunização NC-1/BSA, observou-se uma diminuição da carga parasitária média em 74,2% quando comparado ao grupo BSA, controle negativo (Tabela 3). Da mesma forma, no grupo imunizado com a TcCa, o grupo controle positivo, a proteção foi de 77%.

20 Para a análise estatística, os dados relativos ao número de cisticercos recuperados foram transformados pela equação $\sqrt{x + 0,5}$. Considerando a média do número de cisticercos de cada grupo, foi possível verificar que os animais imunizados com o peptídeo NC-1/BSA ou com TcCa apresentaram taxas similares de proteção. Por outro lado, ambos os grupos foram significativamente diferentes do grupo controle imunizado com BSA (ANOVA, $p = 0,0113$).

25 **Tabela 3-** Indução de proteção contra infecção por *T. crassiceps* pela imunização com peptídeo NC-1

Imunógeno	Número individual de cistos	Parasitos recuperados (média)*	Proteção (%)

NC-1/BSA	1, 243, 0, 91, 60, 14, 0	58.4 ± 87.6	74.2%
TcCa	143, 38, 0, 38, 134, 0, 0	50.4 ± 64.1	77.7%
BSA	361, 327, 293, 34, 156, 341, 135, 164	226.4 ± 119.5	

*A recuperação dos cisticercos foi realizada 30 dias após o desafio. ANOVA não revelou diferença significativa entre os grupos NC-1/BSA TcCa. No entanto, ambos os grupos foram estatisticamente diferentes ($p = 0,0113$) do grupo de camundongos imunizados com BSA (grupo controle negativo)

Após a contagem total de cisticercos presentes no peritônio de camundongos, os cistos foram classificados de acordo com o comprimento ou diâmetro do parasito bem como o estágio de desenvolvimento que ele se encontrava, ou seja, com ausência ou presença de brotos: fase inicial e larval, respectivamente, ou no estágio final.

O teste do qui-quadrado permitiu verificar que o número de cisticercos recuperados de camundongos imunizados com NC-1/BSA foi estatisticamente diferente ($p < 0,0001$, qui-quadrado = 58) do grupo controle negativo (Tabela 4). A falta de proteção imunológica permitiu que um elevado número de cisticercos pudesse se desenvolver e persistir, especialmente como larva, fase considerada reprodutiva pela presença de brotos. Como esperado, os dados do grupo imunizado com TcCa foram diferentes do grupo controle imunizado somente com BSA ($p < 0,0001$, qui-quadrado = 16), porém a influência das imunizações com NC-1/BSA e com TcCa no desenvolvimento de cistos mostrou valores de $p = 0,0078$ e qui-quadrado = 7. Embora o grupo imunizado com NC-1/BSA tenha tido um número de cistos larvários menor que o encontrado no grupo imunizado com TcCa, os resultados indicam que o peptídeo NC-1 é tão bom indutor de imunoproteção quanto TcCa.

Tabela 4- Análise morfométrica das larvas recuperadas do peritônio de camundongos imunizados e a influência da imunização no desenvolvimento dos cisticercos.

Imunógeno	Camundongo s examinados	Tamanho (mm) (média ±SD)	Estágio dos cisticercos (%)		
			Inicial	Larval	Final

	(n)				
NC-1/BSA	7	1.83 ± 1.04	225	154	0
			qui-quadrado = 58 p<0.0001		
TcCa	7	2.02 ± 1.03	175	178	0
			qui-quadrado = 16 p<0.0001		
BSA	8	2.49 ± 1.34	690	1120	1

A influência da imunização do peptide NC-1/BSA sobre o desenvolvimento dos cistos comparado com o imunógeno TcCa apresentou valores de qui-quadrado = 7 e p=0.0078.

Resultados semelhantes foram obtidos quando o comprimento ou o diâmetro dos cistos foi avaliado após a classificação. Considerando a grande variação entre os parasitos, os cisticercos foram separados em três grupos: ≤ 1 mm, 1 <x <5 mm e ≥ 5 mm. O peptídeo acoplado bem como o antígeno bruto foi capaz de induzir proteção nos animais e evitar o aumento no tamanho dos parasitos (Figura 2).

