Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**Sistemas carreadores de proteínas antigênicas da membrana de
Pasteurella multocida para a prevenção da pasteurelose.**

Katia Regina Perez Daghastanli

Orientador: Prof. Dr. Pietro Ciancaglini

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Doutor em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

2004

Daghastanli, Katia Regina Perez

Sistemas carreadores de proteínas antigênicas da membrana de *Pasteurella multocida* para a prevenção da pasteurellose.

Ribeirão Preto, 2004

101 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Ciancaglini, Pietro.

1. *Pasteurella multocida*. 2. *Delivery* de antígenos. 3. Lipossomos. 4. Produção de anticorpos. 5. Microesferas lipídicas.

***“Não basta ter belos sonhos é preciso realizá-los.
Mas ninguém realiza grandes obras se não for capaz
de sonhar grande.
Podemos mudar nosso destino se nos dedicarmos
à luta pela realização de nosso sonho;
de examinar com atenção a vida real;
de confrontar nossa observação com nosso sonho,
de realizar escrupulosamente nossa fantasia.
Sonhos, acredite neles.”***

Lenin

Dedico ao meu filho Adnan

que mesmo tão “pequenino” incluiu em seu vocabulário os termos laboratório, experimento, relatório, artigo, Tese, entre outros.

Filho saiba que você com o seu amor incondicional é o ponto de equilíbrio e motivação, neste e noutros projetos de vida.

Aos meus Pais

**“Vocês um dia sonharam conosco...
e nos amaram antes que nós existíssemos.
Vocês se alegraram com nossa chegada ao mundo
Como alguém que recebe um lindo presente.
Vocês nos acolheram, nos alimentaram, nos educaram.
Vocês acompanharam nosso crescimento
e muitas vezes renunciaram aos seus sonhos
Para que os nossos se realizassem.
Vocês são o exemplo da fé e esperança que nos dá
muita força e coragem para vencer na vida.
Seus gestos de bondade.
Sua atitude sempre amável.
Enchem nossas vidas de gratidão por vocês.
E, num grande abraço nossos corações lhes dizem em prece:
Muitíssimo obrigado, que Deus os abençoe e proteja.”**

Ao Nasser

***Pelo grande companheiro que tem sido nestes anos, pela
paciência, pelo amor e, principalmente, por sempre ter me
incentivado a superar os desafios***

Ao Pietro

Ensinar é crer, acreditar que se pode contribuir para a formação de um caráter, é compartilhar suas próprias experiências.

Ao meu mestre, pela lição do saber, pela orientação constante, pela dedicação, por repartir sua experiência de vida e me auxiliar a trilhar este caminho.

Meu respeito e afeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À FAPESP pela bolsa e reservas técnicas concedidas durante o desenvolvimento deste projeto (00/08099-6).

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela colaboração no desenvolvimento dos ensaios imunológicos realizados neste trabalho, pelas interessantes e valiosas discussões e pela amizade, sinceramente o meu muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Bruno Maggio da Universidade Nacional de Córdoba, Argentina, pela colaboração e valiosa discussão.

Aos colegas de laboratório Ana Maria, Carolina, Geraldo, Hérica, Luiz Eduardo (Dudu), Mariana, Maytê, Prislaine, Roberto, Rodrigo e Tony pelo companheirismo e alegria.

Aos amigos Alessandra, Elisangela (Lica), Fábio Doro, Fernanda, Ivy, Lucimara e Thaís pelo apoio e pela divertida convivência.

Ao Nilton Rosa Alves, Dra. Ivana Aparecida Borin e Carlos Artério Sorgi pelo apoio técnico.

Ao Rinaldo B. Ferreira, que colaborou na obtenção da P. multocida bem como na coleta dos soros dos coelhos.

Aos funcionários do Biotério Central, principalmente o “Zé”, que de alguma forma colaboraram na realização deste trabalho.

À Maria Dolores (Tuca) e José Augusto do Departamento de Morfologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pela ajuda e disponibilidade na obtenção de imagens de microscopia eletrônica.

Às Profas. Dra. Juliana Maldonado Marchetti pela colaboração na obtenção das microesferas lipídicas e Dra. Maria Elizabeth Zaniquelli pela disponibilização do equipamento de espalhamento de luz.

À Priscila Cerviglieri Ciancaglini e ao Prof. Dr. Richard John Ward pela correção dos textos em Inglês, muito obrigada.

Aos docentes, técnicos, funcionários e demais pessoas do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

À CAPES e CNPq pelos auxílios financeiros concedidos ao laboratório.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para com este trabalho.

ÍNDICE

Abreviações.....	XII
Abstract.....	XIII
Resumo.....	XVI
 1 – Introdução.....	 1
1.1 – A Pasteurelose.....	1
1.2 – A <i>Pasteurella multocida</i>	2
1.3 – Estrutura antigênica.....	3
1.4 – Tratamento.....	4
1.5 – Solubilização e uso de detergentes.....	7
1.6 – Reconstituição de componentes de biomembranas.....	8
1.6.1 – Lipossomos como estruturas que mimetizam membranas.....	8
1.6.2 – Incorporação de proteína à membrana (proteolipossomos).....	10
1.7 – O uso de proteolipossomos na Imunologia.....	12
1.8 – Classes de adjuvantes para uso veterinário.....	15
1.8.1 – Adjuvantes baseados em alumínio.....	15
1.8.2 – Emulsões oleosas.....	16
1.8.3 – Micropartículas.....	17
1.8.4 – Lipossomos.....	18
 2 – Objetivos.....	 19
2.1 – Objetivos gerais.....	19
2.2 – Objetivo específico.....	19
 3 – Materiais e métodos.....	 20
3.1 – Animais.....	20
3.2 – Obtenção da <i>P. multocida</i>	20
3.3 – Obtenção e isolamento das membranas da <i>P. multocida</i>	20
3.4 – Dosagem de proteínas.....	21
3.5 – Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE).....	21
3.6 – Solubilização das proteínas das frações de membrana da <i>P. multocida</i>	22
3.7 – Obtenção do anticorpo para realização do <i>Western</i> <i>Blotting</i>	22
3.8 – Purificação de imunoglobulina G (IgG).....	22
3.9 – <i>Western Blotting</i>	22
3.10 – Preparação dos proteolipossomos.....	23
3.11 – Determinação da concentração de SDS.....	24
3.12 – Dosagem de fosfato inorgânico.....	25
3.13 – Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reconstituído.....	25
3.14 – Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose.....	26
3.15 – Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico.....	26
3.16 – Determinação da quantidade de <i>ufc</i> da <i>P. multocida</i> para a infecção experimental (LD ₅₀).....	27

3.17 – Avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para <i>P. multocida</i>	27
3.18 – Remoção do SDS do extrato bruto solubilizado.....	28
3.19 – Imunização de coelhos com proteolipossomos e avaliação da capacidade protetora da imunização pela infecção experimental com <i>P. multocida</i>	29
3.20 – Obtenção das microesferas lipídicas ou microcápsulas.....	29
3.21 – Marcação das proteínas antigênicas com fluoresceína isotiocianato (FITC).....	30
3.22 – Microscopia eletrônica de varredura.....	30
3.23 – Microscopia de Fluorescência.....	31
4 – Resultados.....	32
4.1 – Obtenção, solubilização e identificação das proteínas antigênicas da membrana da <i>P. multocida</i>	32
4.2 – Preparação e caracterização dos proteolipossomos.....	34
4.3 – O uso dos proteolipossomos como sistemas de imunização contra a pasteurelose.....	44
4.4 – Padronização do método imunoenzimático (ELISA) para análise dos níveis de anticorpos IgG específicos para <i>P. multocida</i> no soro de coelhos.....	46
4.5 – Padronização do método imunoenzimático (ELISA) para análise dos níveis de anticorpos IgM específicos para <i>P. multocida</i> no soro de coelhos.....	50
4.6 – Padronização do método imunoenzimático (ELISA) para análise dos níveis de anticorpos IgA específicos para <i>P. multocida</i> no soro de coelhos.....	53
4.7 – Avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para <i>P. multocida</i> em coelhos imunizados com proteolipossomos antes e depois da infecção experimental.....	57
4.8 – Avaliação da sobrevivência dos coelhos imunizados com proteolipossomo e desafiados com <i>P. multocida</i>	59
4.9 – Preparação de microesferas lipídicas.....	63
4.9.1 – Microesferas lipídicas brancas.....	63
4.9.2 – Microesferas lipídicas contendo proteínas antigênicas da membrana da <i>P. multocida</i> (microcápsulas).....	68
5 – Discussão.....	74
5.1 – Obtenção e caracterização dos proteolipossomos.....	74
5.2 – Eficiência de proteção contra a pasteurelose utilizando proteolipossomos.....	81
5.3 – Obtenção das microesferas lipídicas.....	83
6 – Bibliografia.....	88
7 – Adendo.....	101

ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
BHI	Brain Heart Infusion (infusão de cérebro e coração)
BSA	Albumina de soro bovino
CMC	Concentração micelar crítica
CMT	Temperatura micelar crítica
DAB	3,3' diaminobenzidina
DEAE	Dietilaminoetil celulose
DLPC	Dilauroil fosfatidilcolina
DMPC	Dimiristoil fosfatidilcolina
DPPA	Dipalmitoil ácido fosfatídico
DPPC	Dipalmitoil fosfatidilcolina
DPPE	Dipalmitoil fosfatidiletanolamina
DPPG	Dipalmitoil fosfatidilglicerol
DPPS	Dipalmitoil fosfatidilserina
DSPC	Diestearoil fosfatidilcolina
EBS	Extrato bruto solubilizado
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GPI	Glicosil fosfatidilinositol
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina 4
IFN-γ	Interferon γ
IgM	Imunoglobulina M
LPS	Lipopolissacarídeos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
OPD	Cloreto de ortofenilenodiamina
PBS	Tampão fosfato salino
PVA	Álcool polivinílico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
Tween 20	Polioxietileno sorbitan monolaurato
ufc	Unidade formadora de colônia

Abstract

Pasteurellosis is a common disease in the respiratory tract of commercial and/or biomedical rearing of research rabbits. The bacterium *Pasteurella multocida* is the pathogen responsible for a range of clinical symptoms, including chronic rhinitis (snuffles), otitis media, pneumonia, genital infection, pulmonary and cutaneous abscesses, conjunctivitis and hemorrhagic septicemia. However, between 50 and 70 % of the animals can harbour the microorganism asymptomatically. The factors that cause the clinical symptoms include the ammonium accumulation in the air (foul ventilation), pregnancy, another concomitant disease, disorder in the rabbit production environment and experimental manipulation.

Outbreaks of this disease occur in Brazil with relative frequency; however diagnosis is generally based on the clinical signals and necropsy. Therefore, it is difficult to estimate the extent of losses caused by pasteurellosis during cuniculture. However, specific commercial vaccines against pasteurellosis in rabbits are not available and prevention is through the use of antibiotics in drinking water, even though this type of treatment generally does not protect the animals.

Initially, pure bacteria colonies were obtained, which were cultivated in specific growing media (BHI). The microorganisms were isolated, lysed and the antigenic proteins were detected by SDS-PAGE and *Western Blotting*. These results show that most protein bands were recognized by the polyclonal antibody against *P. multocida*.

Since this protein pool presented antigenicity, the protein mixture was solubilized by incubating 0,5 mg/ml of the membrane fraction with SDS 1 % (w/v) under constant agitation for 2 hours. This procedure resulted in a 85 % solubilization yield.

The proteoliposomes were formed using a lipid, protein and detergent co-solubilization method. A good yield of protein incorporation in liposomes seems to be related to the methodology used for the removal of the detergent from the lipid:protein:detergent mixture during the co-solubilization process, as well as the nature of the phospholipid used.

The results indicated that the Calbiosorb[®] resin was the most efficient for SDS removal and, among the various phospholipids tested, DPPC best

incorporated the proteins, presenting an incorporation yield of 93% and average proteoliposome diameter of 180 nm. In addition, SDS-PAGE of the proteoliposomes has shown that all the proteic species present in the crude solubilized extract were incorporated in the DPPC liposomes. The *Western Blotting* has shown that the proteins incorporated in the liposomes continue to be recognized by the polyclonal antibody against *P. multocida*.

For the immunization assays, three animal groups were separated: (i) rabbits immunized with liposomes; (ii) rabbits immunized with crude solubilized extract (CSE) and (iii) rabbits immunized with the proteoliposomes. After twenty-one days of immunization with the described preparations, the animals were challenged with 10^5 ufc of bacteria. All animals previously vaccinated with the liposomes or CSE died while the animals vaccinated with the proteoliposomes systems had 95 % survival after the challenge.

Moreover, a control group vaccinated with the attenuated bacteria in the presence of aluminum hydroxide as an immunoadjuvant had only 30% survival, indicating that the conventional vaccine does not protect against pasteurellosis.

The serum of animals vaccinated with liposome, CSE and proteoliposomes were collected weekly before and after the experimental infection for the detection of IgG, IgM and IgA antibodies production using ELISA. Animals vaccinated with liposomes did not present stimulation of any of the specific antibodies for the *P. multocida* analyzed. The animals immunized with CSE presented a significant increase in the IgA serum level seven days after the immunization, but these levels were not maintained until the moment of the experimental infection. After the experimental infection, the serum levels of IgG in rabbits immunized with proteoliposomes showed a significant increase, while for those animals immunized with the CSE the levels were maintained.

The analysis of IgM antibodies specific for the *P. multocida* showed a higher production to animals vaccinated with proteoliposomes than for the animals immunized with CSE. Furthermore, after experimental infection, the production of IgM in animals immunized with proteoliposomes continued to be stimulated, which was not observed for those immunized with EBS.

The proteoliposome system does not induce IgA systemic antibodies that were specific for the bacterium. However, after the experimental infections it was

possible to observe the gradual appearance of IgA in the nasal lavage of the infected animals on the time course of the experiment.

Animals previously immunized with the proteoliposomes which survived the first experimental infection were observed during 140 days and re-infected. After the re-infection, the survival of these animals was 100 %, indicating that the proteoliposome system was able to generate a possible immunological memory. The global analysis of the results obtained in the antibody detection indicates that the protection given by the proteoliposome against pasteurellosis is due to the stimulation of antibodies IgG and mainly of IgM.

The other delivery system of antigenic proteins developed during this work is of lipidic microspheres. Different protocols were tried, but the one which was more adequate to our experimental conditions was elaborated from joining and adapting two methodologies described in literature.

Scanning electron microscopy studies have shown that the lipidic microspheres are formed when 3 % (w/v) of PVA is used in the formulation. Furthermore, we have marked the proteins with fluorescein isothiocyanate and the microscopy revealed the presence of fluorescent spherical structures which indicated the encapsulation of the proteins in the lipophilic region of the microspheres. Systematic studies varying the concentration of oil, phospholipid, proteins and PVA in the microcapsules formulation has given a yield of encapsulation of 99%.

We have established methodologies of incorporation of the antigenic proteins in liposomes constituted of DPPC and lipidic microspheres. Moreover, the proteoliposome systems have shown a satisfying property of protection of rabbits against pasteurellosis in face of the experimental challenge with *P. multocida* indicating that the system proposed here can be used as a vaccine to prevent the pasteurellosis either in commercial or biomedical research rearing of rabbit.

Resumo

A pasteurelose é uma das doenças mais comuns do trato respiratório do coelho em criações comerciais e/ou em biotérios de animais destinados à pesquisa biomédica. A bactéria *Pasteurella multocida* é o patógeno responsável por uma série de manifestações clínicas em coelhos, incluindo rinite crônica, otite média, pneumonia, infecções no trato genital, formação de abscessos pulmonares e cutâneos, conjuntivite e septicemia hemorrágica. Porém, entre 50 e 70 % dos animais podem incubar o organismo de forma assintomática. Os fatores predisponentes para o desencadeamento dos sinais clínicos incluem acúmulo de amônia no ar (má ventilação), prenhez, aparecimento de doenças concomitantes, distúrbios no ambiente de criação ou na manipulação experimental.

A doença está presente no Brasil, ocorrendo surtos com relativa frequência, no entanto, o diagnóstico é feito com base nos sinais clínicos e necropsia. Dessa forma é difícil precisar a extensão dos prejuízos causados pela pasteurelose à cunicultura. Vacinas comerciais específicas contra a pasteurelose em coelhos não estão disponíveis no mercado. A prevenção, ainda que apresente resultados duvidosos, é realizada utilizando-se antibióticos dissolvidos na água, porém este tipo de tratamento normalmente não protege definitivamente os animais.

Uma vez que não existem vacinas disponíveis e o tratamento com antibióticos não estabelece proteção contra a pasteurelose, foram desenvolvidos neste trabalho sistemas carreadores das proteínas antigênicas da membrana da *P. multocida*. Estes sistemas carreadores são formados por lipossomos, já conhecidos pelo seu potencial como imunoadjuvante, e por microesferas lipídicas, responsáveis por apresentar os antígenos às células apresentadoras de antígenos (APC).

Inicialmente, foram obtidas colônias puras da bactéria as quais foram cultivadas em meio de crescimento específico (BHI). Os microrganismos foram isolados, rompidos e as proteínas antigênicas foram detectadas por SDS-PAGE e *Western Blotting*. Estes resultados mostraram que a maioria das bandas protéicas foi reconhecida pelo anticorpo policlonal contra a *P. multocida*.

Visto que tínhamos um *pool* de proteínas as quais apresentavam antigenicidade, foi realizada uma solubilização incubando frações de membrana

da bactéria com SDS 1 %. Este procedimento resultou em um rendimento de solubilização de 85 %.

A obtenção dos proteolipossomos foi realizada pelo método da co-solubilização de lipídio, proteína e detergente. Um bom rendimento de incorporação das proteínas em lipossomos parecer estar relacionada com a metodologia utilizada para a remoção do detergente da mistura lipídio:proteína:detergente durante o processo de co-solubilização, e também com a natureza do fosfolipídio utilizado. Os resultados indicaram que a resina Calbiosorb® foi a mais eficiente para a remoção do SDS e, dentre os diversos fosfolipídios testados o que melhor incorporou as proteínas foi o DPPC, com rendimento de incorporação de 93 % e diâmetro médio de 180 nm. Além disso, o SDS-PAGE dos proteolipossomos mostrou que todas as espécies protéicas presentes no extrato bruto solubilizado foram incorporadas nos lipossomos de DPPC. O *Western Blotting* mostrou que as proteínas incorporadas nos lipossomos continuavam a ser reconhecidas pelo anticorpo policlonal contra a *P. multocida*.

Para os ensaios de imunização foram separados 3 grupos de coelhos: (i) imunizados com lipossomos; (ii) imunizados com extrato bruto solubilizado (EBS); (iii) imunizados com os proteolipossomos. Após 21 dias de imunização com as preparações descritas, os animais foram infectados com 10^5 ufc de bactéria. Todos os animais vacinados previamente com lipossomos ou EBS foram a óbito enquanto que os animais vacinados com os sistemas de proteolipossomos apresentaram sobrevida de 95 %. Além disso, um grupo controle vacinado com a bactéria atenuada na presença de hidróxido de alumínio como imunoadjuvante apresentou uma sobrevida de apenas 30 %, indicando que a vacina convencional não apresenta uma proteção satisfatória contra a pasteurelose.

O soro dos animais vacinados com lipossomo, EBS e proteolipossomos foram coletados semanalmente antes e após a infecção experimental para a detecção da produção de anticorpos IgG, IgM e IgA, utilizando-se a técnica de ELISA.

Como esperado, os animais vacinados com lipossomos não apresentaram estimulação de nenhum dos anticorpos específicos para *P. multocida* analisados. Os animais imunizados com EBS apresentaram um significativo aumento dos níveis de IgG sérico 7 dias após a imunização os quais se mantiveram constantes durante todo o período experimental. Os níveis de IgG no soro de animais

imunizados com os proteolipossomos apresentam um aumento 7 dias após a imunização, porém não se mantiveram até o momento da infecção experimental.

Após a infecção experimental, os níveis séricos de IgG nos animais imunizados com proteolipossomos apresentam um aumento significativo, enquanto que para os imunizados com EBS houve manutenção dos níveis antes obtidos.

A análise de anticorpos IgM específicos para a *P. multocida* mostram uma produção significativamente maior destes anticorpos para animais imunizados previamente com proteolipossomos que para os animais imunizados com EBS. Além disso, após a infecção experimental, a produção de IgM nos animais imunizados com proteolipossomos continuou sendo estimulada, o que não foi observado para os animais imunizados com EBS.

O sistema de proteolipossomos não produz anticorpos IgA sistêmicos específicos para a bactéria, porém após a infecção experimental foi possível observar o aparecimento gradativo deste anticorpo no lavado nasal dos animais, durante as semanas de observação.

Os animais previamente imunizados com proteolipossomos sobreviventes da primeira infecção experimental foram observados durante 140 dias e novamente infectados, com nova carga bacteriana. Após a reinfecção a sobrevivência destes animais foi de 100 % indicando que o sistema de proteolipossomos foi capaz de gerar uma memória imunológica.

A análise conjunta dos resultados obtidos na detecção de anticorpos indica que a proteção proporcionada pelos proteolipossomos contra a pasteurelose é devida a estimulação de anticorpos IgG e, principalmente, de IgM.

O outro sistema de *delivery* de proteínas antigênicas desenvolvido foi o de microesferas lipídicas. Foram experimentados diferentes protocolos, porém o que mais se adequou as nossas condições foi obtido da união e adaptação de duas metodologias descritas na literatura.

Estudos de microscopia eletrônica de varredura mostraram que as microesferas lipídicas são formadas quando é utilizado 3 % (p/v) de PVA na formulação. Além disso, marcamos as proteínas com isotiocianato de fluoresceína e a microscopia revelou a presença de estruturas esféricas fluorescentes, indicando a encapsulação das proteínas na região lipofílica das microesferas. Estudos sistemáticos variando a concentração de óleo, fosfolípido,

proteínas e PVA na formação das microcapsulas permitiram um rendimento de encapsulação de cerca de 99 %.

Portanto, no presente trabalho, estabelecemos metodologias de incorporação das proteínas antigênicas em lipossomos constituídos de DPPC e em microesferas lipídicas. Além disso, os sistemas de proteolipossomos apresentaram uma satisfatória propriedade de proteção dos coelhos contra a pasteurelose (frente à infecção experimental com *P. multocida*) indicando que o sistema aqui proposto pode ser utilizado como vacina, prevenindo a pasteurelose em criações de coelhos comerciais ou destinados à pesquisa biomédica.

1 - Introdução

1.1 – A Pasteurelose

A pasteurelose é uma doença infecto-contagiosa, difundida nos cinco continentes. É causada por bactérias do gênero *Pasteurella*, podendo infectar tanto animais domésticos quanto animais silvestres (Carter, 1967; Cruickshank, 1969; Bier, 1985; Marandi et al., 1997). Além disso, ela pode causar uma grande gama de doenças indo desde a septicemia hemorrágica, uma doença aguda e fatal e cólera aviária, até algumas infecções secundárias comuns em uma variedade de animais. É considerada uma zoonose; infecções ocasionais em pessoas são derivadas, na maioria das vezes, de mordidas de animais infectados (Frost e Adler, 2000).

Esta doença é comum, crônica e persistente em criações de coelhos comerciais ou para pesquisa no mundo todo, sendo muito difícil a sua eliminação depois de instalada em uma criação de coelhos (Deeb et al., 1990; Peterson et al., 1997; Deeb, 1998). A *P. multocida* apresenta-se muito resistente no ambiente externo ao hospedeiro, podendo sobreviver por dias em dejetos de secreções ou na água potável. Geralmente, o seu surgimento em uma colônia de coelhos deve-se a fatores tais como: ambientais, higiênico-sanitários, de estresse e/ou entrada de animais novos na colônia (DiGiacomo et al., 1991; Spilki, 2002).

Este patógeno causa, na maioria das vezes, lesões inflamatórias ou purulentas no aparelho respiratório dos animais, sendo normalmente isolada das vias aéreas superiores. Outros sinais clínicos da doença também são observados, tais como: renite, conjuntivite, dermatite, pneumonia, pleurite, mastite, otite média, orquite, metrite e abscessos subcutâneos. Esta bactéria pode induzir o hospedeiro a um quadro clínico agudo com potencial de evolução para septicemia hemorrágica, com conseqüente morte do portador (Lu et al., 1991; Spilki, 2002).

A principal via de transmissão do microrganismo infectante é o contato entre animais hígidos e infectados. O contágio pode ser direto ou indireto, inclusive pelo coito (machos com orquite ou fêmeas com metrite), podendo ocorrer através do contato com alimentos, água, gaiolas, ninhos e utensílios contaminados pelas fezes, secreções ou mesmo através de outros veículos como pessoas e insetos (DiGiacomo et al., 1983).

Os humanos normalmente são infectados quando sofrem mordidas ou arranhões profundos de animais doentes, porém foi constatado por Hubbert e Rosen (1970), que 31 % dos pacientes contaminados não tinham nenhuma história de contato com animais ou tecidos de animais infectados. Estas infecções em humanos geralmente podem estar incluídas em uma das três categorias: (i) infecções localizadas, consistindo de abscessos ou adenites – estas infecções podem progredir para a osteomielite em ossos adjacentes quando a doença for ocasionada por mordidas profundas de animais doentes; (ii) infecções pulmonares crônicas nas quais a *P. multocida* é o patógeno primário ou está associado a outros organismos; (iii) doenças sistêmicas ou meningite (Swartz e Kunz, 1959; Wade et al., 1999).

1.2 – A *Pasteurella multocida*

Na virada do século passado Lignières apresentou uma classificação das espécies de *Pasteurella* a qual recebeu uma nomenclatura de acordo com o nome do animal hospedeiro, por exemplo, *P. bovisseptica*, *P. suisseptica*, etc. Estes nomes não têm sido usados com frequência desde que a sociedade aceitou vastamente o nome *P. multocida*, que foi proposto por Rosenbush e Merchant, em 1939. O nome *Pasteurella septica*, sugerido por Topley e Wilson em 1936, devido à septicemia hemorrágica, foi muito empregado nos países da comunidade Britânica. Após estudos visando a identificação e caracterização destas bactérias, que se concentraram principalmente nas décadas de 60 e 70 por Carter, o nome *P. multocida* teve sua aceitação quase universal (Carter, 1967).

A *P. multocida* possui a forma de bastonete curto, Gram-negativo, que apresenta coloração bipolar quando revelada pelo corante de Wayson (azul de metileno com fuccina fenolada), o que lhe confere o aspecto de alfinetes de segurança. É aeróbia ou microaerófila, não possui esporos ou cílios, é catalase-positiva e oxidase-negativa. É imóvel e degrada diversos carboidratos produzindo ácidos, mas não gás. Muitas culturas são pleomórficas no isolamento inicial ou quando crescem sob condições desfavoráveis, como sob a redução de oxigênio. Longas formas filamentosas são freqüentemente observadas em culturas velhas de laboratório (Carter, 1967; Cruikshank, 1969; Bier, 1985).

Esta bactéria pode ser cultivada em meio bacteriológico comum, entretanto desenvolve-se mais rapidamente em meios que contêm infusões de tecidos ou

sangue. O diâmetro das colônias após 18 a 24 h de incubação é de aproximadamente 1 a 2 mm. Não provocam a lise das células vermelhas, mas descoloram o ágar sangue deixando o meio esverdeado, além disso, possuem um forte odor. A partir de tecidos infectados desenvolvem-se colônias viscosas e acinzentadas, mas em geral, se formam também colônias irregulares e rugosas (Carter, 1967; Cruikshank, 1969; Bier, 1985).