Exemplo 4: Imunolocalização de proteínas de larvas de *T. crassiceps* com anticorpos contra o peptídeo NC-1

Metacestódeos de *T. crassiceps* na fase larval, com 2 a 3 mm e com brotamentos, e também na fase final, caracterizada por uma vesícula opaca e sem brotos (Vinaud, e cols., 2007), foram retirados de um camundongo infectado independente e fixados em paraformaldeído a 4% por 20 minutos. Após lavagem em PBS (KCl 2,7 mM, KH₂PO₄1,8 mM , NaCl 137 mM , Na₂HPO₄10 mM , pH 7,2, 304 mOsm/kg H₂O), as amostras foram embebidas em Tissue-Tek OCT (Sakura), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Utilizando-se o criostato Leica CM1850 (Leica Microsystems, Alemanha), os tecidos foram seccionados com 7 mm de espessura, colocados em lâminas previamente preparadas com solução 2% de Biobond (SME) em acetona por 4 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas por 5 minutos em água destilada e secas ao ar. Os radicais aldeído foram bloqueados usando glicina 0,1 M por 2 minutos. Após duas lavagens com PBS, os sítios inespecíficos foram bloqueados por 30 minutos com

caseína 2% diluída em PBS e 0,1% Triton X-100. Posteriormente, os cortes foram incubados por 2 horas com anticorpos dos camundongos diluídos 1:50 em PBS contendo 2% de caseína. Os anticorpos não ligados foram removidos após três lavagens com PBS consecutivas. Finalmente, o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado ao marcador Alexa 488 (Invitrogen) foi diluído 1:250 em PBS contendo 2% de caseína e incubado por 1 h à temperatura ambiente e protegido da luz. Para a coloração nuclear, 10 mM de DAPI foram utilizados por 5 minutos. As lâminas foram examinadas em microscópio invertido Zeiss Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Alemanha). A fluorescência foi verificada a 488 nm com o uso do filtro LP 505 nm (canal verde). Imagens individualizadas foram obtidas usando a lente de 40x para interface de contraste diferencial (DIC) e câmera monocromática (AxioCam GRH, Zeiss, Carl Zeiss, Alemanha). Finalmente, o software AxioVision LE foi utilizado para processamento de imagens e para as medidas morfométricas, utilizando-se o formato de imagem Zeiss (ZVI).

Os anticorpos anti NC-1/BSA testados sobre o antígeno particulado da fase larval de *T. crassiceps* mostraram que a proteína reconhecida está presente no tegumento dos cisticercos e em algumas regiões do parênquima. A marcação com o anticorpo anti NC-1 ocorreu principalmente na superfície do tegumento (Figura 3 I). A mesma reatividade não foi observada nos tecidos internos em comparação ao padrão de imunofluorescência dos anticorpos anti TcCa.

Neste caso, embora a marcação com o anticorpo tenha sido desigual com predomínio de reatividade sobre o tegumento, as proteínas do parênquima também foram significativamente reativas (Figura 3 H).

O perfil de reatividade mudou quando cortes da etapa final de *T. crassiceps* foram testados. A imunofluorescência após o uso de anticorpos produzidos contra o antígeno bruto de *T. crassiceps* foi mais homogênea tanto no parênquima quanto no tegumento (Figura 4 H). Esta homogeneidade também foi verificada quando os anticorpos anti NC-1/BSA foram testados, mas curiosamente houve uma intensa coloração homogênea em todos os componentes do corte (Figura. 4 I).

Como esperado, nenhuma reatividade foi detectada nos cortes incubados com anticorpos produzidos contra a BSA utilizados como controle negativo, seja sobre a fase larval (Figura. 3 G) ou fase final do parasito (Figura. 4 G).

5 **Análise estatística**

A análise de variância (ANOVA) simples (one-way) foi utilizada para análise estatística dos resultados sendo o teste de Tukey utilizado para comparação de pares entre os grupos. A significância das diferenças da frequência das fases inicial, larval ou final dos cisticercos entre os diferentes grupos foi determinada pelo teste do qui-quadrado. O valor de $p < 0.05$ foi usado como parâmetro para indicar diferença estatisticamente significativa nos métodos estatísticos utilizados.

REIVINDICAÇÃO

1. Vacina e/ou composição imunogênica para teníase e cisticercose caracterizada por compreender o peptídeo NC-1 definido pela SEQ ID Nº1, BSA, adjuvante de Freud e um veículo farmacêuticamente aceitável.