Variantes e mutantes estáveis ocorrem comumente em relação ao aspecto, à morfologia, características bioquímicas, constituição antigênica, virulência e resistência à droga. Diversos sorotipos, variantes, têm sido classificados e separados de acordo com a constituição capsular e somática (Carter, 1967).

Infecções têm sido observadas em uma grande variedade de animais domésticos e silvestres em muitos países. Existem algumas evidências para sugerir que certas variedades sorológicas da *P. multocida* freqüentemente ocorrem nas mesmas áreas geográficas (Carter e Bain, 1960).

1.3 – Estrutura antigênica

A *P. multocida* possui antígenos somáticos do tipo O, tóxicos para os animais, os quais do ponto de vista químico são complexos de polissacarídeos e lipoproteínas, componentes do envoltório celular. À custa de fracionamento químico estes complexos podem ser separados em componentes com atividades imunológicas e sorológicas diversas (Carter, 1967; Cruikshank, 1969; Bier, 1985).

Variantes de *Pasteurella multocida* podem ser separados em sorogrupos A, B, D, E e F baseados na antigênicidade da cápsula e sorotipos de 1 a 16 baseado nos antígenos lipopolissacarídeos (LPS). O sorogrupo capsular está geralmente relacionado com a predileção da doença, com os variantes da septicemia hemorrágica pertencendo ao sorogrupo B e E, variantes da cólera aviária ao sorogrupo A e variantes da renite geralmente ao sorogrupo D (Boyce et al., 2000). Pasteurelose em gado e buffalo d' água é causado por dois sorotipos específicos de *P. multocida*. O sorotipo asiático é designado B:2, e o africano é designado de E:2 pelo sistema Carter-Heddlestone (Verma e Jaiswal, 1998).

As maiores cápsulas têm sido observadas nos sorotipos A. Estas cápsulas são compostas, em grande extensão, de ácido hialurônico, o qual dá às colônias uma umidade ou aparência aderente (Carter, 1967). Hialuronidase de testículo de búfalo e *Staphylococcus* marcados inibiram a produção de ácido hialurônico no

crescimento das culturas. O efeito pode ser melhor mostrado se *Staphylococcus pyogenes* são raiados sob as linhas de incubação de um mutante mucóide no gel de ágar sangue ou soro. As colônias desenvolvidas próximas ao *Staphylococcus* são pequenas e os organismos são isentos de grandes cápsulas típicas de culturas aderentes (Carter, 1967).

Lipopolissacarídeos e proteínas são os dois maiores antígenos somáticos expostos na superfície da célula de *P. multocida* e é possível que o uso delas como vacinas possa controlar a pasteurelose, porque elas estão envolvidas no processo de reconhecimento imunológico (Lu et al., 1988).

As proteínas constituintes das frações de membrana da *P. multocida* sorotipo A foram identificadas e avaliadas quanto a sua atividade antigênica através de análises de SDS-PAGE e *Western Blotting*, respectivamente. A eletroforese destas frações de membranas revelou uma série de bandas protéicas, dentre elas as mais intensas foram as de massas moleculares de 97,5; 87; 74; 66; 60; 34 e 26 kDa. Além disso, o ensaio de *Western Blotting* revelou que todas as proteínas constituintes das frações de membrana apresentavam atividade antigênica (Daghastanli, 2000). Resultados semelhantes com o intuito de identificar as proteínas de membrana externa (OMP) foram encontrados por Adler et al. (1999) e Marandi e Mittal (1995), os quais trabalharam com diferentes variantes de *P. multocida*.

1.4 – Tratamento

Tradicionalmente, infecções por *Pasteurella multocida* têm sido consideradas essencialmente incuráveis após atingirem o estado crônico. Já, em um estágio inicial, as infecções respiratórias e oculares devem ser tratadas exaustivamente com aplicação sistêmica e tópica de antibióticos, pois a *P. multocida* é sensível às penicilinas, tetraciclinas, cloranfenicol, estreptomicina e outros aminoglicosídeos. A estreptomicina, isolada ou em associação a uma das tetraciclinas, leva a maioria dos doentes à cura, se o tratamento da doença for precocemente iniciado (Cruikshank, 1969).

Se estas infecções atingirem um maior grau, devido ao não tratamento ou às baixas quantidades de antibióticos empregados, as encefalites podem ser uma consequência comum e perigosa, levando à morte.

Estas terapias com drogas antibióticas são realizadas na tentativa de

interromper a evolução da doença, mas freqüentemente falham, pois muitos antibióticos têm grande dificuldade de fazer o seu percurso para um sítio infeccioso relativamente inacessível.

A resistência do coelho à infecção por *P. multocida* depende, em parte, da integridade das mucosas expostas e provavelmente da rápida produção de anticorpos da mucosa (IgA), os quais inibem a proliferação da bactéria. Altos níveis de anticorpos humorais (IgG) não são relacionados com a eliminação da infecção, mas estão preferencialmente relacionados com a infecção crônica. Portanto, medidas de anticorpos IgG no soro são úteis para detecção de infecções clinicamente não detectáveis no coelho vivo.

Na intenção de induzir imunidade e proteção, usam-se extratos de um *pool* das proteínas constituintes da bactéria, ou de toxinas secretadas por ela, na presença de tiocianato de potássio (Ringler et al., 1985; Lu et al., 1988; Jarvisen et al., 1998) ou ainda bactérias vivas atenuadas, os quais são falhos para prevenir definitivamente a pasteurelose.

Atualmente, vários grupos de pesquisa em diversos continentes vêm estudando este patógeno e tentando isolar os imunógenos que o constitui para entender melhor a transmissão da doença, bem como o seu curso e conseqüências no hospedeiro.

A administração oral de antígenos microencapsulados em microesferas de alginato também é uma forma potencial de vacinação de coelhos contra a *P. multocida*, onde se pode observar uma diminuição de infecções pulmonares, faringites e das narinas, porém não houve uma completa imunidade após a administração dos microencapsulados (Suckow et al., 1996).

As toxinas de *P. multocida* são um importante fator de virulência. Em 1995 Suckow e colaboradores, imunizaram grupos de coelhos com toxinas inativas via intranasal para verificar se a proteção imunitária poderia ser induzida contra estas toxinas. Por ensaio de ELISA, observaram que há um significativo aumento na concentração de IgA e IgG, porém concluíram que ocorre apenas uma proteção parcial contra o desenvolvimento de pneumonia, pleurite, necrose hepática e atrofia testicular em coelhos após 16 dias de imunização (Suckow et al., 1995).

Como este patógeno bacteriano pode ser transmitido muito facilmente de coelhas fêmeas para suas crias, mesmo durante a gestação, foi administrado experimentalmente um antibiótico a base de fluoroquinolona, conhecido

comercialmente como Enrofloxacin, e foi observado que as crias eram livres do patógeno. Este resultado sugere que o tratamento com este antibiótico durante o período de gestação pode interromper a transmissão da doença, porém este tratamento não é preventivo para futuros contatos com o patógeno (Suckow et al., 1996).

O problema têm sido estudado utilizando-se o recurso da engenharia genética. Foi identificada uma proteína da membrana da *P. multocida* de 87 kDa denominada *Outer membrane 87* (Oma87), a qual está presente em todos os variantes da bactéria. O gene que codifica esta proteína foi clonado, seqüenciado e foi encontrada uma similaridade significativa com uma proteína da superfície antigênica do *Haemophilus influenzae* (Ruffolo e Adler, 1996). O tratamento com proteinase K sugeriu que a proteína está exposta na superfície da membrana externa. As formas nativa e recombinante de Oma87 foram fortemente imunocoradas pelo antisoro, indicando que a proteína é expressa *in vivo*. Antisoro específico contra a Oma87 protegeu camundongos contra a morte por pasteurelose. Estes resultados, portanto sugerem que a Oma87 é um dos antígenos importantes da membrana externa da *P. multocida* (Ruffolo e Adler, 1996).

As proteínas da membrana externa da *P. multocida* sorotipo B:2 foram extraídas para serem estudadas quanto à habilidade de imunizar animais contra a infecção e também quanto a resistência em ser fagocitada pelo macrófago peritoneal. Inoculação destas proteínas resultou em um produto de aglutinação de anticorpos o qual possivelmente protegeu passivamente ratos contra *P. multocida* e causou também lise de células virulentas *in vitro*. Ratos vacinados com estas proteínas mostraram uma sobrevivência de 67 %. O estudo sugere que todas as proteínas da membrana externa da bactéria conferem proteção em animais contra a infecção por *P. multocida* (Srivastava, 1998). Estas proteínas foram extraídas e caracterizadas usando-se SDS-PAGE e foram identificadas as dez bandas peptídicas mais evidentes que apresentavam massa molecular entre 88 e 25 kDa. O *imunoblotting* sugeriu que os peptídeos de massa molecular de 44, 37 e 30 kDa possuíam uma maior atividade imunogênica (Pati et al., 1996).

Além disso, o isolamento de lipopolissacarídeos (LPS) da cápsula da *P. multocida* sorotipos B:2 e B:5 com posterior purificação e imunização de camundongos sugeriu que estes componentes da cápsula induzem à uma parcial

proteção contra a pasteurelose (Adler et al., 1996).

1.5 – Solubilização e uso de detergentes

As lipoproteínas, componentes da membrana externa da bactéria, parecem ter uma importante relação com a antigenicidade da *P. multocida*, fazendo destas um alvo interessante e promissor na busca de tratamentos mais eficientes contra a pasteurelose. Para isto as proteínas componentes da cápsula, parede, e também da membrana celular da bactéria, precisam ser primeiramente solubilizadas.

Alguns autores têm empregado o uso de detergentes para solubilizar as proteínas das frações de membrana e conseqüentemente estudar a sua antigenicidade.

Nos últimos vinte anos, o emprego de detergentes tem alcançado grande sucesso na solubilização de proteínas de membranas, podendo-se encontrar excelentes revisões sobre detergentes comumente usados na solubilização de proteínas de membrana, incluindo suas propriedades físicas (Helenius e Simons, 1975; De Bortoli et al., 1984; Hjelmeland e Chambach, 1984; Koepsell, 1986; Silvius, 1992).

Uma solubilização efetiva de proteínas de membrana envolve tanto a seleção do detergente adequado quanto a determinação de condições apropriadas para a solubilização. A compatibilidade do detergente com métodos preparativos específicos ou analíticos também deve ser considerada, bem como a possível remoção do detergente na aplicação final das proteínas de interesse (Hjelmeland, 1980; Santos e Ciancaglini, 2000).

A maioria dos detergentes, tanto iônicos (catiônicos, aniônicos ou zwiterionicos) quanto não-iônicos (neutros), são substâncias anfifílicas solúveis. Quando o detergente é adicionado à água, ele forma uma monocamada na interface ar-água que está em equilíbrio com seus monômeros. Quando a concentração dos monômeros de detergente alcança um nível crítico, e a temperatura é favorável, eles se associam formando micelas, onde a parte hidrofóbica das moléculas está voltada para o interior da micela, e a parte hidrofílica está direcionada para fora, na fase aquosa (Koepsell, 1986). A concentração de detergente acima da qual são formadas as micelas é denominada Concentração Micelar Crítica (CMC). A CMC é característica para

cada detergente e é dependente da temperatura, força iônica, presença de álcoois e pH (New, 1990). A formação das micelas requer também uma temperatura crítica, ou seja, Temperatura Micelar Crítica (CMT) que é dependente da natureza do detergente (Carey e Small, 1972).

Durante a solubilização, o detergente se liga à membrana lipoprotéica formando uma interface entre a bicamada lipídica e a fase aquosa (Jackson et al., 1982). A seguir, ocorre a incorporação do detergente à bicamada lipídica devido à fluidez da membrana que por sua vez é perturbada e, deste modo as interações proteína-lipídeo são rompidas (Helenius et al., 1979; Andersen et al., 1983a, 1983b).

A ligação do detergente à proteína pode ocorrer pela carga da proteína, se ele for um detergente iônico ou através da região hidrofóbica da proteína, se ele for um detergente não iônico (Helenius e Soderlund, 1973; Helenius e Simons, 1975; Riepl e Vidaver, 1978).

1.6 – Reconstituição de componentes de biomembranas

1.6.1 – Lipossomos como estruturas que mimetizam membranas

Os lipossomos foram primeiramente descritos por Bangham na década de 60, o qual estudava a natureza das membranas celulares (Bangham et al., 1965; Kinsky e Nicolotti, 1977; Bangham, 1993). Foi observado que os lipossomos são em geral formados pela agitação de fosfolípidos dispersos em água.

Lipossomos podem ser simplesmente descritos como vesículas esféricas consistindo de uma ou mais bicamadas lipídicas. Moléculas como, marcadores fluorescentes, enzimas ou drogas, presentes no meio de preparação, podem ser encapsulados no lipossomo (Gregoriadis e Florence, 1993). Estes agregados podem ser química e fisicamente estáveis por horas e até anos. A habilidade das vesículas em imitar a organização e algumas funções de membranas celulares, faz destas estruturas um modelo conveniente para estudar as propriedades de sistemas biológicos de membranas organizadas (New, 1990).

O interesse em lipossomos está crescendo em diferentes campos de pesquisa. Estas estruturas são consideradas como: (i) um sistema que permite estudar forças entre sistemas anfifílicos; (ii) um modelo de membrana no qual podem ser inseridas proteínas de membrana para serem estudadas, e (iii) potenciais carreadores de drogas e imunógenos.

Nas últimas décadas os estudos em lipossomo tiveram um grande desenvolvimento como potenciais carreadores farmacêuticos, mas preparações comerciais ainda não foram avaliadas para as doenças mais graves (Nagayasu et al., 1999; Storm e Crommelin, 1998). Alguns anestésicos encapsulados por lipossomos podem ter seu efeito prolongado (Yu et al., 1998). Além disso, os lipossomos têm a propriedade de interagir diretamente no sítio de interesse, aumentando a concentração da droga *in situ* e reduzindo sua toxicidade (Luo et al., 1998; Pinto-Alphandary et al., 2000).

Alguns autores têm utilizado os lipossomos como agentes carregadores de sondas de rastreamento utilizadas na realização de diagnóstico por imagem facilitando assim a localização das células tumorais que apresentam uma maior tendência de absorção destes sistemas que as células normais (Duzgunes e Nir, 1999; Kostarelos e Emfietzoglou, 1999; Patel e Sprott, 1999; Matteucci e Thrall, 2000).

Os lipossomos também têm sido utilizados em terapia de captura de nêutrons na tentativa de destruição de células tumorais, onde complexos de Boro são tanto inseridos na membrana de lipossomos quanto encapsulados por eles, o qual será absorvido pelas células tumorais e através da incidência de um feixe de nêutrons na região do tumor pode destruir a célula doente (Kostarelos e Emfietzoglou, 1999).

O lipossomo pode ser utilizado também como um carreador de proteínas ancoradas à membrana via GPI (glicosil fosfatidilinositol). Um sistema desse tipo foi recentemente padronizado utilizando-se a fosfatase alcalina obtida de placas ósseas e lipossomos constituídos de DPPC, DMPC, DLPC (Camolezi et al., 2002).

Finalmente, nos últimos 10 anos o uso de lipossomos tem obtido um grande avanço no desenvolvimento e na aplicação da terapia gênica como um potencial vetor não viral (Hart, 2000; Li e Huang, 2000).

Projetar sistemas de lipossomos bem definidos é uma tarefa delicada que requer procedimentos de preparação precisos e controles adequados (New, 1990).

1.6.2 – Incorporação de proteína à membrana (proteolipossomos)

Dentre os métodos disponíveis para a reconstituição de proteínas à

sistemas miméticos de membrana dois se destacam. Um é a incorporação espontânea da proteína de membrana previamente solubilizada, e livre de detergente, em bicamadas lipídicas pré-formadas. Este tipo de incorporação é acentuado quando são utilizadas pequenas vesículas unilamelares, vesículas com contaminantes anfipáticos ou com proteínas previamente incorporadas (Roepe e Kaback, 1990, Camolezi et al. 2002). Neste caso, monômeros e pequenos agregados de proteínas de membrana parecem associar-se tipicamente com vesículas de lipídeos mais eficientemente que com grandes agregados (Roepe e Kaback, 1990). A outra técnica denominada co-solubilização consiste na formação de sistemas vesiculares a partir de uma mistura lipídio:proteína:detergente (New, 1990, Rigaud et al., 1995). Estas técnicas, inevitavelmente levam à questão da orientação e disposição das proteínas reconstituídas. Isto é, se as proteínas se encontram numa disposição semelhante à nativa na membrana vesicular.

Numerosos testes experimentais podem ser requeridos para verificar qual fração da molécula protéica numa preparação reconstituída é muito semelhante à forma nativa em termos de, por exemplo, a estrutura secundária e terciária para a manutenção da função bioquímica, a topologia transmembrana de todos segmentos protéicos. Embora uma reconstituição “*perfeita*” possa ser requerida em muitas aplicações, nunca deve ser esquecido que a maioria das preparações reconstituídas contém muitas frações significantes de moléculas de proteína não ativas, cujos efeitos potenciais no procedimento da preparação devem ser cuidadosamente considerados (Silvius, 1992).

Embora a reconstituição de proteínas de membranas seja uma importante ferramenta na biofísica de membranas, a natureza do processo de reconstituição permanece em muitos caminhos surpreendentemente mal definidos. Assim, esforços para a elucidação do processo de reconstituição são de grande importância.

O sucesso do processo de incorporação requer cuidadosa definição de certas variáveis, tais como:

- (i) as concentrações relativas de proteína, detergente e lipídeo na preparação da proteína solubilizada e na mistura proteína-lipídeo;
- (ii) o(s) estado(s) oligomérico(s) da proteína solubilizada;
- (iii) condições como tempo, temperatura, etc., da incubação vesícula-

proteína e subseqüentes perturbações mecânicas.

De fato, tem-se obtido progresso substancial neste processo e uma estratégia bem sucedida de reconstituição de membranas compreende três aspectos principais:

- (i) solubilização parcial ou completa das proteínas e lipídeos componentes da membrana;
- (ii) preservação da atividade recuperável das proteínas de membrana, no estado solúvel;
- (iii) adequação das condições de incubação das proteínas solubilizadas e lipídeos para formar o sistema reconstituído (Eytan, 1982; Klausner et al., 1984; Silviu, 1992).

Muitos métodos têm sido empregados para a remoção completa ou parcial do detergente a partir de misturas detergente-lipídeo-proteína (Furth, 1980; Furth et al., 1984). Dentre estes métodos tem-se: uma simples diluição (Racker et al., 1979), diálise (Mimms et al., 1981; Anholt et al., 1981; Jackson e Litman, 1982), filtração em gel (Mimms et al., 1981; McCormick et al., 1984), ultracentrifugação (Jones et al., 1988), precipitação seletiva e ultrafiltração (Furth et al., 1984) que removem anfifílicos na forma de monômeros (ou pequenos agregados), no entanto estes métodos são usados somente para detergentes com alto valor de CMC. Em casos de detergentes com baixas CMC na maioria das vezes é usada a adsorção seletiva do detergente em resinas hidrofóbicas (Hacker e Racker, 1979; Levy et al., 1990a; Silviu, 1992). Atualmente, algumas resinas como BioBeads® e Calbiosorb® têm sido empregadas. Este método remove seletivamente o detergente na sua forma monomérica a qual é rápida e eficientemente adsorvido pela resina hidrofóbica quando esta entra em contato com a amostra detergente-lipídeo-proteína. Na prática, entretanto, uma significativa quantidade de lipídeo e/ou proteína pode estar sendo adsorvida pela resina durante a reconstituição. Este problema algumas vezes pode ser reduzido por ajustes no raio das resinas, pelos detergentes ou lipídeos utilizados, pela pré-incubação da resina com os fosfolipídeos ou pela exposição da amostra à resina por curtos períodos de incubação (Rigaud et al., 1988; Levy et al., 1990b; Silviu, 1992; Rigaud et al., 1995).

1.7 – O uso de proteolipossomos na imunologia

A quimioterapia é uma forma de tratamento contra doenças infecciosas, entretanto a sua utilização pode gerar um conjunto de efeitos colaterais, uma alternativa ideal seria a vacinação. Todavia, vacinas convencionais usando todo o organismo morto ou atenuado também podem causar diversas reações. Este problema tem estimulado o desenvolvimento de vacinas compostas por subunidades peptídicas ou de peptídeos. Infelizmente, estas vacinas demonstraram-se fracamente imunogênicas na ausência de um adjuvante. Alumínio (hidróxido de alumínio ou fosfato de alumínio) é o único adjuvante licenciado para o uso em humanos; todavia, não é o ideal porque ele proporciona reações de fracas a moderadas no local de aplicação da injeção. Este fato nos leva a pesquisar candidatos alternativos para adjuvantes.

Lipossomos têm sido bastante utilizados como modelo para membranas lipídicas. Eles têm sido úteis no estudo de receptores de membrana, proteínas transportadoras, e enzimas ligadas à membrana. Estudos recentes têm examinado o uso de lipossomos como um potencial imunoadjuvante (Gregoriadis, 1990; Alving, 1991; Parmar et al., 1999). Os lipossomos exibem várias vantagens: eles são biodegradáveis e não tóxicos além de serem preparados facilmente variando-se sua composição para se obter formulações antigênicas mais eficientes. Além disso, lipossomos têm a habilidade de estimular ambas, a resposta imune celular (inata) e a resposta imune humoral. Estudos têm mostrado que os lipossomos são imunopotencializadores efetivos em vacinas de hepatite A e influenza (gripe). Além disso, lipossomos têm atividade adjuvante em vacinas contra protozoários e bactérias (Parmar et al., 1999).

Estudos realizados com lipossomos formados por lipídeos extraídos da archaeobactéria (archaeossomos) demonstraram que estes sistemas são capazes de serem captados por células fagocitárias, cinquenta vezes mais rapidamente que os lipossomos convencionais. Testes em cobaias indicaram que a administração sistêmica de vários antígenos associados à archaeossomos resultaram em uma resposta imune humoral que é comparável à obtida com o potente, mas tóxico, adjuvante de Freund (Patel e Sprott, 1999).

A vacinação continua sendo o procedimento de melhor êxito para prevenir perda de animais devido a doenças infecciosas. Ela serve para induzir uma resposta imune que seja capaz de limitar a infecção após exposição a um

patógeno natural, deste modo prevenindo muitas das conseqüências negativas da infecção. Um critério importante para o sucesso da vacinação é que a vacina não cause doenças ou efeitos colaterais negativos no hospedeiro, embora produza uma resposta imune capaz de proteger contra o patógeno natural. Em alguns casos isto é melhor alcançado pelo uso de organismos atenuados ou formas vivas modificadas do organismo patogênico. Idealmente, a inoculação de um organismo vivo modificado resulta em uma infecção assintomática com restabelecimento completo e indução de uma resposta imune de proteção. Contudo, em muitos casos, formas atenuadas de patógeno não têm sido obtidas, são instáveis e ocasionalmente reverterem para a forma virulenta e ainda causam alguns efeitos colaterais de infecção inaceitáveis (Zeman et al., 1993; Furuoka et al., 1995; Alexanderson, 1996; Hopkins e Olson, 1997), ou são por outro lado, contra-indicadas devido aos perigos associados a manipulação do patógeno (Mengeling, et al., 1997).

Conseqüentemente, para doenças onde uma vacina atenuada não é uma opção viável, o emprego de organismos mortos ou ainda partes destes organismos, é uma alternativa para estas vacinas (Singh e O'Hagan, 2003). Estas últimas vacinas podem incluir em suas formulações: (i) subunidades protéicas, (ii) peptídeos sintéticos, (iii) conjugados proteína-polissacarídeos e (iv) DNA plasmidial (Calarota et al., 1998; Wang et al., 1998).

Por mais que estas novas técnicas possam oferecer importantes vantagens no que diz respeito à segurança, a maior vantagem está baseada no fato de que tais vacinas não se replicam no hospedeiro, porém, não são tão imunogênicas quanto o uso de formas atenuadas do patógeno. Conseqüentemente, os adjuvantes imunológicos são adicionados nestas formulações com o intuito de auxiliar na resposta imunológica, aumentando a imunogenicidade destes antígenos.

Adjuvantes imunológicos foram originalmente descritos por Ramon, em 1924, como substâncias usadas em combinação com um antígeno específico que tem capacidade de produzir uma resposta imune mais robusta do que o antígeno sozinho (O'Hagan et al., 2001).

Esta definição abrange uma grande variedade de sistemas (Vogel e Powell, 1995) que podem ser divididos em 2 classes, em função de seus mecanismos de ação; sistemas de *delivery* ou liberação dos antígenos e

adjuvantes imunoestimulatórios.

Os sistemas de *delivery* dos antígenos são geralmente particulados, como exemplos nas emulsões, micropartículas e lipossomos, que funcionam principalmente como agentes que direcionam os antígenos as células apresentadoras de antígenos (APC). Em contraste, adjuvantes imunoestimulatórios são predominantemente derivados de patógenos e freqüentemente apresentam padrões moleculares associados, como por exemplo, lipopolissacarídeos e DNA, os quais ativam o sistema imune inato. Uma vez ativado o sistema imune inato, é ativado o sistema imune adquirido (O'Hagan et al., 2001).

Os aspectos práticos importantes para o desenvolvimento de adjuvantes incluem estabilidade, facilidade de manufatura, custo e aplicabilidade para uma vasta gama de vacinas.

Os adjuvantes podem melhorar a resposta imune de vacinas de formas diferentes: (i) aumentando a imunogenicidade de antígenos fracos; (ii) aumentando a velocidade e duração da resposta imune; (iii) modulando a interação com o anticorpo (especificidade, isotipo ou distribuição de subclasses); (iv) estimulando linfócitos T citotóxicos; (v) promovendo a indução de imunidade das mucosas; (vi) aumentando a resposta imune em indivíduos imunologicamente imaturos; (vii) decrescendo a dose do antígeno na vacina para reduzir o custo ou (viii) auxiliando a diminuir a competição entre os antígenos, em vacinas combinadas (Singh e O'Hagan, 2003).

O mecanismo de ação da maioria dos adjuvantes ainda permanece parcialmente entendido, uma vez que a imunização freqüentemente ativa uma cascata complexa de respostas e, o efeito primário do adjuvante é freqüentemente difícil de ser identificado. Contudo, se admitirmos o conceito local da reatividade imune, no qual os antígenos que não alcançam os nódulos linfáticos locais não induzem resposta imune (Zinckernagel et al., 1997), se torna mais fácil propor interpretações a respeito do mecanismo de alguns adjuvantes, particularmente aqueles baseados em um mecanismo de liberação. Se antígenos que não alcançam os nódulos linfáticos não induzem resposta imune, então algum adjuvante, o qual aumenta o *delivery* de antígeno nas células que traficam para os nódulos linfáticos poderiam aumentar a resposta. Existem fortes indicações de que uma subclasse de células dendríticas constitui as "células

chave” que circulam em tecidos periféricos e agem como “sentinelas”, sendo responsáveis pela captura de antígenos e sua transferência para os nódulos linfáticos, onde eles serão, então, apresentados para as células T.

1.8 – Classes de adjuvantes para uso veterinário.

Muitos compostos são descritos como tendo atividade adjuvante. Contudo, de um ponto de vista prático, tais compostos necessitam pelo menos agir como um depósito, para ser um sistema *delivery* para vacinas comerciais. Os adjuvantes mais difundidos encontrados em vacinas veterinárias licenciadas são sais de alumínio e emulsões oleosas (emulsões óleo em água ou emulsões água em óleo). Considera-se que todas estas formulações agem principalmente como depósitos para as vacinas injetadas.

1.8.1 – Adjuvantes baseados em alumínio

O uso de adjuvantes baseados em sais de alumínio para vacinas de difteria foi descrito em 1926, por Glenny e colaboradores. Subseqüentemente, adjuvantes de hidróxido de alumínio (*Alum*) têm sido comumente usados em muitas vacinas humanas e veterinárias, principalmente devido a sua segurança e o baixo custo. A atividade adjuvante de sais de alumínio tem sido extensivamente revisada (Aprile e Wardlaw, 1966; Edelman, 1980; Nicklas, 1992; Gupta et al., 1995; Hem e White, 1995) e está atribuída a característica física da formulação, isto é, área superficial, carga e morfologia. O mecanismo de ação depende da adsorção total da vacina, uma vez que somente pequenas quantidades de adjuvantes de alumínio são necessárias para adsorção completa, ainda que maiores quantidades são necessárias para otimizar a indução de uma resposta imune, *in vivo*. Isto implica que um excesso de adjuvante de alumínio livre deve ser necessário para formar um depósito *in vivo* ou é necessário para ativar ou recrutar as células apresentadoras de antígenos para o sítio de vacinação. Ambas interpretações são consistentes com o fato de que adjuvantes de alumínio causam inflamação no sítio de injeção e são capazes de induzir granulomas, o que pode estar relacionado à formação de depósitos no sítio de injeção (Gupta et al., 1995).

Embora o *Alum* tenha sido utilizado como um adjuvante por muitos anos, seu mecanismo de ação permanece pouco esclarecido. Pensou-se originalmente

que ele proporcionaria um efeito de “depósito”, resultando na permanência do antígeno no sítio de injeção. Porém, muitos estudos recentes envolvendo antígenos radio-marcados têm mostrado que *Alum* não promove um depósito de antígenos no sítio de injeção (Gupta et al., 1996; O’Hagan et al., 2001).

Apesar do alumínio apresentar um bom grau de segurança, os estudos comparativos mostram que é um fraco adjuvante na indução de anticorpo para subunidades protéicas e um fraco adjuvante para imunidade mediada por célula (Gupta, 1998). Além disso, adjuvantes de alumínio podem induzir IgE, o que tem sido associado a reações alérgicas em alguns indivíduos (Gupta, 1998; Relyveld et al., 1998).

1.8.2 – Emulsões oleosas

Embora fisicamente muito diferentes ambas emulsões, óleo em água (o/w) e água em óleo (w/o) podem ser consideradas de ação similares. Ambas emulsões são dependentes acima de tudo da cuidadosa escolha das condições de emulsificação, tipo e quantidade de surfactantes e a produção de uma gota de tamanho apropriado. A vacina de antígenos é geralmente incluída durante o estágio de emulsificação e se incorpora no interior da gota, levando então a ação tipo depósito, destas formulações. Alguns dados disponíveis sugerem que adjuvantes baseados em emulsões oleosas agem como depósito tanto no sítio de injeção quanto na apresentação de antígenos para as células (Ott et al., 1995). Os tipos de respostas imunes induzidas por emulsões oleosas são mais variados do que aquelas caracterizadas para vacinas baseadas em alumínio. Isto provavelmente reflete as diferenças na formulação, condições de um laboratório para o outro (escolha e quantidade de surfactantes, etc.) e também o fato de alguns óleos poderem ter efeitos imunoestimulatórios. Emulsões baseadas em óleo têm provado também ser um efetivo veículo para uma vasta gama de vacinas veterinárias. A diversidade de composições disponíveis para emulsões oleosas tem permitido o desenvolvimento de formulações que resolveu alguns dos problemas comuns associados com vacinas veterinárias. Por exemplo, uma vantagem de emulsões w/o é sua menor reatividade com o tecido e o contato com os macrófagos acontece mais lentamente reduzindo assim a irritação e formação de granulomas (Cajavec et al., 1997).

1.8.3 – Micropartículas

Embora não exista nenhuma vacina comercial disponível baseada em micropartículas, existem muitos artigos na literatura documentando o grande potencial destes veículos para o controle profilático de patógenos veterinários. O termo micropartículas é utilizado aqui para incluir uma série de veículos que poderiam ser considerados como pequenas partículas (1-200 μm de diâmetro) consistindo da vacina antigênica e uma formulação carregadora desta. A principal característica que distingue as micropartículas de outros veículos carregadores é o tamanho que tendem a 1 μm ou maiores (O'Hagan et al., 2001).

As várias formas de uso de micropartículas como veículo de liberação de vacinas estão relacionadas à maneira de entrapar um antígeno viável em uma pequena partícula de uma maneira estável e que possa ser seguramente liberado para sítios apropriados no hospedeiro. A adequação do veículo à vacina pode ser obtida pela seleção de diferentes materiais e técnicas.

O Efeito adjuvante de micropartículas parece ser uma consequência da sua captura por células dendríticas, macrófagos e nódulos linfáticos locais após a injeção intramuscular (O'Hagan et al., 2001).

A imunidade prolongada pode ser induzida por administração parenteral de micropartículas feitas com diferentes razões de polímeros de diferentes pesos moleculares que são hidrolizadas (e então liberam antígenos) dentro de um período de tempo prolongado. Esta imunidade também pode ser induzida usando-se uma população de partículas heterogênia em tamanho, especialmente partículas maiores, que evitam a captura por macrófagos, levando a uma velocidade de liberação mais lenta. Desta forma uma injeção da vacina pode resultar em uma imunidade prolongada, afastando a necessidade de aplicar reforços nos animais.

1.8.4 – Lipossomos

Os lipossomos são partículas formadas por uma ou mais bicamadas de fosfolipídios com ou sem esteróis que circundam uma solução aquosa interna, apresentando dimensões da ordem de nanômetros. Materiais solúveis em água podem ser encapsulados no centro aquoso e os agentes hidrofóbicos na bicamada lipídica. Deste modo, qualquer tipo de antígeno, ou ainda ácidos nucléicos que expressem o antígeno, podem ser encapsulados em lipossomos.

Lipossomos agem como um depósito de antígeno, rendendo partículas antigênicas solúveis, e os liberam para as células apresentadoras de antígenos de uma maneira similar as micropartículas, descritas anteriormente (Clarke e Stones, 1992).

Lipossomos podem adsorver prontamente na maioria das células de mamíferos, liberando os antígenos, ou então podem ser fagocitados pelas células apresentadoras de antígenos e liberar seu antígeno encapsulado, assim desempenhando o papel de um adjuvante (Alving, 1991).

Eles também podem interagir com macrófagos e então induzir linfócitos T citotóxicos específicos ao antígeno, tão bem como respostas dependentes da apresentação exógena destes, expandindo assim o repertório de respostas imunes induzidas, no que diz respeito à imunidade celular (Browsersock e Martin, 1999).

Artigos na literatura descrevem o uso de lipossomos para encapsular antígenos de interesse para doenças veterinárias (Browsersock e Martin, 1999) e doenças humanas (Gluck, 1995). A captura preferencial de lipossomos pelas células apresentadoras de antígeno pode ser responsável pelo aumento da resposta imune e pela maior resposta de proteção, encontrada com vacinas nas quais os antígenos foram incorporados em lipossomos.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivos gerais

Uma vez que não existem vacinas disponíveis contra a pasteurelose e o tratamento com antibióticos não estabelece proteção contra a doença, o objetivo deste trabalho foi desenvolver sistemas carreadores das proteínas antigênicas da membrana da *P. multocida*, empregando-se sistemas de lipossomos e microesferas lipídicas. Além disso, pretendemos verificar se as formulações de proteolipossomo apresentam capacidade de proteger coelhos contra a pasteurelose frente ao desafio experimental com a bactéria.

2.2 – Objetivo específico

- Obtenção de um sistema de lipossomo ou microesferas lipídicas, reconstituindo as proteínas antigênicas da *P. multocida*.
- Caracterização bioquímica e físico-química dos sistemas de lipossomos e de microesferas lipídicas.
- Padronização da metodologia de ensaio imunoenzimático (ELISA).
- Avaliação da capacidade de proteção de coelhos contra a pasteurelose, após a imunização prévia com proteolipossomos.
- Verificação dos isotipos (IgG, IgM e IgA) de anticorpos específicos anti *P. multocida* gerados em coelhos pela vacinação com proteolipossomos, antes e após o desafio com a bactéria.
- Avaliação da capacidade da vacina de proteolipossomo em gerar memória imunológica.

3 – Materiais e Métodos

3.1 – Animais

Os animais usados para a obtenção dos focos infecciosos para posterior isolamento da bactéria *P. multocida*, bem como para a realização de ensaios de imunização e acompanhamento da resposta imune tinham entre 1 a 3 meses de vida, uma massa de aproximadamente 1.200 g e pertenciam à uma colônia de Coelhos Nova Zelândia (*Orytolagus cuniculus*), albinos, mantidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto.

3.2 – Obtenção da *P. multocida*

Foram coletadas amostras de vários tecidos e fluidos de pulmões de coelhos com lesões de pneumonia, de coelhos com conjuntivite, timpanite, ou abscessos subcutâneos causados por infecção bacteriana. Estes tecidos foram incubados separadamente em 500 mL do meio de crescimento constituído por infusão de tecidos de cérebro e coração (BHI - Brain Heart Infusion) para crescimento durante um período de 24 horas a temperatura de 37°C sem agitação ou aeração. Após esse período o meio, cerca de 0,1 mL, foi plaqueado em meio sólido Müller Hinton enriquecido com 5% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado para o isolamento e identificação da colônia de *P. multocida* utilizando o equipamento Bacster Microscan (Modelo Walkaway 96), pertencente ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Depois de confirmada a presença do microrganismo, alíquotas contendo as colônias de *P. multocida* foram novamente incubadas por 24 horas a 37°C em meio BHI, para crescimento. A seguir, a bactéria foi inativada termicamente a 60°C por 15 minutos em banho termostatizado.

3.3 – Obtenção e isolamento das membranas da *P. multocida*

Após o crescimento da bactéria, aproximadamente 10^9 ufc/mL, o volume total da suspensão de células inativadas foi centrifugado a $15.500 \times g$ por 30 minutos para a retirada do meio de crescimento. O pellet resultante, constituído pelas bactérias, foi ressuspenso em Tampão Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 7,5, centrifugado novamente sob as mesmas condições para a lavagem do pellet, o qual foi ressuspenso em aproximadamente 25 mL do mesmo tampão. A amostra

obtida foi sonicada em um sonificador de ponta (VibraCell modelo VC-600) por 30 minutos a 240 W, para o rompimento das membranas celulares. Esta etapa foi monitorada por microscopia óptica. Foi realizada uma ultracentrifugação a 140.000 x g por 1 hora, a temperatura ambiente, para o isolamento das frações de membrana. Finalmente, o pellet foi ressuspenso em 25 mL do tampão Tris-HCl e armazenado em alíquotas de 1 mL, em freezer a -20°C (Daghastanli et al., 2001; Daghasanli et al., 2004).

3.4 – Dosagem de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas pelo método descrito por Hartree (1972) na presença de SDS 2% (p/v) utilizando-se como padrão a albumina de soro bovino.

Para as determinações da concentração protéica das frações coletadas após a centrifugação em gradiente de sacarose e para as amostras de proteína encapsulada em microcápsulas, foi empregado o método Read e Northcote (1981), usando-se também albumina de soro bovino como padrão.

3.5 – Eletroforese em condição desnaturante (SDS-PAGE)

A eletroforese foi efetuada sob condição desnaturante, como descrito por Laemmli (1970), utilizando-se placas de vidro (10 x 10 cm) separadas por espaçadores de 1,5 mm e gel de poliacrilamida com concentração de 10% (p/v) e um gel de empilhamento com concentração de 5% (p/v). As amostras, tratadas conforme descrito pelo método, foram levadas ao banho termostatzado a 100°C por 5 minutos.

A eletroforese foi realizada em um sistema vertical, onde a amostra protéica foi aplicada no topo do gel e o eletrodo negativo se encontrava na parte superior da placa. Foram utilizados como padrão de massa molecular: Miosina (205 kDa); β -galactosidase (116 kDa); fosforilase b (97 kDa); soro albumina bovina (66 kDa); ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (29 kDa).

3.6 – Solubilização das proteínas das frações de membrana da *P. multocida*

A solubilização das proteínas das frações de membrana da *P. multocida* foi realizada através da incubação, sob agitação, de 0,5 mg/mL destas proteínas presentes nas frações de membrana com 1 % (p/v) de SDS em tampão Tris-HCl 5

mmoles.L⁻¹, pH 7,5 por 2 horas a temperatura ambiente. As proteínas solubilizadas foram separadas por centrifugação a 100.000xg por 1 hora a 25°C. A porcentagem de proteína solubilizada foi acompanhada pela dosagem de proteínas no pellet ressuspenso e no sobrenadante, conforme descrito no item 3.4 (Daghastanli, 2000; Daghasanli et al., 2004).

3.7 – Obtenção do anticorpo para realização do *Western Blotting*

O anticorpo contra a *P. multocida* foi obtido pela inoculação intramuscular de 1 mL da bactéria inativada, preparada conforme descrito no item 3.2, contendo aproximadamente 10⁹ *ufc*, em coelhos saudáveis sem distinção de sexo e com reforço semanal durante um 1 mês. O soro total dos animais foi coletado 75 dias após a primeira imunização (Daghastanli et al., 2001).

3.8 – Purificação de imunoglobulina G (IgG)

A fração IgG dos soros totais foi precipitada pela adição de sulfato de amônio sólido pulverizado até atingir a concentração de 40% (p/v), sob agitação constante. Este precipitado foi separado por sedimentação em centrífuga a 11.000 x g durante 20 minutos a 4°C, ressuspenso em tampão fosfato 0,02 moles.L⁻¹, pH 7,4, e dialisado contra 2 L desse mesmo tampão por 24 h a 4°C, com duas trocas. O dialisado foi cromatografado em coluna de DEAE - Celulose equilibrada e eluída no mesmo tampão de diálise, na temperatura ambiente. A fração IgG foi eluída com um fluxo de 60 mL/h e acompanhada por absorbância em 280 nm. As frações correspondentes a IgG foram reunidas e concentradas em sistema Amicon equipado com uma membrana YM-3. As outras proteínas ligadas à resina foram removidas da coluna com o tampão de eluição contendo NaCl 1 mol.L⁻¹ e descartadas.

3.9 – *Western Blotting*

Para o ensaio de *Western Blotting*, as amostras protéicas foram inicialmente submetidas à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida 10%, conforme descrito em 3.5. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas por 2 horas para uma membrana de nitrocelulose através da aplicação de uma corrente de 300 mA. Em seguida, a membrana teve seus sítios de ligação bloqueados pela incubação por 2 horas em tampão de bloqueio (Tris-

HCl 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4, contendo 5 % (p/v) de caseína, BSA 1 % (p/v) e 0,1 % (v/v) de Tween 20). A membrana foi então lavada com tampão de lavagem (Tris-HCl 40 mmol.L⁻¹, pH 7,4, contendo NaCl 0,3 mol.L⁻¹) e incubada por 2 horas com o anticorpo primário, obtido conforme descrito nos itens 3.7 e 3.8, diluído 1:250 (v/v) no tampão de bloqueio. Foi então lavada com tampão de lavagem por 30 minutos e incubada por 1,5 horas com o anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (anticorpo secundário), diluído 1:2.500 (v/v) no tampão de lavagem. Após nova lavagem, a membrana foi revelada com 3,3'diaminobenzidina (DAB). Assim, as bandas proteicas antigênicas foram visualizadas e as suas massas moleculares determinadas por correlação com os padrões revelados previamente com 0,5 % de *Ponceau* dissolvido em ácido tricloroacético (TCA) 3 %.

3.10 – Preparação dos proteolipossomos

Os proteolipossomos foram preparados por co-solubilização de lipídeos, proteína e detergente utilizando-se uma relação 10:1:70 (p/p), respectivamente. Os lipossomos foram preparados dissolvendo-se 10 mg de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) em 1 mL de clorofórmio, o qual foi removido através da passagem de uma corrente de nitrogênio pela solução até sua completa evaporação e a formação de um filme de fosfolipídios nas paredes do recipiente. Este filme foi mantido a vácuo por 1 hora, para garantir retirada do clorofórmio residual. O filme de DPPC foi então ressuspenso em tampão Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 7,5, contendo 25 mg/mL de SDS e deixado em banho termostático a temperatura de 60°C durante uma hora com agitações em intervalos de aproximadamente 10 minutos em Vortex. Posteriormente, os lipídios solubilizados foram sonificados com um sonificador de ponta por 1 minuto a 240 W e deixados em repouso durante uma hora. Em seguida 1 mg de proteínas solubilizadas das frações de membrana, conforme descrito no item 3.6, foram incubadas com a solução de lipídios por 30 minutos.

Para realizar a remoção do detergente da suspensão e concomitantemente formar as vesículas com as proteínas associadas, foi utilizada a resina hidrofóbica Calbiosorb[®] na proporção de 200 mg/mL de amostra com 2 trocas, cada uma de 2 horas sob agitação constante.

A resina foi removida da suspensão por decantação, o sobrenadante coletado e centrifugado a 140.000 x g por 1 hora a 25°C. O pellet, constituído dos

proteolipossomos, foi ressuspensão em 1 mL de Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 7,5.

A preparação dos lipossomos, na ausência de proteínas, foi realizada empregando-se a mesma metodologia, porém no lugar da adição de 1 mg de proteína à suspensão lipídio:detergente foi acrescentado o Tampão Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹ pH 7,5 contendo 1 % (p/v) de SDS para manter a mesma relação lipídio:detergente.

Protelipossomos e lipossomos constituídos de outros fosfolipídios: dipalmitoil fosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS), dipalmitoil ácido fosfatídico (DPPA), dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), dilauroil fosfatidilcolina (DLPC) e diestearoil fosfatidilcolina (DSPC), também foram preparados seguindo-se a mesma metodologia descrita acima.

3.11 – Determinação da concentração de SDS

A concentração de SDS nas amostras foi determinada como descrito por Amons e Schrier (1981), onde uma alíquota de 5 a 20 µL da amostra é diluída com água para um volume final de 800 µL. Em seguida 200 µL de fuccina básica 0,4 mmol.L⁻¹ e 1,0 mL de uma solução composta por acetato de etila:clorofórmio (1:1 v/v) foram adicionados e agitados vigorosamente em Vortex. A mistura foi então centrifugada para auxiliar a separação das fases e, a fase orgânica foi coletada e analisada por espectrofotometria em 545 nm. As determinações de concentração de SDS foram estimadas a partir da regressão linear dos valores obtidos. Como padrão foi construída uma curva com concentrações entre 0,1 a 2,0 µg de SDS.

3.12 – Dosagem de fosfato inorgânico

O fosfato inorgânico liberado pela hidrólise dos fosfolipídeos foi quantificado utilizando-se o procedimento descrito por Chen et al. (1956), adaptado para 0,5 mL de amostra e isento de SDS 2 % (p/v). Alíquotas de 10 a 100 µL da amostra foram digeridas com 0,5 mL de ácido nítrico 65 % (v/v) a temperatura de 120°C até a secar, em seguida as alíquotas foram ressuspensas em 0,5 mL de água destilada e misturadas com 1,0 mL do reagente (1 parte de ácido ascórbico 10 % (p/v) para 6 partes da solução de molibdato de amônio 3,4

mmoles.L⁻¹ e ácido sulfúrico 0,45 moles.L⁻¹), mantidas durante 20 minutos em banho termostatzado a 45°C e submetidas à análise espectrofotométrica utilizando-se um comprimento de onda de 820 nm.

Para obtenção da curva padrão, foram utilizadas concentrações de 5 a 80 nmoles de fosfato, preparados a partir de uma solução estoque de dihidrogênio fosfato de sódio 1,0 mmoles.L⁻¹.

As determinações de concentração de fosfato inorgânico foram estimadas a partir da regressão linear dos valores obtidos.

3.13 – Microscopia eletrônica de transmissão do sistema reconstituído

Os lipossomos associados às proteínas antigênicas foram submetidos ao estudo de microscopia eletrônica de transmissão utilizando a seguinte metodologia: após a obtenção do pellet constituído por proteolipossomos, preparados como descrito no item 3.10, o material foi incubado com 0,5 mL de uma solução de glutaraldeído 3 % (v/v) por 1 hora, esta solução foi trocada pelo mesmo volume do tampão Tris-HCl 5 mmoles.L⁻¹, pH 7,5. Em seguida, o material foi ressuspense em uma solução de Ósmio 1 % (p/v) preparada no mesmo tampão da incubação. Após 1 hora de repouso, o pellet foi lavado em tampão fosfato 0,1 moles.L⁻¹, pH 7,3, centrifugado e desidratado com concentrações crescentes de acetona/água variando de 30 a 95 % (v/v) com intervalos de 5 minutos para cada troca. A última desidratação foi realizada com acetona 100 % durante 10 minutos, por 3 vezes. Finalmente, o pellet foi infiltrado em resinas de araldite a 37°C durante 48 horas e incluso em araldite pura durante 72 horas a 60°C. Cortes de cerca de 0,5 µm foram realizados com o ultramicrotomo e contrastados em acetato de uranila 4 % (p/v), pH 12, por 10 minutos seguido de citrato de chumbo 0,3 % (p/v) pH 12, por mais 10 minutos. As imagens foram realizadas em equipamento Philips Modelo 208, pertencente ao Departamento de Morfologia da FMRP-USP.

3.14 – Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose

Uma alíquota de 0,5 mL de proteolipossomos, lipossomos ou extrato bruto solubilizado, foi aplicada sobre um gradiente contínuo de sacarose de 1 a 30 % (p/v) em tampão Tris-HCl 5 mmoles.L⁻¹ pH 7,5 com uma densidade variando de 1,0381 a 1,1764 g/cm³. Após 4 horas de ultracentrifugação a 180.000 x g usando

um rotor vertical (Mod. P65VT3) em uma ultracentrífuga Hitachi (Mod. 55PT-72) a 25°C, alíquotas foram coletadas furando-se o fundo do tubo com uma agulha, a qual foi acoplada a um coletor, calibrado para coletar frações de 0,5 mL por tubo. De cada fração foram retiradas alíquotas para serem analisadas quanto a concentração de proteína usando o método de Read e Northcote (1981), e concentração de fosfato inorgânico oriundo da hidrólise dos fosfolípidios, conforme descrito nos itens 3.4 e 3.12, respectivamente além da determinação da concentração de sacarose, por refratometria.

3.15 – Medidas de distribuição de tamanho de partícula por espalhamento de luz dinâmico

As medidas de distribuição de tamanho dos lipossomos e proteolipossomos foram realizadas empregando-se o equipamento da Malvern Instruments Ltda (modelo Zetasizer 3000HS_A) no Laboratório da Profa. Dra. Maria Elizabete Zaniquelli, no Departamento de Química da FFCLRP-USP.

Todas as amostras submetidas ao teste de espalhamento de luz foram previamente filtradas em filtros de 0,80 µm para a remoção completa de quaisquer partículas de resina remanescente.

Nos experimentos de espalhamento de luz dinâmico, o diâmetro médio das partículas é determinado a partir do coeficiente de difusão, D , das vesículas quando estas se movem ao acaso devido ao movimento Browniano. O coeficiente de difusão das vesículas é calculado a partir da flutuação da intensidade da luz espalhada, expressa através do decaimento da função de correlação:

$$g(\tau) = 1 + \exp(-2Dq^2 \tau)$$

onde τ é o tempo e q é o vetor espalhamento de luz.

A intensidade de luz espalhada é modulada através do movimento Browniano das vesículas que se difundem, resultando na ampliação da largura da linha do laser (efeito Doppler). Pelo exame da amplitude espectral da luz espalhada, o tamanho da vesícula pode ser calculado (Bohren e Huffman, 1983).

3.16 – Determinação da quantidade de *ufc* da *P. multocida* para a infecção experimental (LD₅₀)

Para a determinação da dose de bactéria necessária para que metade da população inoculada sobreviva (LD₅₀), partimos de uma suspensão de células bacterianas que continha $1,9 \times 10^8$ *ufc*.

A partir desta suspensão estoque foram feitas 4 diluições em meio de cultivo BHI: (1) 1:10 (v/v) com $1,9 \times 10^7$ *ufc*; (2) 1:100 (v/v) com $1,9 \times 10^6$ *ufc*; (3) 1:1.000 (v/v) com $1,1 \times 10^5$ *ufc*, e; (4) 1:10.000 (v/v) contendo $1,9 \times 10^3$ *ufc*.

Cada uma destas diluições, inclusive a suspensão estoque, foi inoculada pela via intraperitoneal em grupos de 4 coelhos com as características descritas no item 3.1. A sobrevivência destes animais foi avaliada diariamente.

3.17 – Avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para *P. multocida*

Para avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para *P. multocida* padronizamos o método imunoenzimático indireto – ELISA (com a colaboração do Prof. Dr. Auro Nomizo, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP). Para tanto, placas de polipropileno com 96 poços e fundo chato, foram sensibilizadas com 10 µg do extrato bruto solubilizado em 50 µL de tampão carbonato 0,05 moles.L⁻¹ pH 9,6 por 12 horas a 4°C. O conteúdo dos poços foi descartado por inversão. Os poços da placa de ELISA foram em seguida bloqueados durante 1 hora com 200 µL de tampão PBS 0,01 moles.L⁻¹ pH 7,2 contendo Tween 20 0,05 % (p/v) e 5 % (p/v) de caseína (PBS-T-C) para evitar ligações inespecíficas de anticorpos na placa. Após o período de bloqueio os conteúdos das placas foram descartados por inversão e, 50 µL dos diferentes soros experimentais serialmente diluídos em PBS-T-C foram adicionados aos poços e as placas incubadas por 2 horas a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (tampão PBS 0,01 moles.L⁻¹ pH 7,2 contendo Tween 20 0,05 % p/v) em lavador automático, e 50 µL de anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, foram adicionados aos poços na diluição de 1:2.500 (v/v); as placas incubadas por 2 horas a 37°C. Após 3 lavagens, conforme descrito acima, a reação de ELISA foi revelada, adicionando-se aos poços 50 µL de cloreto de ortofenilenodiamina 0,4 mg/mL (OPD) em

tampão citrato 20 mmoles.L⁻¹ contendo 0,02% (v/v) de água oxigenada. As placas foram incubadas em câmara escura e a reação foi interrompida adicionando-se 50 µL de ácido sulfúrico 2 moles.L⁻¹ aos poços. A densidade ótica foi medida em 492 nm em leitora de ELISA.

A detecção de anticorpos IgM específicos para *P. multocida* foi realizada adicionando-se à placa anticorpos anti-IgM de coelho (no lugar de anti-IgG), utilizando uma diluição de 1:2.000. Uma vez que o anti-IgM é biotilado, as placas foram incubadas com 100 µL de Streptoavidina peroxidase 1:1.000 durante 30 minutos. Após este período foram lavadas 3 vezes com PBS-T e a reação para a revelação do ELISA foi realizada adicionando-se 100 µL de OPD em tampão citrato 20 mmoles.L⁻¹ contendo 0,02 % (v/v) de água oxigenada e interrompida conforme descrito anteriormente.

Para o ELISA de IgA foi empregado o protocolo descrito acima modificando-se o tampão de bloqueio para tampão PBS 0,01 moles.L⁻¹ pH 7,2 contendo Tween 20 0,05% (p/v), 5% (p/v) de sacarose e 1% (p/v) de BSA e o tampão de diluição do anti-IgA para PBS 0,01 moles.L⁻¹ pH 7,2 contendo Tween 20 0,05% (p/v) e 0,1% de BSA. A diluição padronizada para anti-IgA biotilada foi de 1:200.