FIGURAS

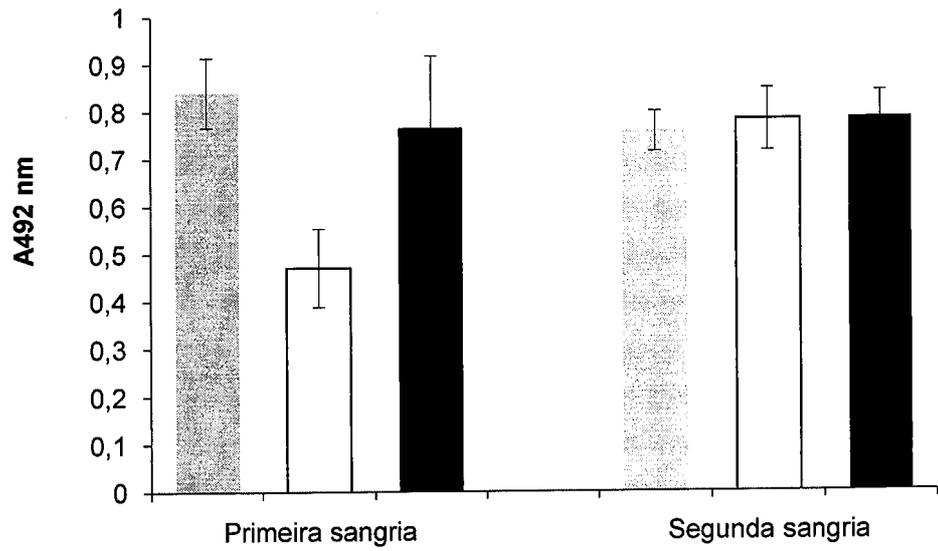


Figura 1

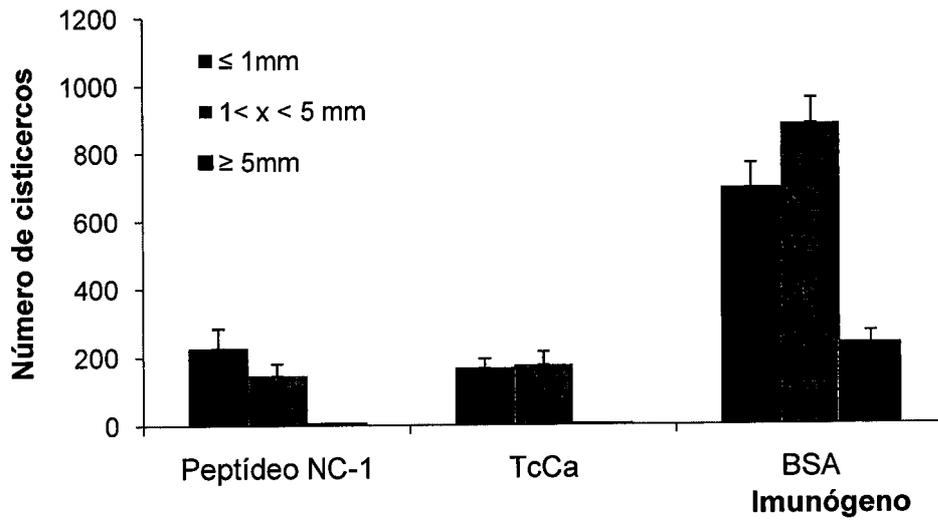