3.18 – Remoção do SDS do extrato bruto solubilizado para formação das microesferas lipídicas

Para a remoção do SDS, cada mililitro do extrato bruto solubilizado obtido conforme descrito em 3.6 foi incubado com a 62 mg da resina Calbiosorb® por 2 horas a 25°C, sob agitação constante. Alíquotas de 100 µL das amostras foram coletadas em tempos pré-determinados e estimada a concentração de SDS conforme descrito no item 3.11.

3.19 – Imunização de coelhos com proteolipossomos e avaliação da capacidade protetora da imunização pela infecção experimental com *P. multocida*

Para a realização dos testes de imunização, primeiramente avaliamos a presença de anticorpos séricos específicos para *P. multocida* pelo método imunoenzimático (ELISA), conforme descrito no item 3.17. Os coelhos soro

negativos para *P. multocida* foram divididos em 3 grupos experimentais: Grupo 1 – Imunização com lipossomo; Grupo 2 – Imunização com Extrato bruto solubilizado de *P. multocida* (0,5 mg/mL) e Grupo 3 – imunização com proteolipossomo de DPPC.

Os coelhos dos diferentes grupos experimentais foram imunizados com dose única contendo 1,0 mL de: lipossomo de DPPC (controle), extrato bruto solubilizado ou proteolipossomo de DPPC pela via intramuscular na região glútea. 21 dias após a imunização, todos os grupos de animais foram desafiados com 10^5 ufc de *P. multocida*. Estes animais foram observados por um período total de 6 semanas. Ao final do experimento, os animais sobreviventes foram eutanasiados e então realizada necrópsia, inclusive dos não sobreviventes, para a observação de seus órgãos e vísceras.

Amostras de 3,0 mL de sangue dos animais foram coletadas por punção cardíaca, semanalmente durante todo o período experimental. Os respectivos soros obtidos foram armazenados a -20°C para avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para *P. multocida*.

3.20 – Obtenção das microesferas lipídicas ou microcápsulas

Foram ressuspensos 29,2 mg de óleo de soja e 11,3 mg de DPPC em 10 mL de tampão Tris-HCl 5 mmol.L^{-1} , pH 7,5, resultando em uma suspensão de concentração final de lipídios de 5 mmoles.L^{-1} . Esta suspensão foi sonicada em banho de gelo utilizando-se 20 pulsos de potência igual a 120 W (1 min/pulso), com intervalos de 1 minuto após cada pulso.

Esta primeira emulsão foi então gotejada em 100 mL de uma solução de PVA 3 % (p/v) sob agitação vigorosa 12.000 rpm durante 2 minutos utilizando-se o equipamento Ultra Turrax (Ika Modelo T18). A segunda emulsão foi então agitada suavemente com o auxílio de um agitador magnético por 3 horas a temperatura ambiente. Em seguida esta preparação foi submetida à centrifugação a $4.000 \times g$ em centrífuga Sorval durante 20 minutos a temperatura de 15°C . O sobrenadante foi coletado e o pellet foi ressuspenso em 50 mL de Tris-HCl 5 mmoles.L^{-1} pH 7,5. Este processo de centrifugação foi repetido por 3 vezes para a lavagem do excesso de PVA da amostra.

Para a obtenção das microesferas contendo as proteínas antigênicas, foi adicionada ao tampão de suspensão dos lipídios quantidade suficiente de extrato

bruto solubilizado, na ausência do detergente, para obter 3,75 mg de proteína total, preservando-se sempre o volume final de 10 mL de suspensão de lipídeos.

3.21 – Marcação das proteínas antigênicas com fluoresceína isotiocianato (FITC)

Inicialmente, o detergente presente no extrato bruto solubilizado das proteínas antigênicas foi removido através do tratamento com a resina hidrofóbica Calbiosorb® conforme descrito no item 3.18. Em seguida, o extrato bruto solubilizado foi concentrado com sistema Amicon utilizando uma membrana YM-10 para uma concentração final de proteína de 1 mg/mL. A esta amostra foi adicionado igual volume de uréia 7 moles/L e 17 % (v/v) de Tampão Carbonato 0,5 moles.L⁻¹ pH 9,5 (TC). A amostra resultante foi dialisada por 18 horas contra o TC contendo 2 mg/mL de FITC e 0,85 % (p/v) de NaCL gelado. Após este período, o tampão de diálise foi trocado para apenas TC e a diálise realizada por mais 2 horas. O tampão de diálise foi então substituído por Tris-HCL 5mmoles.L⁻¹ pH 7,5 o qual foi finalmente trocado por mais 5 vezes a cada 3 horas para a remoção do excesso de uréia.

3.22 – Microscopia eletrônica de varredura

As amostras obtidas seguindo-se o protocolo de preparação das microesferas lipídicas conforme descrito no item 3.20, foram imobilizadas sobre *stubs* de latão com o auxílio de uma lamínula, em seguida a amostra foi recoberta através da deposição de uma fina camada de ouro, utilizando-se um metalizador SCD 050 Sputter Coater BAL-TEC.

As observações e análises foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura Jeol 5.200, pertencente ao Departamento de Morfologia da FMRP-USP.

3.23 – Microscopia de Fluorescência

As microesferas lipídicas obtidas conforme descrito no item 3.20 contendo as proteínas antigênicas marcadas com FITC conforme descrito no item 3.21, foram submetidas à microscopia de fluorescência em Microscópio NIKON Eclipse E-800, pertncente ao Departamento de Morfologia da FMRP-USP.

As imagens foram adquiridas com o auxílio de uma câmara digital NIKON

DXM-1200 acoplada ao microscópio.

3.24 – Análise dos resultados

Os resultados foram expressos pela média $\pm$ desvio padrão (SD). A análise estatística foi realizada pelo teste *t-estudent* e os níveis de significância considerados dentro do intervalo de confiança $0,1 < p < 0,05$.

4 – Resultados

4.1 – Obtenção, solubilização e identificação das proteínas antigênicas da membrana da *P. multocida*

A obtenção de colônias puras de *P. multocida* foi realizada conforme descrito no item 3.2 de Materiais e Métodos. As colônias foram analisadas automaticamente utilizando-se o equipamento Bacster Microscan Modelo Walkway 96, pertencente ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (FMRP-USP). Os testes realizados vieram a confirmar a presença da *P. multocida* como único microrganismo na amostra.

A obtenção das frações de membrana da *P. multocida* requer uma etapa prévia de sucessivas centrifugações para separação e lavagem das células bacterianas inativadas ($\sim 10^9$ ufc/mL) do meio de crescimento constituído por BHI, conforme descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos. Este meio rico em proteínas solúveis pode representar até cerca de 70 % da constituição protéica da amostra e poderia interferir nos ensaios posteriores.

Após a lavagem do meio de cultivo, as células foram rompidas para a obtenção das frações de membranas através do processo de sonicação utilizando uma potência de 240 W por 30 min em banho de gelo conforme descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos.

Uma preparação típica das frações de membrana da *P. multocida*, partindo de 1 litro de meio de cultivo, produziu cerca de 8 mg/mL de proteína. A eletroforese (SDS-PAGE) destas frações de membranas revelou uma série de bandas protéicas, dentre elas as mais intensas foram as de massas moleculares de 97,5; 87; 74; 66; 60; 34 e 26 kDa (Figura 1A linha 3). A ausência de β - mercaptoetanol não causa alteração significativa no perfil eletroforético (dados não mostrados).

Figura 1 – SDS-PAGE e *Western Blotting* das proteínas da membrana da *P. multocida*. **A**: bandas protéicas coradas com prata e **B**: *Western Blotting*. **(1)** extrato bruto solubilizado das proteínas; **(2)** proteínas presentes no proteolipossomo constituído de DPPC e **(3)** fração de membrana. Os ensaios de SDS-PAGE e *Western blotting* foram realizados conforme descrito nos itens 3.5 e 3.9 de Materiais e Métodos, respectivamente.

Além disso, foi realizado ensaio de *Western Blotting* para verificar a presença de proteínas antigênicas nas frações de membrana. A Figura 1B linha 3, mostra que grande parte das bandas protéicas foram reconhecidas pela IgG obtida após a inoculação da bactéria inativada em animais e posteriormente purificada, conforme descrito nos itens 3.7 e 3.8 de Materiais e Métodos.

A solubilização das proteínas antigênicas das frações de membrana da *P. multocida* foi realizada incubando-se 0,5 mg/mL de proteína com SDS 1 % (p/v) por 2 horas sob agitação, conforme descrito no item 3.6 de Materiais e Métodos. A dosagem de proteína do material solubilizado, separado por ultracentrifugação, revelou um rendimento de solubilização de 85 % das proteínas presentes nas frações de membranas.

O perfil eletroforético das frações de membrana e do extrato bruto solubilizado (EBS) foram muito semelhantes, indicando uma gama de bandas protéicas que variaram de 10 a 150 kDa (Figura 1A, linhas 3 e 1, respectivamente). Após o *Western Blotting*, as bandas protéicas do extrato bruto solubilizado mostraram atividade imunogênica, uma vez que foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal desenvolvido contra a bactéria inativada (Figura 1B, linhas 3 e 1, respectivamente). Como podem ser observadas nesta Figura, as bandas mais intensas foram: 97,5, 87, 74, 66, 60, 34 e 26 kDa.

Obtido o extrato bruto solubilizado (EBS), contendo todas as espécies protéicas presentes nas frações de membrana da *P. multocida* e, uma vez que todas as proteínas solubilizadas foram reconhecidas pelo anticorpo policlonal, efetuamos estudos sistemáticos para definir a melhor condição para a reconstituição das proteínas em lipossomos.

4.2 – Preparação e caracterização dos proteolipossomos

A incorporação das proteínas antigênicas solubilizadas das frações de membrana em lipossomos foi realizada através do método de co-solubilização. Para a obtenção de um bom rendimento de incorporação foram necessários estudos para determinar condições ótimas como: metodologia adequada para a remoção do detergente da mistura lipídio:proteína:detergente; melhor relação lipídio:proteína e a natureza do fosfolipídio.

Uma vez que a incorporação de proteínas em lipossomos pelo método de co-solubilização requer a completa remoção do detergente, 2 métodos foram

testados para esta remoção: a diálise e o uso de resinas hidrofóbicas. A Figura 2 mostra que usando a resina Calbiosorb[®], a remoção do SDS foi maior que 99 % após 4 horas de incubação, enquanto que a diálise removeu apenas 55 % do SDS mesmo após 90 h de incubação e a resina Biobeads[®] removeu cerca de 90 % do detergente após 80 min de incubação.

O método de remoção do SDS parece estar relacionado à incorporação das proteínas em lipossomos constituídos de DPPC. O uso de Calbiosorb[®] resultou em 93 % de incorporação das proteínas, enquanto Biobeads[®] e diálise renderam apenas 2,9 % e 10 % de incorporação, respectivamente.

A melhor relação lipídio:proteína:detergente foi 10:1:70 (p/p), a qual rendeu 93 % de incorporação das proteínas. Aumentando a concentração de detergente e mantendo as mesmas proporções de proteína e lipídio, a incorporação caiu para 65%. Diminuindo a concentração de proteína e mantendo a razão lipídio:detergente a eficiência de incorporação diminui para 55 %.

Um passo importante para alcançar um alto rendimento de incorporação das proteínas em proteolipossomos é o estudo da composição lipídica mais adequada.

A influência da cabeça polar dos fosfolípidios na construção dos sistemas de proteolipossomos foi estudada utilizando-se DPPE, DPPG, DPPS, DPPC e DPPA fixando-se a porção hidrocarbônica. A Tabela I mostra que para os sistemas constituídos de fosfolípidios zwitteriônicos, DPPE e DPPC, a incorporação das proteínas nos lipossomos foi de 68,4 % e 93 %, respectivamente. A reconstituição de proteínas em lipossomos formados por lipídios carregados negativamente apresentou uma incorporação de 49,6 % para o DPPA, a qual caiu para 19,2 % para o DPPS e 11,6 % quando o DPPG foi utilizado. Todas as preparações, realizadas conforme descrito no item 3.10 de Materiais e Métodos, foram submetidas ao ensaio de gradiente de densidade de sacarose no intuito de verificar a homogeneidade destes sistemas reconstituídos, conforme descrito no item 3.14 de Materiais e Métodos. Com excessão do proteolipossomo constituído de DPPC, todos os ensaios utilizando-se outros fosfolípidios para a produção dos proteolipossomos revelaram perfis de eluição característicos da presença de agregados de lipídio ou proteína, além das vesículas de proteolipossomos.

O gradiente de densidade de sacarose para os sistemas constituídos de

Figura 2 – Remoção de SDS durante a preparação dos proteolipossomos. A mistura de lipídio:proteína:detergente preparada como descrito no item 3.10 de Materiais e Métodos foi monitorada quanto a determinação da concentração de SDS residual durante a formação dos proteolipossomos utilizando-se (■) 200mg/mL da resina Calbiosorb (trocas de resina com 2 e 4 h). **Inserção:** remoção de SDS monitoradas durante: (○) diálises contra Tris-HCl 5 mmoles.L⁻¹, pH 7,5 contendo 150 nmoles.L⁻¹ de NaCl (trocas de tampão em 4, 20, 40 e 72 h) e (●) incubação com 200 mg/mL da resina Biobeads (trocas de resina com 10, 20 e 65 min).

DPPE indicou uma co-migração dos lipídios e proteínas para a região de maior densidade do gradiente de sacarose. Este efeito é característico da presença de agregados lipídio:proteína, portanto quando se verificou um rendimento de 68,4 %, não estávamos verificando somente a quantidade de proteína incorporada em um sistema vesicular de lipossomo, mas também estávamos dosando a proteína presente no agregado lipídio:proteína (resultados não mostrados).

Para os lipossomos constituídos de DPPG, o gradiente de densidade mostrou que, além de termos uma dispersão de proteínas e lipídios presentes em todo o gradiente de sacarose, característico de proteína livre e agregados protéicos, detectamos estas espécies também no fundo do gradiente, característico da formação de agregados constituídos de lipídio:proteína (resultados não mostrados).

Comportamento semelhante pode ser observado para o gradiente de densidade de sacarose dos proteolipossomos constituídos de DPPS onde ocorreu uma dispersão de lipídios por todo o gradiente, além disso, foi quantificada proteína livre no topo e no fundo do gradiente indicando também, para este último a presença de agregados protéicos (resultados não mostrados).

O gradiente de densidade de sacarose para os sistemas formados de DPPA indicou a presença tanto de lipídios quanto de proteínas no topo do gradiente, além disso, nota-se também a presença de lipídios no fundo do gradiente, o que é característico de agregados lipídicos (resultados não mostrados).

Uma vez determinado a cabeça polar mais adequada para a incorporação das proteínas, passou-se a investigar a influência do comprimento da cadeia hidrocarbônica da fosfatidilcolina (número de carbonos presentes na cadeia acil dos ácidos graxos do fosfolipídio) pelo estudo da concentração de proteínas antigênicas incorporadas e o perfil de eluição em gradientes de densidade de sacarose para proteolipossomos reconstituídos por DLPC, DMPC, DPPC e DSPC, os quais apresentam 12, 14, 16 e 18 átomos de carbono, respectivamente. Os resultados mostrados na Tabela I indicaram que lipossomos de DLPC, DMPC e DSPC incorporam 35, 75 e 46% das proteínas presentes no extrato bruto solubilizado, enquanto que lipossomos de DPPC incorporam 93%.

A centrifugação da preparação de extrato bruto solubilizado em gradiente contínuo de sacarose de 9 a 30 % (p/v), Figura 3A, revelou a presença de

proteína em concentrações de sacarose na faixa de 10 a 12 % (p/v), mostrando

Tabela I: Curvatura espontânea, temperaturas de transição e rendimento de incorporação das proteínas em lipossomos constituídos por diferentes fosfolipídios.

Fosfo-lipídio	Carga líquida	Cadeia hidrocarbônica (# de carbonos)	Temperatura de transição principal (°C)	Diâmetro crítico da vesícula (Å)	*Diâmetro da vesícula (Å)	*Diâmetro do Proteolipossomo (Å)	Incorporação de Proteína (%)
DPPG	-1	16	41,0	904	1388 ± 7	1232 ± 31	11,6 ± 0.1
DPPS	-1	16	54,0	630	1144 ± 1	1689 ± 241	19,2 ± 0.4
DPPA	-1	16	67,0	904	1008 ± 23	1937 ± 121	49,6 ± 7.5
DPPE	0	16	64,0	2160	1057 ± 14	2508 ± 115	68,4 ± 9.0
DLPC	0	12	- 1,7	128	720 ± 2	1110 ± 16	35,1 ± 0.3
DMPC	0	14	23,5	288	684 ± 2	1195 ± 7	75,3 ± 0.5
DPPC	0	16	41,4	1310	1430 ± 9	1850 ± 43	92,8 ± 0.7
DSPC	0	18	54,5	1362	1280 ± 6	1960 ± 4	46,0 ± 0.2

(*) Determinado por espalhamento de luz

que a amostra do extrato bruto solubilizado permanece praticamente no topo do gradiente. Para a centrifugação em gradiente de sacarose dos lipossomos constituídos de DPPC obtidos conforme descrito no item 3.10 de Materiais e Métodos (Figura 3B), observa-se a presença de um único pico, em concentração de sacarose ao redor de 16 % (p/v) que é identificado pela dosagem de fosfato inorgânico oriundo da hidrólise ácida dos fosfolipídios, conforme descrito no item 3.12 de Materiais e Métodos. Finalmente, quando é realizada a centrifugação em gradiente de sacarose dos proteolipossomos, também é observada a presença de um único pico em concentrações de sacarose ao redor de 16 % (p/v) onde, tanto as proteínas quanto o lipídio se equilibram na mesma densidade, sugerindo, portanto, a associação das proteínas aos lipossomos (Figura 3C).

Também pode ser observado que não há presença de proteínas e/ou lipídios no topo ou no fundo do gradiente indicando que para este fosfolipídio não existem estas espécies livres ou agregadas.

A migração dos proteolipossomos constituídos pelos fosfolipídeos DLPC, DMPC e DSPC no gradiente de densidade de sacarose mudou de acordo com o

lipídeo utilizado. Em geral, para as três preparações não houve uma correspondência entre os picos de proteína e fosfolipídio, indicando eluições independentes, o que sugere que junto com a formação de alguns proteolipossomos, houve também uma possível agregação de proteínas e/ou lipídeos (Figura 4).

O perfil de eluição no gradiente de densidade de sacarose para proteolipossomos constituídos de DLPC (Figura 4A) mostrou 2 picos, o primeiro onde os lipídios e proteínas coexistem (representando os proteolipossomos) e o segundo no qual o conteúdo protéico foi muito maior do que o de lipídio (representando possivelmente a presença de agregados protéicos). Para os proteolipossomos constituídos de DMPC (Figura 4B) o perfil de eluição também revelou 2 picos, correspondentes a lipídios e proteínas, porém estes não apresentam comportamento de agregados, mas talvez representem 2 populações de tamanhos diferentes de proteolipossomos, portanto com densidades diferentes. Para os sistemas reconstituídos de DSPC (Figura 4C) o perfil de eluição mostra um único pico em cerca de 16% de sacarose, porém o conteúdo em fósforo é maior que o de proteína sugerindo uma maior formação de lipossomos não associados a proteínas.

Além disso, foram realizados ensaios de espalhamento de luz de todos os sistemas lipídicos testados e os resultados estão resumidos na Tabela I. É interessante ressaltar que para qualquer um dos fosfolipídios utilizados, o diâmetro médio dos lipossomos aumenta consideravelmente quando estes sistemas estão associados com as proteínas, com exceção do proteolipossomo constituído de DPPE.

Estes resultados, associados com a eficiência de incorporação em diferentes proteolipossomos, sugerem uma relação entre o comprimento da cadeia de ácido graxo (ou das propriedades físicas que a porção hidrocarbônica confere à bicamada lipídica) e o rendimento de incorporação das proteínas, indicando que o proteolipossomo constituído de DPPC é mais adequado e apresenta o melhor rendimento de incorporação de proteínas alcançando valores de 92,8%.

Uma alíquota de proteolipossomos constituída de DPPC foi ultracentrifugada, fixada com glutaraldeído 3 %, processada conforme descrito no item 3.13 de Materiais e Métodos e finalmente submetida à microscopia eletrônica

Figura 3: Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose: **(A)** extrato bruto solubilizado das proteínas da *P. multocida*, **(B)** lipossomos de DPPC e **(C)** proteolipossomos de DPPC. Absorção: (○) 595 nm, referente ao conteúdo protéico; (●) 820 nm, referente ao fosfato inorgânico, obtido pela hidrólise ácida dos fosfolípidos e (■) % sacarose determinada por refratometria.

de transmissão. A Figura 5 mostra que de fato pode ser observado um sistema de proteolipossomo que apresentou características vesiculares com um diâmetro médio de 200 nm, muito semelhante ao obtido pelo ensaio de espalhamento de luz (185 nm), apesar da diferença entre as técnicas empregadas.

Com o objetivo de verificar quais proteínas estavam presentes no sistema reconstituído, realizamos uma eletroforese sob condições desnaturantes das proteínas presentes nos proteolipossomos, conforme descrito no item 3.5 de Materiais e Métodos. Como pode ser observado na Figura 1A linha 2, ocorreu a incorporação de todas as proteínas originalmente presentes no extrato bruto solubilizado.

Finalmente, para verificar a atividade antigênica das proteínas reconstituídas no lipossomo, foi realizado o *Western Blotting* que está mostrado na Figura 1B linha 2. Mais uma vez, foi obtido um perfil muito semelhante ao observado tanto para as frações de membranas quanto para o extrato bruto solubilizado (Figura 1B linhas 3 e 1, respectivamente). Estes resultados vêm confirmar que não há uma seleção de um tipo de proteína presente no extrato bruto solubilizado, preferencialmente a outra, durante o processo de incorporação.

Figura 4 – Centrifugação em gradiente de densidade de sacarose dos proteolipossomos constituídos por: **(A)** DLPC, **(B)** DMPC e **(C)** DSPC. Absorção: (○) 595 nm, referente ao conteúdo protéico; (●) 820 nm, referente ao fósforo inorgânico obtido pela hidrólise ácido dos fosfolípidos e (■) % sacarose determinada por refratometria.

Figura 5 – Imagem obtida após a microscopia eletrônica de transmissão dos proteolipossomos constituídos por DPPC obtidos conforme descrito no item 3.10 de Materiais e Métodos. A barra corresponde a 100 nm.

4.3 – O uso dos proteolipossomos como sistemas de imunização contra a pasteurelose

Uma vez que o DPPC revelou ser o melhor fosfolipídio para a construção de sistemas de proteolipossomos, apresentando maior homogeneidade relativa com melhor rendimento de incorporação de proteínas, passamos para outra etapa do projeto, que se refere à aplicação deste sistema como uma possível vacina contra a pasteurelose.

Para a realização dos testes de imunização foram escolhidos coelhos hígidos, os quais não apresentavam sinais de contato com a *P. multocida*. Esta verificação foi realizada através de análise sorológica, onde uma amostra de sangue do coelho foi coletada e o soro foi separado para a avaliação da presença de anticorpos IgG específicos contra a bactéria utilizando-se para isto, a técnica de ELISA, conforme descrito no item 3.17 de Materiais e Métodos. Os animais soronegativos foram escolhidos para os ensaios de imunização.

Assim, estes animais foram separados em grupos e imunizados através de injeção intramuscular com: 1) tampão Tris-HCl 5 mmolL⁻¹, pH 7,5 (controle); 2) extrato bruto solubilizado das proteínas antigênicas; 3) lipossomos constituídos de DPPC, e 4) proteolipossomos constituídos de DPPC.

Para efeito de comparação, um outro grupo de animais escolhidos sob as mesmas condições foi vacinado com a bactéria atenuada utilizando-se hidróxido de alumínio como imunoadjuvante.

Após 21 dias da imunização, todos os animais foram infectados experimentalmente com 10⁵ ufc por duas vias. A primeira por via nasal, através de “swab”, e a segunda por via peritoneal. Para cada uma das vias de infecção, foram utilizados grupos diferentes de animais. Os resultados utilizando-se a via de infecção peritoneal estão sumarizados na Tabela II enquanto os obtidos através da infecção pela via nasal estão apresentados na Tabela III.

Os animais controle, imunizados com o tampão de trabalho, não resistiram à infecção experimental e todos vieram a óbito em um período de 10 dias após a infecção tanto por via peritoneal (Tabela II) quanto por via nasal (Tabela III). A observação dos órgãos destes animais, realizada após a necrópsia, revelou um quadro de septicemia hemorrágica típico de pasteurelose, além disso, o estriamento em placas contendo meio de crescimento específico para *P.*

multocida foi positivo para esta bactéria, indicando que a causa da morte foi de fato a contaminação pela bactéria.

Tabela II: Testes da eficiência de imunização de coelhos contra a pasteurelose utilizando-se a vacina constituída com proteolipossomos. Os grupos de animais foram imunizados com diferentes preparações e infectados experimentalmente pela via intraperitoneal. Todos os animais sobreviventes foram eutanasiados 6 semanas após a infecção experimental.

Teste de Imunização	Sobreviventes/ total testado	Proteção (%)
Controle (tampão)	0/5	0
Extrato bruto solubilizado	1/5	20
Bactéria atenuada	12/40	30
Lipossomo	0/5	0
Proteolipossomo	5/5	100

A imunização realizada com o extrato bruto solubilizado das proteínas, apresentou uma proteção de 20 % quando a infecção experimental foi via intraperitoneal (Tabela II).

A imunização utilizando-se bactéria atenuada não apresentou uma boa eficiência em imunizar animais contra a pasteurelose, visto que a taxa de sobrevida foi de apenas 30 % (Tabela II).

Os animais imunizados com os lipossomos de DPPC, também não resistiram à infecção experimental, tanto pela via peritoneal (Tabela II) quanto pela via nasal (Tabela III) e, todos vieram a óbito após 10 dias da infecção. Os órgãos dos animais, que foram avaliados pela necrópsia também revelaram a presença da bactéria, além de apresentarem um quadro clínico de septicemia hemorrágica muito expressivo.

Para o ensaio de eficiência na imunização com proteolipossomos constituídos de DPPC também foram testadas as duas vias de infecção experimental. Os animais infectados via peritoneal apresentaram uma sobrevida de 100 % (Tabela II), enquanto que os animais infectados pela via nasal apresentaram uma taxa de sobrevida de 80 % (Tabela III).

Tabela III: Testes da eficiência de imunização de coelhos contra a pasteurelose utilizando-se a vacina constituída com proteolipossomos. Os grupos de animais foram imunizados com diferentes preparações e infectados experimentalmente pela via intranasal. Todos os animais sobreviventes foram eutanasiados 6 semanas após a infecção experimental.

Teste de Imunização	Sobreviventes/ total testado	Proteção (%)
Controle	0/5	0
Lipossomo	0/5	0
Proteolipossomo	4/5	80

O animal que veio a óbito após a infecção intranasal apresentou o quadro clínico de infecção por pasteurelose, porém neste caso não o da septicemia hemorrágica, mas sim conjuntivite e pneumonia. Além disso, os órgãos examinados apresentaram teste positivo para a *P. multocida*.

4.4 – Padronização do método imunoenzimático (ELISA) para análise dos níveis de anticorpos IgG específicos para *P. multocida* no soro de coelhos.

Com o intuito de avaliar se coelhos imunizados com as diferentes preparações de antígeno são capazes de produzir anticorpos específicos para *P. multocida*, foram padronizados os ensaios de ELISA para detecção de anticorpos específicos no soro.

Para a padronização da detecção dos níveis séricos de IgG, inicialmente realizamos experimentos variando: a quantidade de antígeno (EBS) fixada na placa de ELISA (1, 10 e 20 µg/poço), diluições de soro de animais sabidamente infectados com *P. multocida* (1:100 - 1:12.600) e de anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:1.125, 1:2.500 e 1:5.000) (Figura 6). A análise dos nossos resultados indicou que a curva que apresentava melhor decaimento de leitura usando as diferentes diluições do soro, leitura de absorbância dentro do limite de detecção do aparelho e uma melhor distinção entre os diferentes soros testados, foi obtido quando utilizamos 10 µg de antígeno

total/poço e uma diluição do anti-IgG de 1:2.500 (Figura 6E). Deste modo de todos os experimentos de ELISA para a detecção de IgG sérica realizados neste trabalho, escolhemos 10 µg de antígeno/poço e anticorpo de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase na diluição de 1: 2.500.

Uma vez padronizado o teste de ELISA para a análise dos níveis séricos de anticorpos IgG específicos para *P. multocida* no soro de coelhos, foi realizado o monitoramento semanal da produção de IgG nos animais imunizados somente com o veículo (lipossomo), com o sistema de proteolipossomo e com o extrato bruto solubilizado de *P. multocida* (EBS) (Figura 7).

A Figura 7A mostra que os níveis séricos de IgG específicos para *P. multocida* nos animais imunizados com lipossomo, não apresenta alteração significativa durante o período avaliado, pois, os níveis séricos de IgG específicos são semelhantes aos encontrados em animais não imunizados.

A imunização de coelhos com extrato bruto solubilizado (EBS) foi capaz de induzir a produção de IgG específicos para *P. multocida* (Figura 7B). Os resultados indicam que, sete dias após a imunização com EBS, os níveis de anticorpos IgG específicos no soro já se encontram bastante aumentados, e permanecem estáveis, sem alteração significativa durante as 3 semanas de observação dos animais.

Os ensaios de ELISA para os soros de animais imunizados com o proteolipossomo constituído de DPPC (Figura 7C), indicam que este sistema é capaz de estimular a produção de anticorpos IgG específicos para *P. multocida*. Nossos resultados demonstram elevação dos níveis séricos de IgG específicos 7 dias após a imunização, que permanecem elevados por mais uma semana. Diferentemente dos resultados observados com soros de animais imunizados com EBS, foi verificado que os soros de animais imunizados com proteolipossomo coletados 21 dias após a imunização, apresentam níveis séricos de IgG específicos significativamente reduzidos.

Figura 6 – Perfil dos diferentes ensaios da técnica imunoenzimática indireta para detecção de anticorpos IgG específicos para *P. multocida* em soros de animais infectados. Símbolos: (▲) soro de animais imunizados com extrato bruto solubilizado; (▼) Soro de animais vacinados com proteolipossomos, e; (■) soro de animais infectados pela *P. multocida*. Os ensaios de ELISA foram realizados, conforme descrito no item 3.17 de Materiais e Métodos. Os dados da figura representam uma média (n=5) e p<0,05.

Figura 7 – Níveis séricos de IgG específicos para *P. multocida* após imunização intramuscular com proteolipossomo constituído de DPPC. Os níveis de IgG específicos no soro de coelhos dos diferentes grupos experimentais foram analisados antes da imunização (■), 7 (▲), 14 (▼) e 21 (◆) dias após imunização **A** – animais imunizados com lipossomo; **B** – animais imunizados com EBS; **C** – animais imunizados com proteolipossomo e; **D** – diagrama de barras do monitoramento dos níveis de IgG após a imunização. Os níveis de anticorpos IgG específicos nos soros foram obtidos pelo ensaio de ELISA, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados da figura representam a Média $\pm$ SEM (n=5 e p<0,05).

4.5 – Padronização do método imunoenzimático (ELISA) para análise dos níveis de anticorpos IgM específicos para *P. multocida* no soro de coelhos.

Para a padronização do ensaio de ELISA, a fim de detectar os níveis séricos de IgM, a quantidade de antígeno (EBS) para a sensibilização da placa de ELISA foi fixada em 10 µg/poço, uma vez que esta quantidade já havia sido padronizada para a detecção de IgG específica, e consideramos que a afinidade do antígeno pelo anticorpo IgM é semelhante à afinidade do antígeno pelo anticorpo IgG. E realizamos experimentos variando: diluições de soro de animais sabidamente infectados com *P. multocida* dentro de dois intervalos distintos (1:100 - 1:12.800 e 1:5 – 1:640) e diluições dos anticorpos anti-IgM biotinizados (1:2.000, 1:4.000 e 1:8.000). A análise dos nossos resultados indicou que a curva que apresentou melhor decaimento da leitura usando as diferentes diluições do soro, leitura de absorbância dentro do limite de detecção do aparelho, que é linear até absorbância igual a 2. e melhor distinção entre os diferentes soros testados, foi obtido quando utilizamos uma diluição de 1:2.000 para anti-IgM e uma faixa de diluição de soro total de coelho de 1:5 – 1:640 (Figura 8B).

A análise dos níveis séricos de IgM específicos para *P. multocida* no soro de coelhos imunizados com diferentes preparações de antígenos foi realizada pelo monitoramento semanal da produção de IgM nos animais imunizados somente com o veículo (lipossomo), com o sistema de proteolipossomo e com o extrato bruto solubilizado de *P. multocida* (EBS) (Figura 9).

A Figura 9A mostra que os animais imunizados com lipossomo não apresentaram aumento nos níveis séricos de IgM específicos para *P. multocida* durante o período avaliado, porém, é importante ressaltar que a resposta IgM para o lipossomo é maior do que a IgG detectada para a mesma preparação (Figura 8A).

A imunização de coelhos com extrato bruto solubilizado de *P. multocida* (EBS) foi capaz de induzir a produção de IgM específicos para esta bactéria (Figura 9B). Os resultados também indicam que a produção de IgM aumenta chegando a um máximo de produção em 7 dias após a imunização, e depois começa a decrescer gradativamente durante o período experimental (Figura

Figura 8 – Padronização do ensaio imunoenzimático indireto para detecção de anticorpos IgM específicos para *P. multocida* em soros de animais sabidamente infectados. **A**: diluição do soro de 1:100 a 1:12.800 e **B**: diluição do soro de 1:5 – 1:640. Símbolos: (■) diluição de anti-IgM de 1:2.000; (▲) diluição de anti-IgM de 1:4.000; (▼) diluição de anti-IgM de 1:8.000. Os ensaios de ELISA foram realizados, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados da figura representam uma média (n=5) e p<0,05.

Figura 9 – Níveis séricos de IgM específicos para *P. multocida* após imunização intramuscular com proteolipossomo constituído de DPPC. Os níveis de IgM específicos no soro de coelhos dos diferentes grupos experimentais foram analisados antes da imunização (■), 7 (▲), 14 (▼) e 21 (◆) dias após imunização. **A** – animais imunizados com lipossomo; **B** – animais imunizados com EBS; **C** – animais imunizados com proteolipossomo e; **D** – diagrama de barras do monitoramento dos níveis de IgM após a imunização. Os níveis de anticorpos IgM específicos nos soros foram obtidos pelo ensaio de ELISA, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados da figura representam a Média $\pm$ SEM (n=5) e $p < 0,05$.

9D).

Os ensaios de ELISA com soros de animais imunizados com o proteolipossomo constituído de DPPC (Figura 9C, D), indicam que este sistema é capaz de estimular a produção de anticorpos IgM específicos para *P. multocida*. Nossos resultados demonstram elevação dos níveis séricos de IgM específicos 7 dias após a imunização, que permanecem elevados durante todo o período experimental. Além disso, os níveis séricos de IgM dos animais imunizados previamente com proteolipossomos são significativamente maiores que os níveis detectados no soro dos animais imunizados com EBS (Figura 9D).

4.6 – Padronização do método imunoenzimático (ELISA) para análise dos níveis de anticorpos IgA específicos para *P. multocida* no soro de coelhos.

A fim de padronizarmos os parâmetros experimentais para a detecção de IgA específica para a *P. multocida*, utilizamos a mesma concentração de antígeno padronizada para a detecção de IgG e IgM (10 µg/poço) para a sensibilização da placa e variamos os intervalos de diluições seriadas dos soros dos animais (1:5 – 1:640; 1:10 – 1:1.280; 1:100 – 1:12.800) e a diluição do anti-IgA biotinilado de coelho (1:100 e 1:200). A análise das curvas resultantes indicou que a detecção de IgA em soro de animais sabidamente infectados com *P. multocida* é melhor realizada quando sensibilizamos as placas utilizando uma concentração de antígenos de 10 µg/poço, o intervalo de diluição seriada do soro de animais de 1:5 a 1:640 e uma diluição de anti-IgA de coelho de 1:200 (Figura 10D).

Além disso, foram necessárias mudanças na metodologia como, o tampão utilizado no bloqueio de sítios inespecíficos e na diluição seriada do soro, o qual passou a ser composto por PBS contendo 0,05 % (p/v) de Tween 20, 1 % (p/v) de BSA e 5 % (p/v) de sacarose e o tampão de diluição do anti-IgA que passou a ser composto por PBS contendo 0,05 % (p/v) de Tween 20 e 0,1 % (p/v) de BSA.

A Figura 10 mostra as curvas obtidas durante o processo de padronização do ELISA para a detecção de IgA no soro dos animais. As diluições de anti-IgA testadas não apresentaram diferenças significativas na

Figura 10 – Padronização do ensaio imunoenzimático indireto para detecção de anticorpos IgA específicos para *P. multocida* em soros de coelhos sabidamente infectados. **A e D**: diluição do soro de 1:5 a 1:640; **B e E**: diluição do soro de 1:10 a 1:1.280; **C e F**: diluição do soro de 1:100 a 1:12.800.

sensibilidade de detecção, porém quanto mais diluído o soro menor a sensibilidade de detecção da IgA indicando, portanto, que o melhor intervalo de diluição do soro é de 1:5 – 1:640.

A análise dos níveis séricos de IgA específicos para *P. multocida* no soro de coelhos imunizados com diferentes preparações de antígenos foi realizada pelo monitoramento semanal da produção de IgA nos animais imunizados somente com o veículo (lipossomo), com o extrato bruto solubilizado de *P. multocida* (EBS) e com o sistema de proteolipossomo (Figura 11).

A Figura 11A mostra que os níveis séricos de IgA específicos para *P. multocida* nos animais imunizados com lipossomo, não apresenta alteração significativa durante o período avaliado, pois os níveis séricos de IgA específicos são semelhantes aos encontrados em animais não imunizados.

A imunização de coelhos com extrato bruto solubilizado de *P. multocida* (EBS) foi capaz de induzir a produção de IgA específicos para *P. multocida* (Figura 11B). Os resultados indicam que, sete dias após a imunização com EBS, os níveis de anticorpos IgA específicos no soro já se encontram bastante aumentados, e continuam aumentando gradativamente durante o período de monitoramento antes da infecção experimental que ocorre 21 dias após a imunização.

Os ensaios de ELISA para os soros dos animais imunizados com o proteolipossomo constituído de DPPC (Figura 11C), indicam que os anticorpos séricos IgA específicos para *P. multocida* não foram detectados, pois não ocorreu nenhuma mudança significativa nos níveis de IgA durante o monitoramento da produção destas espécies de anticorpos séricos, nas 3 semanas após a imunização com o proteolipossomo (Figura 11D).

Figura 11 - Níveis séricos de IgA específicos para *P. multocida* após imunização intramuscular com proteolipossomo constituído de DPPC. Os níveis de IgA específicos no soro de coelhos dos diferentes grupos experimentais foram analisados antes da imunização (■), 7 (▲), 14 (▼) e 21 (◆) dias após imunização **A** – animais imunizados com lipossomo; **B** – animais imunizados com EBS; **C** – animais imunizados com proteolipossomo e; **D** – diagrama de barras do monitoramento dos níveis de IgA após a imunização. Os níveis de anticorpos IgA específicos nos soros foram obtidos pelo ensaio de ELISA, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados da figura representam a Média $\pm$ SEM (n=5) e $p < 0,05$.

4.7 – Avaliação dos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para *P. multocida* em coelhos imunizados com proteolipossomos antes e depois da infecção experimental.

Para avaliar se os níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos no soro estão correlacionados com o grau de proteção conferida pela imunização prévia com EBS ou proteolipossomos em coelhos infectados com *P. multocida*, comparamos os níveis de anticorpos séricos dos animais antes (21 dias após imunização) e depois da infecção experimental (7 dias após a infecção) (Figura 12).

Os nossos resultados indicam que animais imunizados com EBS antes da infecção apresentam um aumento nos níveis séricos de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos (Figura 12A). A produção de IgG é notadamente maior que as outras imunoglobulinas estudadas, porém os níveis séricos de IgM e IgA são semelhantes após 21 dias de imunização com EBS (dados não mostrados).

Após a infecção experimental destes animais com 10^5 ufc da bactéria não houve mudança significativa nos níveis séricos de IgG e IgM, mantendo os níveis semelhantes aos verificados antes da infecção, porém há um aumento na resposta IgA específica para a *P. multocida* 7 dias após a infecção experimental (Figura 12A). Vale ressaltar que 14 dias após a infecção experimental cerca de 40 % dos animais do grupo decresceram drasticamente os níveis séricos de IgA voltando aos níveis basais detectados antes da imunização com EBS (dados não mostrados).

Por outro lado, animais imunizados com proteolipossomos, que apresentaram, antes da infecção, níveis séricos de IgG específica menores que os observados para os animais imunizados com o EBS, após a infecção experimental aumentaram significativamente os níveis de IgG (Figura 12B).

Os níveis séricos de IgM específicos 21 dias após a imunização com o proteolipossomo foram notadamente mais elevados que os detectados para os animais imunizados com o EBS no mesmo período. Após a infecção experimental a produção de IgM para os animais imunizados com o sistema de proteolipossomo continua sendo estimulada apresentando um aumento significativo.

Não foi detectada a estimulação nos níveis séricos de IgA para animais imunizados com o proteolipossomo, mesmo após a infecção experimental.

Figura 12 – Níveis séricos de (■) IgG, (■) IgM e (■) IgA específica para *P. multocida* em coelhos imunizados com **A**: EBS e **B**: proteolipossomo, antes (21 dias após a imunização) e depois da infecção experimental (7 dias). Os níveis de IgG, IgM e IgA específicos no soro foram detectados por ensaios de ELISA conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados representam uma média $\pm$ SEM (n=5). * e ** p<0.05.

4.8 – Avaliação da sobrevivência dos coelhos imunizados com proteolipossomo e desafiados com *P. multocida*.

Para avaliar se imunização com as preparações de antígeno desenvolvidos neste trabalho apresentavam propriedade de vacina, ou seja, seriam capazes de proteger os animais frente à infecção com *P. multocida*, 21 dias após a imunização os animais imunizados de todos os grupos experimentais foram desafiados através da injeção intraperitoneal de 10^5 ufc de *P. multocida*, conforme descrito no item 3.19 de Materiais e Métodos.

Os resultados mostrados na Figura 13 indicam que a imunização com lipossomo, como esperado, não protege o animal frente o desafio com *P. multocida*. A imunização prévia com EBS é capaz de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais desafiados com *P. multocida*, porém 10 dias após a infecção todos os animais morreram. Por outro lado, a imunização prévia com o proteolipossomo foi capaz de proteger 95 % dos animais frente à infecção com *P. multocida*.

Estes animais imunizados com os proteolipossomos foram observados durante os 140 dias após o desafio experimental. Durante este período, nenhum dos animais apresentou qualquer sintoma de hipersensibilidade referente ao desafio experimental com *P. multocida*. Após o período de observação descrito acima, foram coletados os soros e o lavado nasal destes animais para determinação dos níveis de anticorpos específicos para a *P. multocida*, como dia zero, os quais estão mostrados na Figura 14.

Uma vez determinados os níveis séricos de IgG, IgM e IgA e de IgA do lavado nasal, os animais foram novamente infectados por uma nova carga bacteriana de 10^5 ufc para a avaliação de uma possível memória imunológica, uma vez que estes animais haviam sido vacinados com os proteolipossomos 161 dias antes deste novo desafio. Todos os animais sobreviveram e, novamente, foram coletados o soro e o lavado nasal em 5, 12 e 25 dias após a reinfecção.

A Figura 14A mostra que os níveis de IgG antes da reinfecção já se apresentam elevados (dia zero) e que após o novo desafio com a bactéria ocorre um aumento discreto destes níveis, que se mantém durante o período avaliado.

Figura 13 – Porcentagem de sobrevivência de animais imunizados com diferentes formulações: (▲) lipossomo (n=5), (▼) EBS (n=10) e (■) proteolipossomo (n=25) e desafiados 21 dias após a imunização com 10^5 ufc de *P. Multocida*, através de injeção intraperitoneal.

Os níveis séricos de IgM antes da reinfecção também se apresentam mais elevados. Após o novo desafio os níveis séricos de IgM aumentam significativamente. Após 25 dias de experimentação os níveis de IgM apresentam um pequeno decaimento, porém continuam elevados (Figura 14B).

Como observado anteriormente, não foi possível detectar através do ensaio de ELISA os níveis séricos de anticorpos IgA nos animais imunizados previamente com o sistema de proteolipossomo (Figura 14C). No entanto, após a reinfecção, pode ser observado um aparecimento crescente de anticorpos IgA específicos para *P. multocida* presentes na secreção nasal destes animais (Figura 14D).

Após o período de observação dos animais reinfectedos todos foram eutanasiados para a avaliação da integridade de seus órgãos internos, como pulmões e tecidos. Os animais não apresentaram nenhum tipo de lesão purulenta, secreções nas vias aéreas superiores ou mesmo vaso dilatação que é indício da instalação da septicemia hemorrágica.

Estes resultados indicam que os animais imunizados com o sistema de proteolipossomos são protegidos pela infecção com *P. multocida* e que este sistema foi capaz de produzir memória imunológica.

Figura 14 – Níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA específicos para *P. multocida* 161 dias após a imunização com proteolipossomos (dia zero), infectados e reinfetados experimentalmente após 140 dias com 10^5 ufc da bactéria. **A:** IgG sérica; **B:** IgM sérica; **C:** IgA sérica; **D:** IgA de secreção nasal. Os valores do gráfico representam os dados obtidos pelo ensaio de ELISA conforme descrito em Materiais e Métodos. Os dados da figura representam uma média ($n=8$) e $p<0,05$.

4.9 – Preparação de microesféras lipídicas

4.9.1 – Microesferas lipídicas brancas

Um outro sistema carregador de proteínas e drogas muito empregado é o de microesferas. Uma vez que as proteínas antigênicas estudadas neste trabalho são de membrana, optamos por construir sistemas de microesferas lipídicas.

Inicialmente, foram realizadas montagens de sistemas de microesferas na ausência de proteínas antigênicas da bactéria (microesfera branca), para a adequação das condições experimentais.

Para tal, foram realizados estudos de adequação da metodologia de obtenção das microesferas bem como as concentrações dos componentes da suspensão: a concentração de lipídios e a concentração de álcool polivinílico (PVA).

O primeiro ensaio para a preparação das microesferas lipídicas foi realizado ressuspendendo-se 50 mg de óleo de soja, 12 mg de lecitina de gema de ovo, 22 mg de glicerol em 5 mL de tampão Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 7,5. Esta suspensão foi aquecida a 60°C em banho termostatizado por uma hora com agitações em vortex a cada 10 minutos. Após este período a amostra foi sonicada por 1 minuto com sonificador de ponta sob uma potência de 240 W. Esta emulsão foi centrifugada a 13.000 x g por 30 minutos para a separação das microesferas lipídicas.

A amostra resultante desta preparação, após a centrifugação, mostrou-se não homogênea apresentando uma fase oleosa de cor branca leitosa na superfície da amostra o que sugere a presença de uma emulsão. Uma alíquota desta emulsão foi tomada e observada em microscópio ótico onde foi visualizada a presença de gotículas translúcidas que são características de microgotas de óleo e não a formação de microesferas lipídicas, as quais aparecem como partículas opacas.

Com o intuito de minimizar a agregação e estabilizar estes sistemas passamos a gotejar a preparação descrita acima em 10 mL de álcool polivinílico 1 % (p/v), sob agitação vigorosa, utilizando o equipamento Ultra Turrax. Esta primeira emulsão foi então gotejada em 150 mL de álcool polivinílico 0,1 % (p/v) sobre igual agitação vigorosa, até formação da segunda

emulsão. Finalmente, a emulsão resultante foi centrifugada a 13.000 x g por 30 minutos.

Também para esta nova formulação foi observada a fase emulsificada na superfície da amostra, indicando mais uma vez que esta metodologia também não foi a mais adequada para a formação das microesferas lipídicas.

Uma vez que a fase emulsificada não é possível de ser separada por centrifugação, modificamos a metodologia para a filtração a vácuo em membranas Amicon YM-3. Porém, durante o processo a fase oleosa adsorveu na membrana obstruindo seus poros e impedindo assim a filtração da amostra.

Visto que os protocolos anteriores não resultaram nas microesferas lipídicas, elaboramos uma outra metodologia de montagem das microesferas, desta vez unindo e adaptando 2 métodos descritos na literatura, conforme descrito em Materiais e Métodos item 3.20.

As amostras resultantes para este novo protocolo se apresentaram homogêneas, com aparência turva característica de uma suspensão de micropartículas.

Para os estudos referentes à composição em PVA mais adequada para a produção das microesferas lipídicas, foram testadas várias concentrações deste polímero: 0,01, 0,05, 0,1, 1 e 3 % (p/v). Para as formulações onde foram empregadas concentrações de PVA em 0,01, 0,05 e 0,1 % (p/v) não foram observadas, através de MEV, a formação das microesferas, mas sim de tramas ao acaso formadas pelo PVA polimerizado (Figura 15).

Quando utilizamos na preparação o PVA 1 % (p/v), já foi possível observar algumas formações vesiculares, porém associadas às tramas de PVA polimerizado ao acaso, formando uma espécie de malha polimérica (Figura 16).

Já, na micrografia eletrônica obtida por MEV para concentrações de PVA de 3 % (p/v), as tramas que antes estavam presentes quando eram usadas concentrações menores de PVA não aparecem mais e, em seu lugar pode-se observar estruturas esféricas bem definidas, características das microesferas lipídicas recobertas por PVA (Figura 17).

Portanto, dentre as diversas concentrações de PVA testadas, a formulação que resultou em uma suspensão característica de microesferas foi quando utilizamos para a preparação da segunda emulsão uma solução de PVA 3 % (p/v).

Figura 15 – Micrografia obtida pela microscopia eletrônica de varredura da formulação desenvolvida para construção de sistemas de microesferas lipídicas conforme descrito no item 3.20 de Materiais e Métodos variando-se a concentração de PVA (p/v): **(A)** 0,01 %; **(B)** 0,05 %; **(C)** 0,1 %.

Figura 16 – Micrografia obtida pela microscopia eletrônica de varredura da formulação de microesferas lipídicas desenvolvida conforme descrito no item 3.20 de Materiais e Métodos utilizando-se PVA 1 % (p/v). A barra corresponde a 5 μm .

Figura 17 – Micrografia eletrônica obtida pela microscopia eletrônica de varredura da preparação de microesferas lipídicas utilizando-se PVA 3% (p/v) conforme descrito no item 3.20 de Materiais e Métodos. A barra corresponde a 5 μm .

4.9.2 – Microesferas lipídicas contendo proteínas antigênicas da membrana da *P. multocida* (microcapsulas)

Prevendo a necessidade de uma solução protéica livre de detergente para a posterior construção destes sistemas de microcapsulas com proteínas antigênicas encapsuladas, padronizamos uma metodologia para a remoção do detergente (SDS 1 % p/v) empregado para a solubilização das proteínas antigênicas da bactéria.

Para tal, foram realizados testes de remoção do SDS utilizando-se a resina Calbiosorb[®], uma vez que já se conhece a sua eficiência na remoção do detergente durante a formação dos proteolipossomos pelo método da co-solubilização.

Assim, foram realizados dois testes: no primeiro utilizamos uma proporção de 200 mg/mL de resina, já que esta quantidade de resina é utilizada durante a obtenção dos proteolipossomos. Os resultados apresentaram uma remoção final de 99,4 % do detergente após 4 horas de tratamento, com uma troca de resina após 2 horas, e uma perda final em proteína de 24 %. No segundo teste, a quantidade de resina foi ajustada proporcionalmente à concentração de detergente a ser removida, para eliminar o excesso de resina e minimizar a perda de proteína, utilizamos 62 mg de Calbiosorb[®] para cada 1 mL de extrato bruto solubilizado a ser tratado. Ao final das 2 primeiras horas de tratamento obteve-se uma remoção de 76,3 % do SDS e nenhuma perda de proteína. Neste ponto, a resina foi trocada e a amostra tratada por mais 2 horas, como resultado final, observou-se uma remoção de 98,7 % e uma perda final de proteína de 8 %.

Além disso, segundo a nossa metodologia, a mistura lipídio:proteína deve ser sonicada, o extrato bruto solubilizado livre de detergente também foi submetido ao mesmo procedimento (controle). A eletroforese desta amostra sonicada revelou que não houve o aparecimento de novas bandas protéicas indicando que o tratamento não leva a perda do padrão eletroforético inicial, bem como processos de proteólise (resultados não mostrados).

Para a obtenção das microesferas lipídicas constituídas das proteínas antigênicas, foi utilizada a mesma relação proteína:lipídio ideal para a formação dos proteolipossomos, portanto durante a preparação do sistema, o tampão Tris-HCl 5mmol.L⁻¹ pH 7,5 foi substituído pelo extrato bruto solubilizado, livre

de detergente, em quantidade suficiente para obtermos uma relação proteína:lipídio (1:10 p/p).

A micrografia obtida pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) apresentada na Figura 18, mostra a presença de microesfera formada a partir da formulação contendo proteínas antigênicas. A microscopia eletrônica revela a formação de uma população polidispersa, apresentando um tamanho médio de 15 μm .

Além disso, também podemos observar que as microesferas obtidas são sensíveis ao calor, pois quando foi utilizada uma potência de 25 kV para a realização da MEV foi possível observar durante a documentação das imagens no microscópio, que a microesfera se degradava mostrando rachaduras na sua superfície (Figura 19). Isto se dá devido ao aquecimento que ocorre no porta-amostra pelo bombardeamento de elétrons durante o processo de MEV. Para evitarmos esta degradação durante a análise, diminuimos a potência do feixe de elétrons para 10 kV, resultando em uma diminuição no aquecimento do porta amostra.

A fim de determinarmos se as proteínas antigênicas estavam encapsuladas na microesfera, submetemos o EBS ao processo de marcação com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC), o qual se liga aos grupamentos amino dos resíduos laterais e terminais presentes nas proteínas.

Inicialmente, a marcação de proteína com FITC, conforme descrito no item 3.21 de Materiais e Métodos, foi realizada na presença do detergente utilizado na solubilização das proteínas antigênicas das frações de membranas (SDS 1 % p/v). Para esta amostra o procedimento não resultou na marcação das proteínas, muito provavelmente devido à solvatação da proteína pelo SDS. Removemos o SDS do extrato bruto solubilizado através do tratamento com Calbiosorb[®] e submetemos esta amostra ao processo de marcação. Novamente, não obtivemos êxito, pois após a eletroforese sob condições desnaturantes não foi possível a visualização de bandas protéicas fluorescentes durante a iluminação com luz ultravioleta.

Para verificarmos se a metodologia empregada para marcar as proteínas apresentava algum problema, realizamos um controle utilizando a proteína soro albumina bovina (BSA) fixando as mesmas condições usadas para o ensaio com o EBS e, obtivemos resultado positivo para a marcação com

Figura 18 – Micrografia eletrônica obtida pela microscopia eletrônica de varredura da preparação de microesferas lipídicas contendo as proteínas antigênicas conforme descrito no item 3.20 de Materiais e Métodos. A barra corresponde a 5 µm.