Figura 2

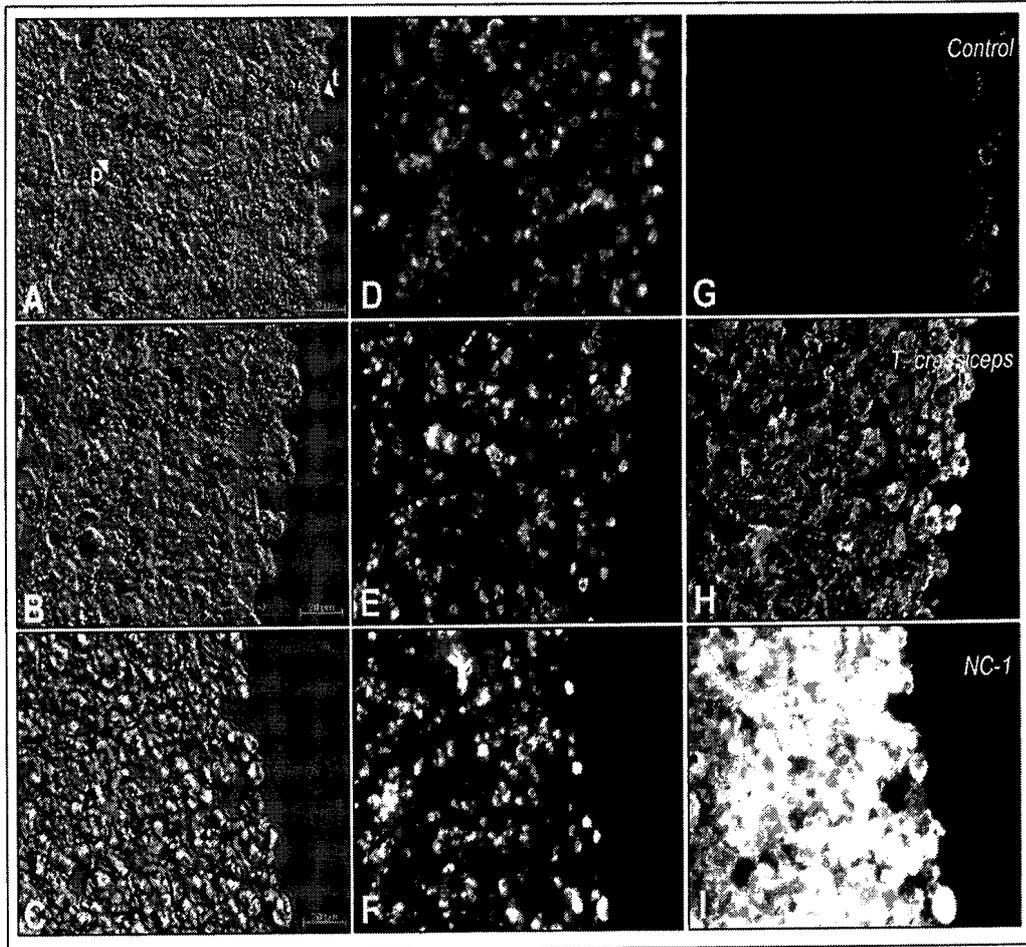


Figura 3

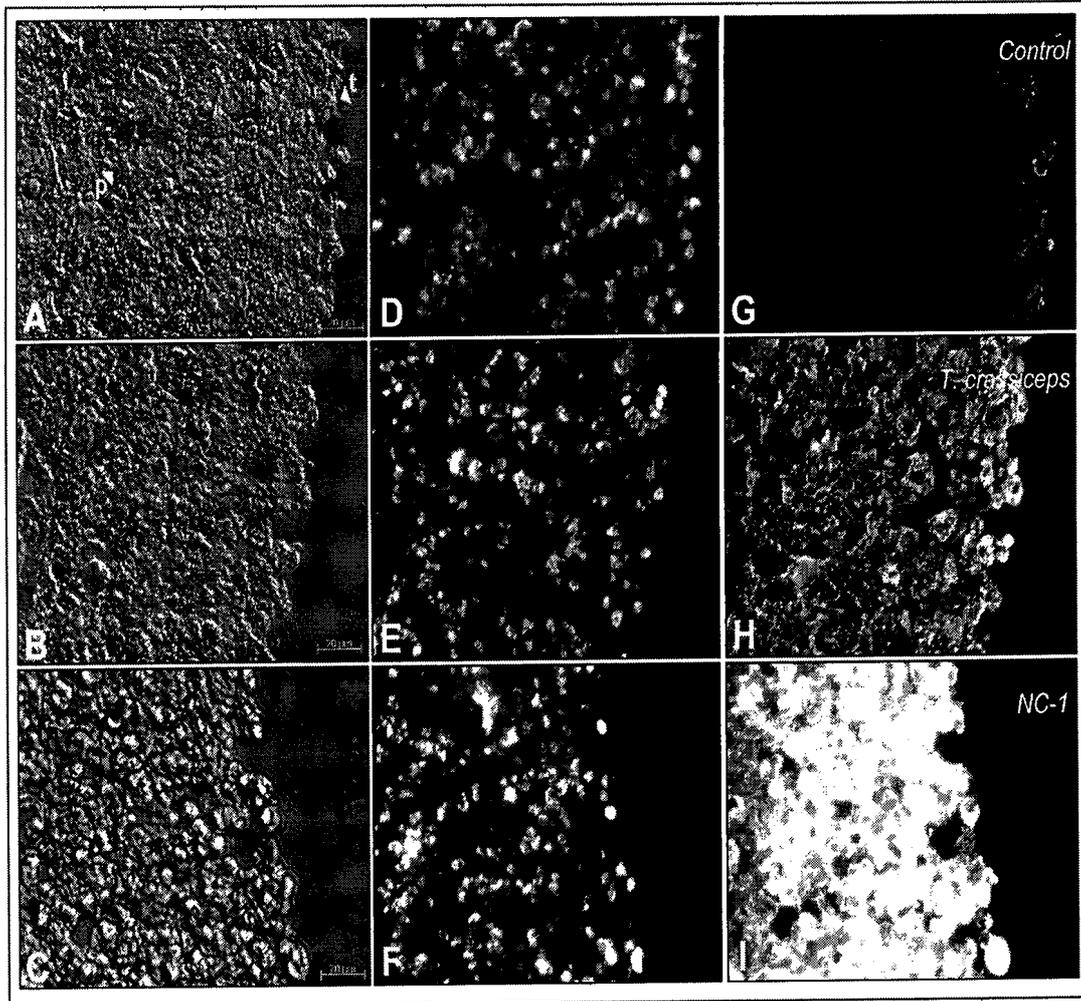


Figura 4