Figura 19 – Micrografia eletrônica de varredura da preparação de microesferas lipídicas obtida conforme descrito em Materiais e Métodos. A barra corresponde a 5 µm.

o fluoróforo (resultados não mostrados), indicando que o procedimento não apresenta falhas que pudessem comprometer a marcação, portanto nossas proteínas não havia sido marcadas provavelmente devido a alguma dificuldade no acesso aos grupamentos amino pelo fluoróforo.

Para disponibilizar os grupos amino das proteínas e então proporcionar um maior acesso do fluoróforo, foi adicionada uréia 7 moles.L⁻¹ em uma amostra de EBS na ausência de detergente. De fato, este tratamento possibilitou a marcação das proteínas as quais ficaram visíveis no topo do gel de eletroforese sob condições desnaturantes (resultados não mostrados).

Quando estas proteínas marcadas com FITC foram adicionadas a formulação de microesferas foi possível verificar por microscopia de fluorescência a presença de esferas fluorescentes (Figura 20) indicando êxito na encapsulação das proteínas antigênicas no interior da microesfera lipídica.

Testes para a determinação da quantidade de proteínas encapsuladas na microesfera lipídica foram realizados através de dosagens de proteínas pelo método de Read e Northcode, conforme descrito no item 3.4 de Materiais e Métodos, e foi verificado que quando utilizamos 11,3 mg de DPPC e 29,2 mg de óleo de soja tem-se um rendimento de encapsulação de 25 %, enquanto para as preparações onde a quantidade de lipídios do sistema foi dobrada, ou seja, foram ressuspensos 58,4 mg de óleo de soja e 22,6 mg de DPPC em 10 mL de tampão Tris-HCl 5 mmol.L⁻¹, pH 7,5, o rendimento de incorporação das proteínas aumentou consideravelmente, passando para 99%.

Figura 20 – Imagem obtida por microscopia de fluorescência das microesferas lipídicas contendo proteínas antigênicas marcadas com isotiocianato de fluoresceína conforme descrito em Materiais e Métodos. Aumento de 400 X.

5 – Discussão

5.1 – Obtenção e caracterização dos proteolipossomos

O uso de vacinas para a prevenção de infecções microbianas é uma alternativa preferencial ao tratamento quimioterapêutico. Contudo, vacinas feitas de organismos atenuados, ainda que eficazes na produção de diversas e persistentes respostas imunes por mimetizar infecções naturais, geralmente sem a doença, podem ter certas desvantagens. Por exemplo, há um risco da reversão durante a replicação de organismos vivos ou mesmo mutação para um estado mais patogênico e comprometimento no sistema imune do indivíduo. Alguns dos microrganismos atenuados podem ainda provocar a doença. Por outro lado, embora a localização extracelular de vacinas de microrganismos mortos e sua subsequente fagocitose pelas células apresentadoras de antígenos ou pelas células B antígeno-específicas, essas vacinas induzem à apresentação restrita de MHC classe II, para células T *helper* e imunidade humoral. Outrossim, eles não incitam significativamente respostas de linfócitos T citotóxicos. Infelizmente, vacinas peptídicas ou de subunidades produzidas recombinantemente ou sinteticamente (consideradas mais seguras), são fracos imunógenos e freqüentemente não são hábeis em induzir uma resposta imune apropriada. Para tal, uma grande variedade de adjuvantes imunológicos, agora disponíveis, como os lipossomos, tem a propriedade de transformar estas vacinas em mais fortes e mais eficientes (Gregoriadis et al., 2002).

O mecanismo de formação dos proteolipossomos é complexo e extremamente importante na correta reconstituição da proteína na membrana lipídica. Quatro técnicas principais para a reinserção da proteína na membrana artificial podem ser encontradas na literatura (Banerjee e Datta, 1983; Gennis, 1989; Silvius, 1992; Yeagle, 1993; Rigaud et al., 1995, 1998, 2002). A reconstituição mediada por solventes orgânicos pode ser realizada através de evaporação do solvente da mistura proteína-lipídeo seguida de reidratação com tampão ou pelo método de evaporação por fase reversa. No entanto, a utilização destas técnicas para o estudo de proteínas de membranas é limitada, pois requer a exposição destas proteínas a solventes orgânicos, levando-as com freqüência à desnaturação irreversível (Szoka e Papahajopoulos, 1980; Rigaud et al., 1983, 1995, 2002).

Os proteolipossomos também podem ser formados através de métodos mecânicos, onde a sonicação de uma suspensão mista de lipídios e proteína tem sido extensamente empregada (Racker, 1979). As vantagens do método de sonicação são a rapidez e a ausência de detergentes, enquanto que, as desvantagens podem ser a não reprodutibilidade do ensaio, a inativação de algumas proteínas devido ao processo de sonicação, bem como o pequeno diâmetro (20-40 nm) dos proteolipossomos resultantes (Rigaud et al., 1995).

Uma outra técnica alternativa é a incorporação espontânea da proteína de membrana em lipossomos previamente preparados. Entretanto, esta técnica não é freqüentemente empregada com sucesso para proteínas transmembranas, mas somente para proteínas ancoradas e/ou que apresentem pequenos domínios hidrofóbicos. Além disso, a principal desvantagem deste método é a remoção do detergente da amostra protéica antes da incubação com o lipossomo, previamente preparado, que pode favorecer interações proteína-proteína e/ou agregações desfavoráveis (Kihn et al., 1990; Schroeder et al., 1994; Schreirer et al., 1994; Camolezi et al., 2002).

A técnica de co-solubilização é a estratégia de reconstituição de proteínas transmembrana que tem apresentado maior sucesso e, portanto, mais freqüentemente utilizada, principalmente porque a maioria destas proteínas é solubilizada das membranas naturais na presença de detergentes (Helenius e Simons, 1975; Krämer e Heberger, 1986; Rigaud et al., 1988, 1995; Dierks e Krämer, 1988; Gennis, 1989; Silvius, 1992; Levy et al., 1992; Yeagle, 1993; Knol et al., 1998).

A vantagem mais significativa do método de co-solubilização é a sua rapidez, desde que sejam evitados longos períodos de contato entre detergente-proteína-lipídeo, que sejam utilizadas resinas específicas para a remoção do detergente que resultem na obtenção de vesículas homogêneas. Já, a principal desvantagem deste método é a possível perda de quantidades de proteína por interações inespecíficas com a resina durante a remoção do detergente, bem como a obtenção de um sistema misto em relação a orientação da proteína reinserida na membrana (Rigaud et al., 1988, 1995; Dierks e Krämer, 1988; Gennis, 1989; Silvius, 1992; Levy et al., 1992; Knol et al., 1998).

Dentre as diversas metodologias para obtenção de sistemas de

lipossomos e proteolipossomos, descritas acima, adotamos a de co-solubilização, uma vez que as proteínas antigênicas das frações de membrana da *P. multocida* foram solubilizadas com detergente e a remoção prévia do SDS poderia resultar na agregação das proteínas.

A forma como o detergente é removido da mistura parece estar relacionada com o rendimento de incorporação das proteínas nos lipossomos (Figura 2).

O método da diálise apresentou uma baixa remoção de SDS para um tempo muito longo (de 88 h). Além disso, a incorporação das proteínas constituintes no extrato bruto solubilizado em lipossomos de DPPC por este método apresentou um baixo rendimento, de cerca de 10 %. Um dos fatores que colaboraram para a baixa taxa de incorporação possivelmente seja a grande quantidade de detergente residual na amostra, além do grande tempo necessário para o processo (Figura 2).

O método para remoção de detergente que tem sido empregado com grande sucesso é a adsorção seletiva do detergente em resinas hidrofóbicas (Haaker e Racker, 1979; Gennis, 1989; Silvius, 1992; Rigaud et al., 1995, 1998).

Este método remove, seletivamente, o detergente na sua forma monomérica, a qual é rápida e eficientemente seqüestrada pela resina, quando ela se encontra em contato direto com a mistura lipídeo-proteína-detergente. Entretanto, na prática, uma quantidade significativa de proteína e/ou lipídeo podem ser também adsorvidas durante a reconstituição. Este problema pode ser muitas vezes minimizado, com modificações na relação resina:detergente e no tipo de resina, detergente e lipídeo empregados ou pela exposição da mistura a curtos e repetidos intervalos de tempo (Ueno et al., 1984; Krämer e Heberger, 1986; Levy et al., 1990a, 1990b; Rigaud et al., 1988, 1995, 1998; Silvius, 1992).

A utilização de uma resina não adequada para a remoção do detergente da mistura lipídeo-proteína-detergente causa obstáculos na reconstituição das proteínas em lipossomos. Este efeito pode ser observado neste trabalho, quando se empregou a resina Biobeads®, que levou a uma boa remoção do SDS detergente (90 %), porém também resultou em baixa reconstituição das proteínas (de aproximadamente 3 %).

Já, a resina Calbiosorb[®] mostrou-se mais adequada para a remoção do detergente da mistura muito provavelmente pelo fato de possuir um maior diâmetro das esferas que permite, nas condições empregadas, praticamente a completa remoção do SDS e, conseqüentemente um rendimento de incorporação das proteínas de 93 %.

Além disso, a velocidade de remoção do detergente pode ser crucial na formação dos proteolipossomos, sendo que em remoções lentas a formação das vesículas pode preceder a incorporação da proteína na bicamada e, quando são utilizadas remoções rápidas do detergente, a incorporação da proteína ocorre durante a formação da vesícula (Eytan, 1982; Rigaud et al., 1995). Assim, a utilização de várias trocas de quantidades de resina, pode permitir a eliminação de detergente residual, bem como de micelas binárias mistas, proteínas e lipídios livres presentes na formação final dos proteolipossomos (Levy et al., 1990a, 1990b; Rigaud et al., 1995).

A eletroforese das proteínas constituintes dos proteolipossomos indicou que todas as proteínas presentes no extrato bruto solubilizado foram incorporadas nos lipossomos de DPPC não evidenciando predileção do sistema por uma ou outra proteína específica (Figura 1A linha 2).

O *Western Blotting* das proteínas reconstituídas nos proteolipossomos mostrou a manutenção da integridade antigênica destas proteínas, o que foi de extrema importância para a sua posterior aplicação (Figura 1B linha 2). Além disso, o processamento dessas proteínas, como a obtenção das frações de membrana, a solubilização das proteínas destas frações e a reconstituição destas proteínas em lipossomos, não prejudicaram a interação antígeno anticorpo.

A microscopia eletrônica da Figura 5 mostrou proteolipossomos bem caracterizados que apresentam diâmetros ao redor de 200 nm, que são semelhantes aos encontrados por outros autores que usam metodologia similar para a preparação dos sistemas biomiméticos (Parmar et al., 1999).

Uma vez verificada a viabilidade de incorporação do pool de proteínas em lipossomos pelo método de co-solubilização, passamos a realizar estudos da composição em fosfolipídios do sistema: (i) variando a natureza da cabeça polar do fosfolipídio e fixando o número de átomos de carbono das cadeias acil,

e; (ii) fixando a cabeça polar com o melhor rendimento de incorporação das proteínas e variando o número de átomos de carbono da cadeia acil.

Uma vez que todos os fosfolipídios testados, DPPG, DPPS, DPPA, DPPE e DPPC, têm 2 cadeias hidrocarbônicas com 16 átomos de carbono, nossos experimentos indicam uma preferência seletiva para o grupo cabeça polar fosfatidilcolina do fosfolipídio, comparado ao outro fosfolipídio zwitteriônico estudado (DPPE). Além disso, a incorporação foi muito menor para os fosfolipídios com grupos cabeça polares carregados negativamente.

A Tabela I mostra a variação da porcentagem de proteína incorporada como uma função do número de átomos de carbono das cadeias acil dos fosfolipídios, o máximo sendo alcançado para DPPC tendo cadeias hidrocarbônicas com 16 carbonos, e a incorporação das proteínas decresce quando reconstituída com fosfolipídios de cadeias mais longas. É bastante conhecido que o comprimento das cadeias hidrocarbônicas dos fosfolipídios, bem como o tipo de grupo cabeça polar tem uma profunda influência no estado de fase da bicamada em uma temperatura particular; por outro lado, é também bem conhecido que proteínas geralmente mostram uma partição preferencial em fases líquido cristalinas, devido ao melhor emparelhamento e compensação dos defeitos laterais requeridos para incorporação do volume das moléculas protéicas na bicamada, comparado ao estado de fase gel (Cevc e March, 1987). Nós incluímos na Tabela I as temperaturas para a principal transição de fase gel-líquido cristalino dos fosfolipídios utilizados. Nenhuma simples correlação emerge tomando-se em consideração a temperatura de transição de fase dos fosfolipídios em questão.

Tem sido mostrado que o comprimento e possibilidades para desordem configuracional das cadeias hidrocarbônicas, em relação ao tamanho da cabeça polar, hidratação e repulsão de cargas no grupo cabeça polar influenciam marcadamente a topologia e a curvatura espontânea do auto-arranjo da estrutura lipídica em meio aquoso (Israelachvili et al., 1980; Carrer e Maggio, 2001). Estes efeitos são exercidos através do comprimento da cadeia carbônica e volume ótimo da área seccional dos fosfolipídios. Uma combinação geométrica da sua influencia é resumido nos parâmetros de empacotamento crítico o qual permite calcular teoricamente o raio de curvatura crítico espontâneo (mínimo) da bicamada da vesícula (Israelachvili et al., 1980). A

Tabela I mostra ambos o diâmetro espontâneo mínimo calculado e o medido experimentalmente para as vesículas lipídicas (lipossomos e proteolipossomos) estudados. Novamente, nenhuma correlação simples é aparente para uma série homóloga de fosfatidilcolinas. O diâmetro experimental encontrado para o DPPC é similar ao calculado e coincidentemente o rendimento de incorporação para este fosfolipídio é o maior.

Os diâmetros calculados representam um limite mínimo permitido pela geometria molecular e valores menores não são possíveis devido ao aumento de tensões transversais e laterais (Cevc e March, 1987). Em concordância com isto, os valores medidos experimentalmente são similares aos valores calculados somente para os lipossomos maiores (DPPC, DSPC), mas são muito maiores no caso de lipossomos menores (DLPC, DMPC), indicando que todas as vesículas adotam tensões de curvatura mais relaxadas. Para os proteolipossomos o diâmetro se torna ainda maior, refletindo que a incorporação das proteínas requer estruturas maiores.

Todos os dados analisados indicam que proteínas da membrana da *P. multocida* são incorporadas mais favoravelmente em proteolipossomos formados por fosfatidilcolinas tendo cadeias hidrocarbônicas de 14-16 átomos de carbono, com uma preferência clara para DPPC. Isto está provavelmente relacionado ao conceito de emparelhamento hidrofóbico, que controla a partição das proteínas de membrana nas bicamadas, ou regiões de uma bicamada multicomponente, tendo comprimentos complementares ao comprimento de uma meia bicamada; em sistemas binários ou terciários mais simples tem sido mostrado para várias proteínas que fosfatidilcolinas tendo um comprimento de cadeia de 14-16 carbonos, comparado aqueles com cadeias de 18 carbonos, geralmente favorecem a partição de proteínas em seus domínios de fase (Bloom et al., 1991).

Vamos considerar uma fração protéica como a da *P. multocida* com um peso molecular médio de cerca de 37 kDa e assumir um volume específico de proteína de cerca de 0,70-0,76 cm³/g (Creighton, 1993). Isto leva a uma área seccional média da proteína de cerca de 13,9 nm² imersa em um proteolipossomo de DPPC (com lipídio de uma área seccional média de cerca de 0,48 nm², em uma pressão de superfície lateral de 30 mN/m atribuída as bicamadas lipídicas (Cevc e March, 1987). Neste sistema, pode ser calculado

que uma molécula de proteína média requereria cerca de 34 moléculas de lipídios para circundar completamente a vizinhança da proteína inserida perpendicularmente a superfície da membrana.

Por outro lado, o número de moléculas de lipídio e proteínas (considerando as áreas seccionais mencionadas acima) presentes nas vesículas de lipossomo e proteolipossomo, com base nos diâmetros medidos experimentalmente (Tabela I) indicam uma razão lipídio/proteína de cerca de 30. Isto está em concordância com o valor teoricamente calculado e sugere que a incorporação de proteína ocorra até que o limite de saturação de cerca de 30 moléculas de lipídio por proteína seja satisfeito. Para a otimização termodinâmica do auto-arranjo do sistema todos estes fatores agem sinergicamente e é provável que o rendimento obtido para os diferentes lipídios reflitam a combinação das diferentes influências (Israelachvili et al., 1980; Bloom et al., 1991; Carrer e Maggio, 2001).

À parte da clara preferência pelo grupo polar da fosfatidilcolina, parece que o aumento no comprimento da cadeia hidrocarbônica e o diâmetro da vesícula pode progressivamente favorecer a incorporação das proteínas por permitir menor *stress* de curvatura nos proteolipossomos que estão sendo formados. Além disso, o aumento no comprimento da cadeia também traz inevitavelmente um concomitante aumento da largura da bicamada ordenando uma perda da fase líquido-cristalina da bicamada na mesma temperatura, a qual deveria desfavorecer a incorporação das proteínas (Sackman, 1995), como ocorre para DSPC (Tabela I).

Uma correlação entre o diâmetro das vesículas e o tamanho da cadeia de ácido graxo é aparente. Além disso, é importante enfatizar que o diâmetro médio dos proteolipossomos é maior que o os lipossomos livres de proteína o que pode explicar o fato das densidades do lipossomo e do proteolipossomo serem similares, sugerindo que a incorporação das proteínas induz um aumento proporcional da dimensão da vesícula. Isto foi confirmado pelo espalhamento de luz dinâmico, mostrando que os proteolipossomos constituídos por DPPC tem um diâmetro médio de 1.850 Å, comparado a 1.430 Å das vesículas de DPPC puras.

5.2 – Obtenção das microesferas lipídicas

Dentre os diversos protocolos para obtenção de microesferas lipídicas testados neste trabalho, sem dúvida o mais adequado foi aquele em que na formulação o álcool polivinílico (PVA) foi utilizado, devido a sua característica de estabilizar microesferas lipídicas. De fato, este procedimento resultou em uma preparação aparentemente homogênea e estável. Este protocolo é a união e adaptação de duas metodologias descritas na literatura (Asai e Watanabe, 1999; Hilbert et al., 1999).

As primeiras imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) desta formulação mostraram a presença de tramas provavelmente provenientes da polimerização do PVA junto com estruturas esféricas indicando uma possível formação de algumas micropartículas. Frente a estes resultados estava claro que devíamos investigar os componentes desta suspensão para obtermos melhores resultados.

O estudo da concentração de PVA presente na formulação mostrou que a concentração ideal de PVA é de 3 % (p/v) para a obtenção de microesferas lipídicas. As imagens obtidas por MEV para as microesferas lipídicas na ausência ou na presença de proteínas (Figuras 17 e 18, respectivamente) revelam a presença de estruturas esféricas bem definidas, características das microesferas lipídicas recobertas por PVA (Hilbert et al., 1999; Dinarvand et al., 2002; Bouissou et al., 2004) e a ausência das tramas poliméricas encontradas (nas imagens de microscopia) que antes eram observadas nas formulações com menores concentrações de PVA, 0,01, 0,05, 0,1 e 1 % (p/v) (Figura 15 e 16).

Podemos observar nas imagens obtidas por MEV para formulações com menores concentrações de PVA a formação de uma espécie de trama, provavelmente referente à polimerização do PVA. Associadas a elas é possível observar também a formação de algumas regiões onde a trama é mais fina e presa a estruturas relativamente esféricas que possivelmente possam estar relacionadas as microcapsulas preparadas por esta formulação (Figura 16). Isto está baseado em observações de imagens de microscopia eletrônica de PVA (dados não mostrados), onde somente encontram-se fibras muito próximas e mais organizadas semelhando-se às fibras de um tecido.

Provavelmente, esta organização não ocorre nas formulações devido à desorganização provocada pela fase oleosa (lipídeo e óleo).

Quando utilizamos concentrações de PVA de 0,01 0,05, 0,1 e 1% (p/v) não tínhamos na formulação quantidade suficiente do polímero para que pudéssemos alcançar um balanço adequado da relação lipídio:polímero necessária para a formação de microcápsulas. Devido a isto, obtínhamos apenas tramas de PVA ao acaso e não uma estrutura organizada referente a microesferas. De fato, as imagens de microscopia eletrônica (Figuras 15 e 16) indicam que não houve formação de micropartículas para as preparações realizadas com menores concentrações de PVA (Hu et al., 2002).

Com o intuito de verificarmos se as proteínas antigênicas da P. multocida eram encapsuladas durante a formação das microesferas lipídicas, estas proteínas foram marcadas com o agente fluorescente FITC.

Quando estas proteínas marcadas com FITC foram adicionadas a formulação de microesferas foi possível verificar por microscopia a presença de estruturas fluorescentes (Figura 20) indicando êxito na encapsulação das proteínas antigênicas no interior da microesfera lipídica. Resultados semelhantes foram encontrados por Sun e colaboradores (2003) para proteínas marcadas com FITC encapsuladas em microesferas poliméricas.

A análise da concentração de lipídios presentes na formulação das microesferas lipídicas contendo as proteínas antigênicas revelaram que quando foram utilizados 11,3 mg de DPPC e 29,2 mg de óleo de soja, a encapsulação o rendimento de encapsulação das proteínas foi de aproximadamente 25 % enquanto para as formulações nas quais a concentração de lipídios foi dobrada, o rendimento de encapsulação aumentou para cerca de 99 %.

Estes dados de rendimento de encapsulação das proteínas nas microesferas pode ser um indicativo de que nas menores quantidades de lipídios utilizadas na formulação não era possível a formação de um *bulk* oleoso dentro da microesfera que fosse capaz de acomodar adequadamente as proteínas hidrofóbicas em questão.

A análise conjunta dos dados apresentados indica que a formulação de um sistema de proteolipossomo é dependente da natureza das proteínas que queremos encapsular. Para o *pool* de proteínas antigênicas estudadas, o fosfolipídio mais adequado, apresentando um alto rendimento de incorporação,

preparações homogêneas, sem a presença de agregados lipídio:proteína ou proteína:proteína foi o DPPC.

Além disso, os estudos referentes à capacidade de proteção de coelhos imunizados previamente com os proteolipossomos constituídos das proteínas antigênica e DPPC mostraram uma sobrevida de 95 % destes animais contra a pasteurelose, frente ao desafio experimental com a bactéria. Os ensaios de ELISA para a detecção de anticorpos mostram que animais imunizados com o proteolipossomo apresentam elevados níveis séricos de IgG e IgM e também de anticorpos IgA, presentes na secreção nasal dos animais. Estes resultados indicam que a proteção dos animais contra a pasteurelose pode estar associada à produção de IgG e IgM antes da infecção experimental e, à rápida produção destas classes de anticorpos após a infecção experimental.

A formulação para a obtenção das microesferas lipídicas foi padronizada mostrando que a metodologia desenvolvida produz estruturas esféricas recobertas por PVA com um diâmetro médio de 15 μ m, caracterizado por MEV. Além disso, foi possível obter uma formulação que encapsula cerca de 99 % das proteínas presentes no EBS.

Os estudos de imunização com as proteínas encapsuladas nas microesferas lipídicas deverão ser realizados, para avaliar seu potencial de imunização dos coelhos contra a pasteurelose.

5.3 – Eficiência de proteção contra a pasteurelose utilizando proteolipossomos

A imunização utilizando o EBS estimula rapidamente uma acentuada produção de IgG específica para *P. multocida* no 7^o dia, enquanto que a produção deste mesmo tipo de anticorpo é menos acentuada no soro de animais imunizados previamente com o proteolipossomo, no mesmo período (Figura 7). No entanto, esta classe de anticorpos parece não ser a única que está diretamente relacionada com a proteção dos animais contra a pasteurelose, pois frente ao desafio experimental os animais imunizados com o EBS, que apresentam elevados níveis de IgG, morreram 10 dias após a infecção enquanto que os animais imunizados com o sistema de proteolipossomos apresentaram uma sobrevida de 95 % (Figura 13).

Além disso, os animais imunizados com proteolipossomos e desafiados com 10^5 ufc da bactéria apresentam uma estimulação da produção de IgG maior e mais rapidamente que a observada no soro de animais imunizados previamente com EBS, sugerindo fortemente que a vacinação com proteolipossomos é eficiente para geração de células de memória (Figura 12).

Os ensaios de ELISA para a detecção de anticorpos IgM específico para *P. multocida* mostraram que esta classe de anticorpos é significativamente mais estimulada em soro de animais imunizados previamente com os proteolipossomos quando comparado com aqueles imunizados com EBS (Figura 9). Além disso, os níveis de anticorpos IgM se mantêm constantes durante os 21 dias prévios do desafio experimental.

Após a infecção experimental os níveis séricos de IgM para os animais imunizados com proteolipossomos continuaram sendo estimulados, permanecendo elevados, enquanto que os animais vacinados previamente com EBS apresentam um decaimento dos níveis séricos de IgM (Figura 12). Estes dados indicam que os animais vacinados com proteolipossomos ao serem desafiados com a bactéria, induzem tanto células de memória (células primadas), bem como, estimulam células B recém diferenciadas produtoras de IgM (células não-primadas).

Estes resultados sugerem fortemente que o grau de proteção em animais imunizados com proteolipossomos está correlacionado com o fato destes animais manterem elevados níveis séricos de IgM específicos após a infecção.

Nossos dados indicam a ausência de anticorpos IgA séricos em animais imunizados com o proteolipossomos (Figura 11), porém é notado um significativo aumento nos níveis de IgA presentes no lavado nasal destes animais após a infecção experimental (Figura 14).

Estes resultados associados aos de sobrevivência dos animais indicam que os níveis de IgA da cavidade nasal estão agindo na prevenção da adesão e colonização da *P. multocida* no trato respiratório, conforme sugerido por Suckow et al. (2002).

Os resultados referentes à atividade imunológica das preparações de antígeno desenvolvidos neste trabalho indicam que a imunização de coelhos com EBS ou proteolipossomo induzem elevados níveis séricos de IgG

específicas para *P. multocida* (Figura 7). Os níveis de anticorpos IgG específicos gerados pelas duas preparações são semelhantes, sugerindo que as frações imunogênicas da *P. multocida* seriam predominantemente de natureza protéica e não polissacarídica. A qualidade da preparação antigênica, no entanto, parece afetar a dinâmica da resposta humoral. Verificamos que a imunização com EBS foi capaz de manter os níveis de IgG específicos elevados por 21 dias após a imunização, enquanto que, a imunização com proteolipossomo foi capaz de manter a elevação de IgG específicos por um período de 14 dias (Figura 7).

A redução nos níveis de IgG específicas após 14 dias em coelhos imunizados com proteolipossomo não indica necessariamente que esta preparação de antígeno seja menos eficiente que o EBS, pois os resultados mostram que a estimulação de anticorpos específicos IgG, IgA e IgM são diferentes para cada uma das formulações utilizadas na imunização.

O fato das preparações com proteolipossomo não manter persistente os níveis de IgG específicas após a imunização, no entanto, não parece afetar sua propriedade vacinal. Pelo contrário, torna esta preparação altamente eficiente para proteção frente à infecção pela *P. multocida* (Figura 13).

Um fato importante é que as preparações de proteolipossomo são capazes induzir um aumento rápido dos níveis de IgG específicas após o desafio com *P. multocida* (Figura 12). Essas observações sugerem que a imunização com preparações de proteolipossomo induzem rapidamente (3 semanas) a geração de células B de memória capazes de produzir rapidamente IgG específicas. A geração de células B e T de memória está diretamente relacionado à utilização racional de vacinas, para prevenção de infecções (Sprent, 1997).

Nossos resultados referentes a avaliação de anticorpos específicos gerados pela vacinação de coelhos com proteolipossomos indica a presença de IgG, IgM e IgA na mucosa, sugerindo que a estimulação de uma resposta humoral seria a responsável pelo grau de proteção elevada de nossa vacina. De fato, a proteção de coelhos contra a pasteurelose promovida pela vacinação com este sistema parece estar relacionada com a produção tanto de IgG, a qual auxilia na fagocitose da bactéria pelas células fagocíticas do sistema imune e na ativação do complemento (Suckow et al., 2002), quanto de IgM,

descrita na literatura como um anticorpo que é bastante estimulado pela infecção com a bactéria (DiGiacomo et al., 1990; Jarvinen et al., 2000) e IgA na cavidade nasal a qual age, principalmente, prevenindo contra a adesão e colonização da bactéria.

O fato de animais imunizados com EBS, que levam a produção elevada de anticorpos IgG não serem capazes de proteger o animal ao desafio com a bactéria poderia ser explicado por várias hipóteses.

Uma possível explicação pelo fato das preparações de EBS não serem eficientes para a proteção do animal frente ao desafio a infecção pela *P. multocida* poderia estar relacionado ao fato destes animais apresentarem altos níveis de IgG específicos no momento que foram desafiados. A IgG específica pode apresentar atividade imunorregulatória inibindo a ativação de células B e células T, bem como, levar a uma exacerbação da resposta imune pela liberação de mediadores, ativação de células fagocíticas e formação de complexos imunes (Casadevall e Pirofski, 2003). Deste modo, os animais imunizados com EBS e desafiados com *P. multocida* poderiam estar morrendo devido a uma imunossupressão causada pela IgG que tornam estes animais susceptíveis a infecção, ou ainda por causar um quadro imunopatológico de hipersensibilidade. De fato, os animais imunizados com EBS e desafiados com *P. multocida* morreram apresentando sintomatologia típica de um quadro grave da infecção, como secreção acentuada das vias aéreas superiores, lesões purulentas no tecido pulmonar e um quadro final de septicemia hemorrágica bastante típica, indicando que os animais morreram devido a um quadro de hipersensibilidade. Este fenômeno não estaria ocorrendo em animais vacinados com proteolipossomos, pois, como verificado, os níveis de IgG são inferiores aos encontrados em animais vacinados com EBS (Figura 7).

Uma outra explicação possível seria a geração de uma resposta imune humoral não protetora (Th2) em animais imunizados com EBS. Em vários modelos humanos e em camundongos, a estimulação do sistema imune com proteínas solúveis leva predominantemente a geração de resposta imune humoral, com estimulação predominante de células Th2 produtoras de IL-4, que levam a produção predominante de anticorpos IgG1 capazes de opsonizar antígenos para fagocitose, porém, incapazes de fixar complemento. Por outro lado, proteolipossomos levam predominantemente a geração de resposta

imune humoral, com estimulação predominante de células Th1 produtoras de IFN- γ , que levam a produção predominante de anticorpos IgG2a capazes de opsonizar antígenos para fagocitose e serem excelentes para ativação do sistema complemento (Aramaki et al., 1995).

Infelizmente, no modelo de coelhos esta hipótese não pode ser avaliada já que não existem métodos para distinguir os isotipos de IgG, ou, as citocinas interleucina 4 e interferon γ . No entanto, esta hipótese não pode ser descartada e poderá ser respondida em ensaios de vacinação de camundongos com EBS e proteolipossomos, que serão realizados brevemente.

Por fim, uma outra possibilidade seria porque a imunização com EBS não leva a produção de IgM, que está aumentada em animais vacinados com proteolipossomos e IgA de mucosa, que estão presentes também em animais imunizados com proteolipossomos (Figuras 9 e 14). A IgA encontrada em animais vacinados com EBS está localizada no soro, local onde este isotipo de anticorpo não seria eficiente para induzir proteção.

Os animais imunizados com os proteolipossomos e que sobreviveram ao primeiro desafio com a *P. multocida* foram observados durante 140 dias, e ao final deste período estes animais foram novamente infectados experimentalmente. Todos os animais sobreviveram à nova infecção. Estes resultados sugerem que o sistema de lipossomo carreador de proteínas antigênicas da *P. multocida* desenvolvido neste trabalho é capaz de incitar memória imunológica persistente. Embora não tenhamos realizado testes de toxicidade da nossa vacina, nenhum dos animais vacinados morreu durante o acompanhamento experimental, sugerindo assim que ela é segura.

Estes resultados em conjunto, indicam que a vacina de proteolipossomo desenvolvido neste trabalho é segura e, quando administrada em dose única, gera um grau de proteção eficiente e persistente, avalizando a possibilidade do seu uso para fins comerciais.

6 – Bibliografia

Adler, B.; Bulach, D.; Chunf, J.; Doughty, S.; Hunt, M.; Rajakumar, K.; Serrano, M.; van Zanden, A.; Zhang, Y. and Ruffolo, C. (1999) Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. J. Biotechnol. **73**: 83-90.

- Adler, B.; Chancellor, R.; Homchampa, P.; Hunt, M.; Ruffolo, C.; Strugnelli, R. and Wapling, D. (1996) Immunity and vaccine development in *Pasteurella multocida* infections. J. Biotechnol. **44**: 139-144.
- Alexanderson, S. (1996) Advantages and disadvantages of using live vaccines. Risks and control measures. Acta Vet. Scand. Suppl. **90**: 89-100.
- Alving, C.R. (1991) Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. J. Immunol. Methods **140**: 1-13.
- Amons, R. and Schrier, P.I. (1981) Removal of sodium dodecyl sulfate from proteins and peptides by gel filtration. Anal. Biochem. **116**: 439-443.
- Andersen, J.P.; Le Maire, M.; Kragh-Hansen, U.; Champeil, P. and Moller, J.V. (1983a) Perturbation of the structure and function of a membranous Ca^{2+} -ATPase by non-solubilizing concentrations of a non-ionic detergent. Eur. J. Biochem. **134**: 205-214.
- Andersen, J.P.; Skriver, E.; Mahrous, T.S. and Moller, J.V. (1983b) Reconstitution of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase with excess lipid dispersion of the pump units. Biochim. Biophys. Acta **728**:1-10.
- Anholt, R.; Lindstrom, J. and Montal, M. (1981) Stabilization of acetylcholine receptor channels by lipids in cholate solution and during reconstitution in vesicles. Biol. Chem. **256**: 4377-4387.
- Aprile, M.A.; Wardlaw, A.C. (1966) Aluminium compounds as adjuvants for vaccine and toxoids in man. Can J Public Health **57**: 343-354.
- Aramaki, Y.; Suda, H.; Tsuchiya, S. (1995) Interferon- γ inductive effect of liposomes as an immunoadjuvant. Vaccine **13**: 1809-1814.
- Asai, Y.; Watanabe, S. (1999) Interaction of sesame oil with soybean phosphatidylcholine and their formation of small dispersed particles. J. Microencapsul. **16**: 705-713.
- Banerjee, R.K. and Datta, A.G. (1983) Proteoliposome as the model for the study of membrane-bound enzymes and transport proteins. Mol. Cell. Biochem. **50**: 3-15.
- Bangham, A.D. (1993) Liposomes: The Babraham connection. Chem. Phys. Lipids **64**: 275-285.
- Bangham, A.D.; Standish, M.M. and Watkins, J.C. (1965) Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J. Mol. Biol. **13**: 238-252.
- Bier, O.G (1985) em "Microbiologia e Imunologia" (São Paulo – Melhoramentos)

24^a edição.

- Bloom, M.; Evans, E., Mouritsen, O.G. (1991) Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q. Rev. Biophys.* **24**: 293-397.
- Bohren, C.F. and Huffman, D.R. (1983) Absorption and scattering of light from small particles. Wiley Interscience.
- Bouissou, C.; Potter, U.; Altroff, H.; Mardon, H and van der Walle, C. (2004) Controlled release of the fibronectin central cell binding domain from polymeric microspheres. *J. Control. Release* **95**: 557-566.
- Boyce, J.D., Chung, J.Y. and Adler, B. (2000) *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *J. Biotechnol.* **83**: 153-160.
- Broden, K.A. (1980) Physiological and serological characteristics of 48 *Pasteurella multocida* cultures from rabbits. *J. Clin. Microbiol.* **11**: 646-649.
- Browsersock, T.L.; Martin, S. (1999) Vaccine *delivery* to animals. *Adv Drug Deliv Rev* **38**: 167-194.
- Cajavec, S.; Savic, G.; Cizelj, A.; Bidin, Z., Pokric, B. (1997) The primary chicken vaccination against Newcastle disease with antigenic virus subunits prepared in a water-in-oil-in-water emulsion. *Peredicum Biologorum* **99**: 39-44.
- Calarota, S.; Bratt, G.; Nordlund, S.; Hinkula, J.; Leandersson A.C.; Sandstrom, E.; Wahren, B. (1998) Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* **351**: 1320-1325.
- Camolezi, F. L., Daghashtanli, k. R. P., Magalhães, P. P., Pizauro, J. M., Ciancaglini, P. (2002) Construction of an alkaline phosphatase-liposome system: a tool for biomineralization study. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**: 1091-1101.
- Carey, M.C. and Small, D.M. (1972) Micelle formation by bile salts. Physical-chemical and thermodynamic considerations. *Arch Intern Med* **130**: 506-27.
- Carrer, D.C.; Maggio, B. (2001) Transduction to self-assembly of molecular geometry and local interactions in mixtures of ceramides and ganglioside GM1. *Biochim. Biophys. Acta* **1514**: 87-99.
- Carter, G.R. and Bain, R.V.S.(1960) Pasteurellosis (*Pasteurella multocida*): A review stressing recent developments. *Vet. Rev. Anat.* **6**: 105-128.

- Carter, G.R., (1967) Pasteurellosis : *Pasteurella multocida* and *P. haemolytica*. Adv Vet Sci. **11**: 321-368.
- Casadevall, A.; Pirofski, L. (2003) Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. Trends Immunol. **24**: 474-478.
- Cevc, G.; March, D. (1987) In: Phospholipid Bilayers, physical principles and models. Cell Biology: A series of monographs, Bittar E.E. ed., J. Wiley & Sons, pp 347-368.
- Chen, P.S. Jr; Toribara, T.Y. and Warner, H. (1956) Micro-determination of phosphorus. Anal. Chem. **28**: 1756-1768.
- Clarke, C.J.; Stokes, C.R. (1992) The intestinal and serum humoral immune response of mice to systemically and orally administered antigens in liposomes. I. The response to liposome-entrapped soluble proteins. Vet. Immunol. Immunopathol. **32**: 125-138.
- Creighton, T.E. (1993) Proteins, Structures and Molecular Properties. Freeman & Co. New York, pp 267-268.
- Cruickshank, R. (1969) Microbiologia Médica, Pequenos Bastonetes Gram-negativos, 2a. ed. (Trad. Maria Serpa dos Santos). Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, pag 226-230.
- Daghastanli, K. R. P.; Ferreira, R. B.; Thedei Jr.; G.; Ciancaglini, P. (2001) A simple method for immunodetection of membrane-associated proteins. Biochem. Mol. Biol. Educ. **28**, 256 - 260.
- Daghastanli, K.R.P.; Ferreira, R.B.; Thedei Jr., G.; Maggio, B. and Ciancaglini, P. (2004) Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes. Colloids Surf B Biointerfaces **36**: 127-137.
- Daghastanli, K.R.P. (2000) Identificação das proteínas antigênicas da membrana da *Pasteurella multocida* e sua reconstituição em lipossomos. Dissertação de Mestrado apresentada à FFCLRP-USP pp 86.
- De Bortoli, M.; Giunta, C.; Dati, C. and Usseglio, L. (1984) Solubilization and purification of Na,K-ATPase from the outer medulla of rabbit kidney. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. **60**: 71-77.
- Deeb, B.J. (1998) in <http://www.rabbit.org/care/pasteurella.html>
- Deeb, B.J.; DiGiacomo, R.F; Bernard, B.L. and Silbernagel, S.M. (1990) *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. J. Clin Microbiol. **28**: 70-75.

- Dierks, T. and Kramer, R. (1988) Asymmetric orientation of the reconstituted aspartate/glutamate carrier from mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **937**: 112-126.
- DiGiacomo, R.F.; Taylor, F.G.R.; Allen, V. and Hinton, M.H. (1990) Naturally acquired *Pasteurella multocida* infection in rabbits: immunological aspects. *Lab. Anim. Sci.* **40**: 289-292.
- DiGiacomo, R.F.; Xu, Y.M.; Allen, V.; Hilton, M.H. and Pearson, G.R. (1991) Naturally acquired *Pasteurella multocida* infection in rabbits: Clinicopathological aspects. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 234-238.
- DiGiacomo, R.F.; Garlinghouse, L.E. and Van Hoosier, G.L.Jr. (1983) Natural history of infection with *Pasteurella multocida* in rabbits. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **183**:1172-1175.
- Dinarvand, R.; Mirfattachi, S.; Atyabi, F. (2002) Preparation, characterization and in vito drug release of isosorbide dinitrate microspheres. *J. Microencapsul.* **19**: 73-81.
- Duzgunes, N. and Nir, S. (1999) Mechanisms and kinetics of liposome cell-interactions. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **40**: 3-18.
- Edelman, R. (1980) Vaccine adjuvants. *Rev. Infect. Dis.* **2**: 370-383.
- Eytan, G.D. (1982) Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim. Biophys. Acta* **694**:185-190.
- Frost, A.J. and Adler, B. (2000) *Pasteurella multocida*: the elusive determinants of virulence and immunity. *Vet. Microbiol.* **72**, 1-2.
- Furth, A.J. (1980) Removing unbound detergent from hydrophobic proteins. *Anal. Biochem.* **109**: 207-215.
- Furth, A.J.; Bolton, H.; Potter, J. and Priddle, J.D. (1984) Separating detergent from proteins. *Meth. Enzymol.* **104**: 318-328.
- Furuoka, J.; Izumida, N.; Horiuchi, M.; Osame, S.; Matsui, T. (1995) Bovine herpesvirus meningoencephalitis association with infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Vaccine* **90**: 565-571.
- Gennis, R.B. (1989): *Biomembranes: molecular structure and function*. Springer-Yerlag Press, Cantor, C.R.
- Gluck, R. (1995) Liposomal presentation of antigens for human vaccines, in: Powell, M.F.; Newman, M.J. (Eds.), *Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*, Plenum Press, New York, pp. 325-345.

- Gregoriadis, G. (1990) Immunological adjuvants: A role for liposomes. *Immunol. Today* **11**: 89-97.
- Gregoriadis, G. and Florence, A.T. (1993) Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs* **45**: 15-28.
- Gregoriadis, G.; Bacon, A.; Caparros-Wanderley, W.; McCormack, B. (2002) A role for liposomes in genetic vaccination. *Vaccine* **20**: B1-B9.
- Gupta, R.K. (1998) Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **32**: 155-172.
- Gupta, R.K.; Chang, A.C.; Griffin, P.; Rivera, R.; Siber, G.R. (1996) In vivo distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing ¹⁴C-labeled tetanus toxoid. *Vaccine* **14**: 1412-1416.
- Gupta, R.K.; Rost, B.E.; Relyvald, E.; Siber, G.R. (1995) Adjuvant properties of aluminium and calcium compounds, in: Powell, M.F.; Newman, M.J. (Eds.), *Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*, Plenum Press, New York, pp. 229-248.
- Haaker, H. and Racker, E. (1979) Purification and reconstitution of the Ca²⁺-ATPase from plasma membrane of pig erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **254**: 6598-6602.
- Hart, S.L. (2000) Synthetic vectors for gene therapy. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **10**: 199-208.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**: 422-427.
- Helenius, A. and Simons, K. (1975) Solubilization of membrane by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**: 29-79.
- Helenius, A.; McCaslin, D.R.; Fries, E. and Tanford, C. (1979) Properties of detergents. *Method Enzymol.* **56**: 734-749.
- Helenius, A. and Soderlund, H. (1973) Stepwise dissociation of the Semliki Forest virus membrane with Triton X-100. *Biochim. Biophys. Acta* **307**: 287-300.
- Hem, S.L.; White, J.L. (1995) Structure and properties of aluminum containing adjuvants, in: Powel, M.F.; Newman, M.J. (Eds.), *Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach*, Plenum Press, New York, pp. 249-276.
- Hilbert, A.K.; Fritzsche, U.; Kissel, T. (1999) Biodegradable microspheres containing influenza A vaccine: immune response in mice. *Vaccine* **17**: 1065-

1073.

- Hjelmeland, L.M. (1980) A nonderaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 6368-6370.
- Hjelmeland, L.M. and Chramback, A. (1984) in "Membranes, Detergents, and Receptor Solubilization" (J.C. Venter and L.C. Harrison, eds.), p.35. Alan R. Liss, New York.
- Hopkins, B.A.; Olson, L.B. (1997) Comparison of live avirulent PM-1 and CU fowl cholera vaccines in turkeys. *Avian Dis.* **41**: 317-325.
- Hu, F.Q.; Yuan, H.; Zhang, H.H. and Fang, M. (2002) Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol proprionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and its physicochemical characterization. *Int J Pharm* **239**: 121-128.
- Hubbert, W.T., and Rosen, M.N. (1970) II. *Pasteurella multocida* infection due to animal bite. *Am. J. Public Health* **60**: 1103-1108.
- Israelachvili, J.N.; Marcelja, S.; Horn, R.G. (1980) Physical principles of membrane organization. *Q. Rev. Biophys.* **13**: 121-200.
- Jackson, M.L. and Litman, B.J. (1982) " Rhodopsin-phospholipid reconstitution by dialysis removal of octyl glucoside. *Biochemistry* **21**: 5601-5608.
- Jackson, M.L.; Schmidt, C.F.; Lichtenberg, D.; Litman, B.J. and Albert, A.D. (1982) Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. *Biochemistry* **21**: 4576-4582.
- Jarvinen, L.Z.; Hogenesh, H.; Suckow, M.A.; Bowersock, T.L. (2000) Intranasal vaccination of New Zealand white rabbits against pasteurellosis, using alginate-encapsulated *Pasteurella multocida* toxin and potassium thiocyanate extract. *Comp. Med.* **50**: 263-269.
- Jarvisen, L.Z.; Hogenesch, H.; Suckow, M.A. and Bowersock, T.L. (1998) Induction of protective immunity in rabbits by coadministration of inactivated *Pasteurella multocida* toxin and potassium thiocyanate extract. *Infect. Immun.* **66**: 3788-3795.
- Jones, O.T.; Eubanks, J.H.; Earnest, J.P. and McNamee, M.G. (1988) Reconstitution of the nicotinic acetylcholine receptor using a lipid substitution technique. *Biochim. Biophys. Acta* **944**: 359-366.
- Kihn, L.; Rutkowski, D. and Stinson, R. (1990) Incorporation of human liver and

- placental alkaline phosphatases into liposomes and membranes is via phosphatidylinositol. *Biochem. Cell Biol.* **68**: 112-118.
- Kinsky, S.C. and Nicolotti, R.A. (1977) Immunological properties of model membranes. *Annu. Rev. Biochem.* **46**: 49.
- Klausner, R.D.; van Renswoude, J. and Rivnay, B. (1984) Reconstitution of membrane proteins. *Method Enzymol.* **104**: 340-347.
- Knol, J. Sjollem, K. and Poolman B. (1998) Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochemistry* **37**: 16410-16416.
- Koepsell, H. (1986) Methodological aspects of purification and reconstitution of transport proteins from mammalian plasma membranes. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **104**: 65-137.
- Kostarelos, K. and Emfietzoglou, D. (1999) Liposomes as carriers of radionucleotides: from imaging to therapy. *J Liposome Res* **9**: 429-460.
- Krämer, R. and Heberger, C. (1986) Functional reconstitution of carrier proteins by removal of detergent with a hydrophobic ion exchange column. *Biochim. Biophys. Acta* **863**: 289-296.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Levy, D.; Gulik, A.; Seigneuret, M. and Rigaud, J.L. (1990a) Phospholipid vesicle solubilization and reconstitution by detergents. Symmetrical analysis of the two processes using octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether. *Biochemistry* **29**: 9480-9488.
- Levy, D.; Bluzat, A.; Seigneuret, M. and Rigaud, J.L. (1990b) A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochim. Biophys. Acta.* **1025**: 179-190.
- Levy, D.; Gulik, A.; Bluzat, A. and Rigaud, J.L. (1992) Reconstitution of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase: mechanism of membrane protein into liposome during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* **1107**: 283-298.
- Li, S. and Huang, L. (2000) Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther.* **7**: 31-34.
- Lu, Y-S.; Afendis, S.J. and Pakes, S.P. (1988) Identification of immunogenic outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* 3:A in rabbits. *Infect. Immun.* **58**: 1532-1537.

- Lu, Y-S; Lai, W.C.; Pakes, S.P. and Nie, L.C. (1991) A monoclonal antibody against a *Pasteurella multocida* outer membrane protein protects rabbits and mice against pasteurellosis. *Infect. Immun.* **59**: 172-180.
- Luo, Y.J; Shen, H.X.; Liu, H.T. and Kong, D.M. (1998) Studies on drugs absorption using liposome to simulate biomembrane. *Chem. J. Chinese U.* **19**: 1730-1734.
- Marandi, M. and Mittal, K.R. (1995) Identification and characterization of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* serotype D by using monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 952-957.
- Marandi, M.V.; Harel, J. and Mittal, K.R. (1997) Identification by monoclonal antibodies of serotype D strains of *Pasteurella multocida* representing various geographic origins and host species. *J. Med. Microbiol.* **46**: 603-610.
- Matteucci, M.L. and Thrall, D.E. (2000) A role of liposomes in drug delivery and diagnostic imaging: a review. *Vet. Radiol. Ultrasound* **41**: 100-107.
- McCormick, J.I.; Tsang, D. and Jhonstone, R.M. (1984) A simple and efficient method for reconstitution of amino acid and glucose transport systems from *Ehrlich ascites* cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **231**: 355-265
- Mengeling, W.L.; Brockmeier, S.L.; Lager, K.M.; Vorwald, A.C. (1997) The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics (Aujeszky's disease) eradication strategies. *Vet. Microbiol.* **55**: 49-60.
- Mimms, L.T.; Zampighi, G.; Nozaki, Y.; Tanford, C. and Reynolds, J.A. (1981) Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry* **20**: 833-840.
- Nagayasu, A; Uchiyama, K. and Kiwada, H. (1999) The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **40**: 75-87.
- New, R.R.C. (1990) *Liposomes: a practical approach*. Oxford University Press, NY.
- Nicklas, W. (1992) Aluminium salts. *Res. Immunol.* **143**: 489-494.
- O'Hagan, D.T.; Mac Kichan, M.L.; Singh, M. (2001) Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol. Eng.* **18**: 69-85
- Ott, G.; Barchfield, G.L.; Chernoff, D.; Radhakrishnam, R.; Van Hoogevest, P.; van Nest, G. (1995) Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines, in: Powell, M.F.; Newman, M.J. (Eds.), *Vaccine Design, The*

- Subunit and Adjuvant Approach, Plenum Press, New York, pp. 227-296.
- Parmar, M.M.; Edwards, K. and Madden, T.D. (1999) Incorporation of bacterial membrane proteins into liposomes: factors influencing protein reconstitution. *Biochim. Biophys. Acta* **1421**: 77-90.
- Patel, G.B. and Sprott, G.D. (1999) Archaeobacterial ether lipid liposomes (archaeosomes) as novel vaccine and drug delivery system. *Crit. Rev. Biotechnol.* **19**: 317-357.
- Pati, U.S.; Srivastava, S.K.; Roy, S.C. and More, T. (1996) Immunogenicity of outer membrane protein of *Pasteurella multocida* in buffalo calves. *Vet. Microbiol.* **52**: 301-311.
- Peterson, R.R.; Deeb, B.J. and DiGiacomo, R.F. (1997) Detection of antibodies to *Pasteurella multocida* by capture enzyme immunoassays using a monoclonal antibody against P37 antigen. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 208-212.
- Pinto-Alphandary, H.; Andremont, A. and Couvreur, P. (2000) Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**: 155-168.
- Racker, E.; Violand, B.; O'Neal, S.; Alfonzo, M. and Telford, J. (1979) Reconstitution, a way of biochemical research; some new approaches to membrane-bound enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **198**: 470-477.
- Read, S.M. and Northcote, D.H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the Comassie blue G dye-binding assay for protein. *Anal. Biochem.* **116**: 53-64.
- Relyveld, E.H.; Bizzini, B.; Gupta, R.K. (1998) Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. *Vaccine* **16**: 1016-1023.
- Riepl, R.G. and Vidaver, G. A. (1978) Effects of Triton X-100 treatments on the compositions and activities of membrane vesicles from pigeon erythrocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **507**: 97-106.
- Rigaud, J.L. (2002) Membrane proteins: functional and structural studies using reconstituted proteoliposomes and 2-D crystals. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **35**: 753-766.
- Rigaud, J.L.; Bluzat, A.; Buschlen, S. (1983) Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**: 373-382.

- Rigaud, J.L.; Paternostre, M. and Bluzat, A.M. (1988) Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **27**: 2677-2688.
- Rigaud, J.L.; Pitard, B. and Levy, D. (1995) Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. **1231**: 223-246.
- Rigaud, J.L.; Levy, D.; Mosser, G. and Lambert, O. (1998) Detergent removal by non-polar polystyrene beads—applications to membrane. Protein Reconstitution and two-dimensional crystallization. *Eur. Biophys. J.* **27**: 304-319.
- Ringler, D.H.; Peter, G.K.; Chrisp, C.E.; Keren D. (1985) protection of rabbits against experimental pasteurellosis by vaccination with a potassium thiocyanate extract of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* **49**: 498-504.
- Roepe, P.D. and Kaback, H.R. (1990) Isolation and functional reconstitution of soluble melibiose permease from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **29**: 2572-2577.
- Ruffolo, C.G. and Adler, B. (1996) Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the Oma87 gene encoding the *Pasteurella multocida* 87-kilodalton outer membrane protein. *Infect. Immun.* **64**: 3161-3166.
- Sackman, E. (1995) Physical basis of self-organization and function of membranes; physics of vesicles. In: *Structure and Dynamics of Membranes*, Lipowsky, R. and Sackman, E., eds., Elsevier, Amsterdam pp 213-304
- Santos, H.L. and Ciancaglini, P. (2000) A practical approach to the choice of a suitable detergent and optimal conditions to solubilize a membrane protein. *J. Biochem. Educ.* **28**: 178-182.
- Schreier, H.; Moran, P. and Caras, I. W. (1994) Targeting of liposomes to cells expressing CD4 using glycosylphosphatidylinositol-anchored gp120- Influence of liposome composition on intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **269**: 9090-9098.
- Schroeder, R.; London, E. and Brown, D. (1994) Interactions between saturated acyl chains confer resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: (GPI)-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 12130-12134.

- Sewell, W.A.A.; Jolles, S. (2002) Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin. *Immunology* **107**: 387-393.
- Silvius, J. R. (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Bioph. Biol.* **21**: 323-348.
- Singh, M.; O'Hagan, D.T. (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* **33**: 469-478.
- Spilki, F. R. (2002) Um surto de pasteurelose em coelhos mantidos em biotério. *Acta Scientiae Veterinariae* **30**: 131-134.
- Sprent, J. – Immunological memory, *Curr. Opin. Immunol.* 1997, **9**: 371–379.
- Srivastava, S.K. (1998) Outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype B:2 is immunogenic and antiphagocytic. *Indian. J. Exp. Biol.* **36**: 530-532.
- Storm, G. and Crommelin, D.J.A. (1998) Liposomes: quo vadis? *Pharm. Sci. Technol. Today* **1**: 19-31.
- Suckow, M.A.; Browersock, T.L.; Nielsen K.; Chrisp, C.E.; Frandsen, P.L. and Janovitz, E.B. (1995) Protective immunity to *Pasteurella multocida* heat-labile toxin by intranasal immunization in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* **45**: 526-532.
- Suckow, M.A.; Browersock, T.L.; Park, H. and Park, K. (1996) Oral immunization of rabbits against *Pasteurella multocida* with an alginate microsphere delivery system. *J. Biomat. Sci- Polym. E.* **8**: 131-139.
- Suckow, M.A.; Jarvinen, L.Z.; HogenEsch, H.; Park, K.; Bowersock, T.L. (2002) Immunization of rabbits against a bacterial pathogen with an alginate microparticle vaccine. *J Control Release* **85**: 227-235.
- Sun, S.W.; Jeong, Y.I.; Jung, S.W. and Kim, S.H. (2003) Characterization of FITC-albumin encapsulated poly(DL-lac-co-glycolide) microspheres and its release characteristics. *J. Microencapsul.* **20**: 479-488.
- Swartz, M. N., and Kunz, L. J. (1959) *Pasteurella multocida* infections in man. Report of two cases-meningitis and infected cat bite. *N. Engl. J. Med.* **261**: 889-893.
- Szoka. F. Jr. and Papahadjopoulos, D. (1980) Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **9**: 467-508.
- Ueno, M.; Tanford, C. and Reynolds, J.A. (1984) Phospholipid vesicle formation using nonionic detergents with low monomer solubility. Kinetic factors

- determine vesicle size and permeability. *Biochemistry* **23**: 3070-3076.
- Verma, R. and Jaiswal, T.N. (1998) Haemorrhagic septicaemia vaccines. *Vaccine* **16**, 84-192.
- Vogel, F.R. (1995) The role of adjuvants in retroviral vaccines. *Int. J. Immunopharmac.* **17**: 85-90.
- Vogel, F.R.; Powell, M.F. (1995) A compendium of vaccine adjuvants and excipients, in: Powell, M.F.; Newman, M.J.(Eds.), *Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach*, Plenum Press, New York, pp. 141-227.
- Wade, T.; Booy, R.; Teare, E.L. and Kroll, S. (1999) *Pasteurella multocida* meningitis in infancy- (A lick may be as bad as a bite). *Eur. J. Pediatr.* **158**: 875-878.
- Wang, R.; Doolan, D.L.; Le T.P.; Hedstrom, R.C.; Coonan, K.M., Charoenvit, Y.; Jones, T.R.; Hobart, P.; Margalith, M. Ng. J, Weiss, W.R., Sedegah, J.; de Taisne, C.; Norman, J.A.; Hoffman, S.L. (1998) Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* **282**: 476-480.
- Yeagle, P. L. (1993) *The membrane of the cells*, 2nd Ed. Academic Press.
- Yu, H.Y.; Sun, P. and Hou, W.Y (1998) Prolonged local anesthetic effect of bupivacaine liposomes in rats. *Int. J. Pharm.* **176**: 133-136.
- Zeman, D.; Neiger, R.; Nietfield, J.; Miskimins, D.; Libal, M.; Johnson, D.; Janke, B.; Gates, C.; Forbes, K. (1993) Systemic *Pasteurella haemolytica* vaccination in cattle, *J. Vet. Diagn. Invest.* **5**: 555-559.
- Zinckernagel, R.M.; Ehl, S.; Aichele, P.; Oehen, S.; Kundig, T.; Hengartner, H. (1997) Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol. Rev.* **156**: 199-209

Adendo

Lipid composition-dependent incorporation of multiple membrane proteins into liposomes

Katia R.P. Daghestanli^a, Rinaldo B. Ferreira^b, Geraldo Thedei, Jr.^c,
Bruno Maggio^d, Pietro Ciancaglini^{a,*}

^a Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP,
Avenida Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, SP 14040-901, Brazil

^b Serviço de Biotério Geral—PCARP/USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Uberaba, MG, Brazil

^d Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas, CEQUIBIC, Universidad Nacional de Córdoba, 5000 Córdoba, Argentina

Received 25 September 2003; accepted 29 March 2004

Available online 5 June 2004

Abstract

Membrane proteins from bacteria *Pasteurella multocida* were used as a model for studying its incorporation into liposomes. An important step to achieve efficient high yield protein incorporation in proteoliposomes is the study of the more suitable lipid composition. To this end, we compared the amount of total protein, reconstituted by co-solubilization methods, into liposomes of phospholipids with different polar head groups and acyl chain lengths. The liposomes and proteoliposomes were characterised by isopycnic centrifugation in sucrose gradient and by dynamic light scattering. Experimental and theoretical results were compared considering the effects exerted through the hydrocarbon chain length, volume, and optimal cross-sectional area of the phospholipid (combined in the geometrical critical packing parameter, lipid–protein matching), critical spontaneous radius of curvature of the bilayer vesicle, phase transition temperature of the lipid and ratio of lipid–protein molecules present in the vesicles. The highest incorporation of multiple proteins was found with dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), reaching a yield of 93% compared to the lower relative amounts incorporated in proteoliposomes of the other lipids. The incorporation of multiple proteins induces a proportional enhancement of vesicular dimension, since DPPC–proteoliposomes have an average diameter of 1850 Å, compared to the 1430 Å for pure DPPC vesicles.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Pasteurella multocida*; Reconstitution; Proteoliposome; Bilayer thickness; Hydrophobic matching; Membrane proteins; Lipid–protein co-solubilization

1. Introduction

Liposomes were first described by Bangham in the 60s as self-assembled lipid vesicles constituted by one or more lipid bilayers, and were used since as biomembrane models [1–4]. These unilamellar or multilamellar structures have been useful for studying membrane receptors, channel proteins, and membrane-bound enzymes [5]. There are several advantages to liposome use: they are biodegradable and non-toxic and can be readily prepared with varying compositions to obtain the most efficient antigen-presenting formulation.

Due to their high entrapping capacity, liposomes can be used as carrier-entrapping agents for drug delivery [6], fluorescent markers or enzymes entrapped at the time of liposome preparation; some of these preparations have been shown to be stable from hours to years [4,7]. Recent studies have examined the use of liposomes as potential immunoadjuvants [8]. In order to have an efficient system, it is essential to study the best technical conditions required for the optimisation of protein incorporation into liposomes; this involves knowledge of the most suited lipid or lipid mixture in terms of type of polar head group, charge, hydrocarbon chain length and size of the self-assembled bilayer vesicle.

The preparation of liposomes with a large variety of synthetic and natural lipids can be achieved by different methods. Among these procedures, suitable vesicles can

* Corresponding author. Tel.: +55-16-602-3753;

fax: +55-16-633-8151.

E-mail address: pietro@ffclrp.usp.br (P. Ciancaglini).

be obtained by reverse phase evaporation, French-press extrusion, solvent injection, sonication, and detergent co-solubilization followed by removal. For liposome incorporation of membrane proteins the more efficient strategy is the co-solubilization technique: this consists in the mixing of aqueous detergent solutions of phospholipids and protein whereby the vesicles are formed by the controlled removal of the detergent with polystyrene resins or dialysis; this method is highly efficient for preparing lipophilic proteins inserted in the lipid bilayer [9–11]. In this work, we have used the proteins of the outer membrane of the bacteria *Pasteurella multocida* as a model for studying the incorporation of lipophilic membrane proteins in liposomes. *P. multocida* is one of the most interesting bacterial pathogens, and it is the etiological agent of "Pasteurellosis". It causes a wide variety of diseases ranging from haemorrhagic septicaemia and fowl cholera, to common secondary invasions in many animals. It is considered as a zoonosis; occasional infections in people are largely caused by animal bites [12]. The clinical symptoms of such infections are sneezing, nasal congestion, nasal and eye discharges, listlessness and loss of appetite. This disease is more severe under conditions of malnutrition, overcrowding, poor sanitation, extreme temperatures, inadequate air circulation and other stressful situations [13]. Lipopolysaccharides and proteins are the two major somatic antigens exposed on the cell surface of *P. multocida*, and it is possible to use them as vaccines to control pasteurellosis because they are involved in the process of immunological recognition [14,15].

In the present study, we obtained a crude extract of detergent-solubilized antigenic membrane proteins of *P. multocida* and reconstituted them in liposomes with the detergent co-solubilization method. The efficiency of multiple proteins incorporation into liposomes constituted by phospholipids with different polar head group and acyl chain length was characterised by isopycnic centrifugation in sucrose gradient and dynamic light scattering. The protein incorporation procedure does not affect their antibody binding capacity, since they were still recognised by polyclonal antibody developed against whole bacteria.

2. Materials and methods

2.1. Materials

All solutions were prepared using Millipore MilliQ ultra pure pyrogenic water. Tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris); bovine serum albumin (BSA); molecular weight markers (10,000–250,000 Da); sodium dodecylsulfate (SDS), dimyristoyl-phosphatidylcholine (DMPC), dilaurylphosphatidylcholine (DLPC), distearoylphosphatidylcholine (DSPC) and dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC); dipalmitoylphosphatidic acid (DPPA), dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE), dipalmitoylphosphatidylserine (DPPS), dipalmitoylphosphatidylglycerol

(DPPG), 3-[(3-cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate (CHAPSO), polyoxyethylene 9-lauryl ether (Polidocanol), polyoxyethylene-sorbitan monolaurate (Tween 20), peroxidase labelled goat anti-rabbit IgG (GAR), 3,3'-diaminobenzidine (DAB), uranile acetate, lead citrate were from Sigma. (St. Louis, MO, USA); Calbiosorb resin was from Calbiochem (San Diego, CA, USA); Bioheads SM2-adsorbent resin was from Bio-Rad (Hercules, CA, USA); Müller Hinton agar was from Oxoid Ltd. (Basingstoke Hampshire, England); brain heart infusion medium (BHI) was from Acumedia Manufactures Inc. (Baltimore, MD); Analytical grade reagents were used without further purification.

2.2. Preparation of *P. multocida*

The bacterial strains were obtained as described by Daghanli et al. [16]. Briefly, specimens for bacteriologic culture were obtained from rabbit lungs with lesions of pneumonia, conjunctivitis, tympanitis, or skin abscesses caused by natural infection by the bacterium. The culture (ca. 0.1 ml) was plated onto Müller Hinton agar containing 5% (v/v) of defibrinated sheep blood. *P. multocida* was identified by culture characteristics and biochemical reactions [17,18]. Some *P. multocida* colonies were inoculated in medium BHI to grow for 24 h at 37°C without agitation and aeration for the subsequent steps.

2.3. Preparation of membrane fractions from *P. multocida*

The membrane protein fractions were obtained as described by Daghanli et al. [16]. After growth, the bacteria were thermally inactivated for 15 min at 60°C in a water bath. The suspension was centrifuged at $15,000 \times g$ at room temperature for 30 min, and the pellet washed three times with 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 and suspended using 25 ml of the same buffer. The suspended pellets were sonicated for 30 min at 240 W. Membrane fractions were isolated after centrifugation of this suspension at $180,000 \times g$ at room temperature for 1 h and the pellets were suspended in the same volume of 5 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5.

2.4. SDS-PAGE and Western blotting

The molecular weight of proteins was achieved by SDS-PAGE as described by Laemmli [19]. Briefly, 5% polyacrylamide was used for the stacking gel and 10% for the running gel (1.0 mm thick). The gels were silver stained to visualize the profile of the proteins. The molecular weight markers used ranged from 10,000 to 250,000 Da.

Western blotting was done by performing SDS-PAGE on protein samples as described above and then the proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. The membrane was blocked with a blocking buffer

(40 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 5% (w/v) non-fat milk, 1% (w/v) BSA and 0.1% (v/v) Tween 20), reacted (2 h) with the purified polyclonal antibody against *P. multocida* diluted 1:250 (v/v) in the blocking buffer and washed with a washing buffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 0.3 M NaCl) for 30 min with three buffer changes. Then, the membrane was probed with peroxidase labelled goat anti-rabbit IgG conjugate diluted 1:2000 (v/v) in the washing buffer. The substrate (0.7 mg/ml) 3,3'-diaminobenzidine was used to reveal protein-antibody reactions, as described by Daghanli et al. [16].

2.5. Estimation of protein concentration

Protein was estimated by the procedure described by Hartree [20] in the presence of SDS 2% (w/v), using crystallised bovine serum albumin as standard. The Read and Northcote method [21] was employed to estimate protein concentration in the fractions collected after isopycnic density gradient centrifugation, using crystallised bovine serum albumin as standard.

2.6. Antiserum preparation

Antiserum against total *P. multocida* antigenic determinants was obtained by applying four weekly intramuscular injections of thermally inactivated *P. multocida* cells (ca. $6-9 \times 10^{10}$ colony formation units, CFU) to healthy rabbits as described by Daghanli et al. [16].

2.7. Solubilization of *P. multocida* membrane proteins

Samples of membrane fraction proteins (3 mg/ml), obtained as described in Section 2.3, were first mixed during 4 h with different detergents: 1% (w/v) SDS, 0.4% (w/v) CHAPS, 0.3% (w/v) CHAPSO, 5% (w/v) Polidocanol or 1% (w/v) Tween 20. After that, the solubilize proteins were separated by ultracentrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h, and the solubilize protein concentration was estimated in the supernatant. The optimum solubilization condition was determined by varying total protein concentration and incubation time of the protein sample with the detergent. Membrane fraction samples were mixed with appropriate concentrations of detergent and, at predetermined time intervals, 1.0 ml aliquots were taken and centrifuged at $100,000 \times g$ for 1 h. After centrifugation, the protein concentration was estimated in the supernatant and in the resuspended pellets to calculate the percentage of solubilization.

2.8. Proteoliposomes preparation

Proteoliposomes were prepared by co-solubilization of lipids, proteins and detergent with a relationship of 10:1:70 (w/w). The phospholipid (10 mg) was dissolved in 1 ml chloroform, dried under nitrogen flow and the lipid film formed

was maintained under vacuum for 1 h. Then, 2 ml of a solution 5 mM Tris-HCl (pH 7.5), containing 25 mg/ml of SDS was added to the film. The mixture was incubated above the critical temperature of the lipid used for 1 h and vortexed at 10 min intervals. After that, the solubilize lipids were sonicated, using a microtip, for 1 min at 240 W. Two millilitres of SDS-solubilized membrane protein (0.5 mg/ml) was added to this mixture, which was incubated for 30 min at room temperature. Two methods for detergent removal from the mixture were studied: (i) dialysis against 5 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl with buffer changes at 5, 20, 40 and 72 h intervals and (ii) using 200 mg/ml Bioeads or Calbicosorb hydrophobic resins, with predetermined resin change intervals. SDS removal was monitored determining SDS concentration during the proteoliposomes preparation using the method described by Amons and Schrier [22]. After detergent removal, all mixtures were centrifuged at $180,000 \times g$ for 1 h and the pellets, constituted by proteoliposomes, were resuspended into 1.0 ml of 5 mM Tris-HCl, pH 7.5. The phospholipids studied were DPPC, DPPA, DPPG, DPPS, DPPG, DLPC, DSPC or DMPC, as indicated in the text.

2.9. Isopycnic density gradient centrifugation

A continuous sucrose gradient was prepared (1–30% sucrose in 5 mM Tris-HCl pH 7.5, density ranging from 1.0381 to 1.1764) using a Gradient Maker (Hoefer Scientific Instruments). Samples of crude solubilized protein extracts, liposomes or proteoliposomes (500 μ l) were loaded on the gradient and centrifuged in a Hitachi P65VT3 vertical rotor in a Hitachi 55P-72 ultracentrifuge at $180,000 \times g$ for 4 h at 25 °C. The gradients were then fractionated into 500 μ l fractions (see figures legends for details) and analysed for protein and inorganic phosphate content as described by Chen et al. [23].

2.10. Electron microscopy

The proteoliposomes were examined by transmission electron microscopy. The pellet obtained after centrifugation at $150,000 \times g$ was resuspended in a 1% (w/v) osmium solution prepared in the incubation buffer. After 1 hour, the sample was washed in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.3, centrifuged and dehydrated with acetone-water mixtures of increasing acetone concentration, and the final dehydration was made with three washes with 100% acetone for 10 min. Finally, the pellet was infiltrated in araldite resin (1:1) at 37 °C, for 48 h and included in pure araldite during 72 h at 60 °C. A thin plate (0.5 μ m) was cut using a microtome and stained with 4% (w/v) uranyl acetate, pH 12, for 10 min followed by 0.3% (w/v) lead citrate, pH 12, for 10 more minutes. After this, the sample was examined using a Philips Model 208 transmission electron microscope.

2.11. Light scattering of proteoliposomes

The determination of liposome and/or proteoliposome size distribution was done by dynamic light scattering using a Malvern Instruments Ltd. (model Zetasizer 3000HSA). The sample was filtered and diluted to an adequate polydispersion index.

3. Results

3.1. Solubilization of *P. multocida* membrane and identification of antigenic proteins

A typical preparation of membrane fraction from *P. multocida*, as described in Sections 2.2 and 2.3, produces about 8 mg/ml of protein.

Among the detergents used, 1% (w/v) Tween 20 and 5% (w/v) Polidocanol were less efficient, solubilizing only 37 and 12% of the proteins, respectively. CHAPS (0.4%, w/v) and CHAPSO (0.3%, w/v) showed a similar efficiency, solubilizing 70% of the total membrane proteins, while 1% (w/v) SDS was the most efficient detergent, solubilizing 85% of the proteins present in the membrane fractions. SDS concentrations higher than 1% (w/v) did not improve solubilization under the conditions tested.

For a fixed concentration of 1% (w/v) SDS, the best solubilization was achieved when 0.5 mg/ml of membrane protein was used, resulting in about 90% solubilization efficiency. In these conditions, incubation periods of 1–5 h resulted in insignificant increases in the solubilization rate (data not shown). Therefore, the standardised incubation time for solubilization experiments was 2 h.

The electrophoretic profile of membrane fractions and solubilized extracts was nearly the same, showing proteins ranging from 10 to 150 kDa (Fig. 1A lanes 3 and 1, respectively).

Table 1

Efficiency of SDS removal and protein incorporation into DPPC-liposome. Proteoliposomes were prepared by co-solubilization of lipids, protein and detergent with a relationship of 10:1:70 (w/w), as described in Section 2

Removal method	Proteoliposome (mg of protein)	Incorporation (%)	SDS removal (%)
Calbisorb	0.928	93.0	99.5
Biobeads	0.024	2.9	94.0
Dialysis	0.083	10.0	55.0

Two methods for detergent removal from the mixture were used and the residual SDS and protein into proteoliposome were determined. Data are reported as the mean of triplicate measurement of different preparations which was considered to be statistically significant at $P \leq 0.05$.

After Western blotting, many proteins from membrane fractions and solubilised extracts showed immunogenic activity, since they were recognised by a polyclonal antibody developed against whole inactivated bacteria (Fig. 1B lanes 3 and 1, respectively). The most intense bands were: 97.5, 87, 74, 66, 60, 34 and 26 kDa.

3.2. Proteoliposome preparation and characterization using DPPC

Since the incorporation of proteins into liposomes by the co-solubilization method requires the complete removal of the detergent, two methods were tested: dialysis and hydrophobic resin. Fig. 2 shows that using Calbisorb resin, SDS removal was >99%, after 4 h incubation while the dialysis method removed only 55% of SDS, even after 90 h incubation, and Biobeads resin removed about 90% of SDS after 80 min incubation. Also, the method of removal of SDS affects the incorporation of proteins into DPPC-liposome, as shown in Table 1; the use of Calbisorb resulted in 93% protein incorporation while Biobeads and dialysis yielded only 2.9 and 10% incorporation, respectively.

Fig. 1. SDS-PAGE and Western blotting of membrane proteins from *P. multocida*. (A) Silver stained proteins and (B) Western blotting of lanes: (1) SDS-solubilized proteins extract (2) protein present in proteoliposome, and (3) membrane fraction. SDS-PAGE and Western blotting were carried out as described in Section 2.4.

Fig. 3. Isopycnic density sucrose gradient centrifugation study. (A) Solubilized protein extract from *P. Multiculus*. (B) DPPC-liposome and (C) DPPC-proteoliposome. (○) Protein: absorbance at 595 nm (●) lipid: absorbance at 820 nm, and (■) percentage sucrose, as described in Section 2.

the presence of bilayer vesicles with average diameter of 2000 Å (Fig. 4).

3.3. Effect of lipid composition on the incorporation of membrane proteins

The acyl chain length of the phospholipid profoundly influenced the protein incorporation. When DLPC, DMPC or DSPC were used for proteoliposome reconstitution, the protein incorporation yield was 35, 75 and 46%, respectively (Table 2). Moreover, the migration of proteoliposomes down the isopycnic density gradient centrifugation

changed according to the phospholipid used. For the three preparations there was no strict correspondence between the protein and phosphate peaks, showing asymmetric elution behavior which suggests that, besides proteoliposome formation, there was either possible protein and/or lipid aggregation (Fig. 5). The elution profile in the sucrose density gradient for DLPC-proteoliposomes showed two fractions, a first one in which the lipid and protein coexisted (representing the proteoliposomes) and a second one in which the protein content was much higher than that of the lipid (possibly representing the presence of protein aggregates). For the proteoliposomes reconstituted with DMPC the sucrose

Fig. 4. Electron micrograph of proteoliposome constituted by DPPC and membrane protein prepared as described in Section 2. Bar corresponds to 100 nm.

density elution profile shows two fractions that correspond to lipid and protein that are not aggregated. The systems reconstituted with DSPC the elution profile shows a single fraction at about 16% sucrose, relatively homogeneous but in which the incorporation of protein is only 46%. Electrophoresis and Western blotting revealed that the fatty acid chain length in the phospholipid do not introduce differences in the selectivity for protein incorporation since all proteins were present in the electrophoretic profile, suggesting their random insertion into the lipid bilayer (data not shown).

Table 2 also shows the minimum spontaneous diameter (corresponding to twice the critical radius) of the vesicles, calculated by the Israelachvili approach [24] as well as the diameter of liposomes and proteoliposomes actually measured by dynamic light scattering. The correlation between vesicle diameter and the phospholipid fatty acid chain length is not straightforward since the type of hydrocarbon chain affects both the vesicle size and the transition temperature in a way that can be synergic or competing for protein incorporation (see Section 4). In addition, it is important to emphasize that the average diameter of proteoliposomes is higher than the protein-free liposomes.

The influence of the polar head group in phospholipids having the same hydrocarbon portion was studied by comparing DPPE, DPPG, DPPS, DPPC and DPPA (Table 2). All the preparations were run in the sucrose density gradient in order to verify their homogeneity; all these reconstituted systems revealed elution profiles characteristic of the presence of lipid or protein aggregates besides proteoliposome vesicles (results not shown). For DPPE, the protein incorporation in the proteoliposome fraction was 68.4% compared to 92.8% for DPPC; the protein reconstitution into proteoliposomes with negatively charged lipids was decreased and

reached 49.6% when DPPA was used as host lipid while the protein incorporation was even lower in DPPS (19.2%) and DPPG (11.6%) proteoliposomes (Table 2).

4. Discussion

Since their discovery, interest in liposomes has been steadily growing in relation to their contribution for understanding aspects of the structure and dynamics of biomembranes. On practical terms, they have been studied as carriers for therapeutic drugs, thus decreasing their toxicity, or targeted release systems [25–28] as well as carriers for antigens and immunoadjuvants during vaccine preparation [8]. Proteoliposome systems can be obtained by different preparation techniques, such as mechanical dispersion, sonication, extrusion, solvent dispersion, reverse phase evaporation, and co-solubilization with detergents [5,10,29,30].

The lipoprotein component of the outer membrane of the bacteria *P. multocida* appear to have a close relationship with its pathogenic activity and makes them an interesting promising subject in the search for more efficient treatments against pasteurellosis. For any subsequent study on their potential involvement, the membrane protein components need to be first solubilised.

The successful strategy for membrane reconstitution involves three main aspects: (i) partial or complete solubilization of the membrane protein and lipid components (ii) preservation of the biological activity of the solubilised proteins and (iii) mixing of the solubilised purified protein and lipids in order to achieve reconstitution [31–33].

During solubilization the detergents bind to and inserts into the lipoprotein membrane providing a new hydrophilic-hydrophobic interface that structurally rearranges the aggregate, with weakening of lipid-protein interactions [33–36].

Many detergents have been used to obtain solubilised extract from the outer membranes of bacteria, such as sodium deoxycholate, SDS, sodium cholate, Empingem BB and octylglucopyranoside [37]. The solubilization of membrane proteins is affected by the ionic character and critical micellar concentration (CMC) of detergents [38]. For the membrane proteins of *P. multocida* neutral detergents were less efficient than zwitterionic and ionic detergents. SDS, an anionic detergent, showed the best solubilizing capacity, since no protein species were lost (Fig. 1A, lane 1). Although SDS is a denaturing detergent, it showed higher solubilization capacity (80–90%) without a significant loss of antibody binding ability, and these proteins were still recognised by a polyclonal antibody developed against whole inactivated bacteria, as seen in Fig. 1B (lane 1), indicating that a significant part of the protein structure, related to its antigenicity, was preserved or refolded after the step of proteoliposome construction (Fig. 1B, lane 2).

Since the antigenic proteins are present in the SDS-solubilised extract, the best method to obtain proteoliposomes is

Fig. 5. Isopycnic density sucrose gradient centrifugation study of proteoliposomes constituted by: (A) DLPC (B) DMPC, and (C) DSPC. (○) Protein absorbance at 595 nm (●) lipid absorbance at 820 nm and (■) percentage sucrose, as described in Section 2.

co-solubilization, in which the proteoliposomes are formed from a mixture of detergent, lipid and protein. A critical factor in this technique is the use of an efficient method for detergent removal [10]. Amongst the usual methods for removal the use of hydrophobic resin is notable because it is a rapid method and the sample is not diluted [10,33,39–42]. Hydrophobic resin removes the detergent in its monomeric form, which is efficiently and rapidly extracted from the

lipid:protein:detergent mixture with the concomitant proteoliposome formation [9,10]. Calbiosorb resin was much more efficient (Fig. 2) than Biobeads (insert Fig. 2) probably due to a higher anionic detergent binding affinity of the Calbiosorb resin [41].

Since DPPE, DPPG, DPPS, DPPA and DPPC contain two hydrocarbon chains with 16 carbon atoms, the best incorporation with DPPC indicates a selective preference for the

PC polar head group in the phospholipid, compared to the other zwitterionic phospholipid studied (DPPE) and with negatively charged polar head groups (see Table 2).

Apart from the determination of the amount of protein incorporated in the lipid bilayer, we also performed a study of the elution profile of the proteoliposome samples prepared with the different phospholipids on sucrose density gradients. Proteoliposomes reconstituted with DPPC show a single symmetric elution profile, similar to that obtained with the single lipid, indicating a remarkably homogeneous vesicle population distribution and absence of other lipid–protein aggregates. On the other hand, for the other phospholipids tested, besides a lower incorporation yield for the protein, the asymmetric elution profiles of the proteoliposomes clearly revealed coexistence with lipid–protein aggregates. Our results clearly indicate that the method employed can lead to efficient protein reconstitution and that DPPC appears as the best suited phospholipid for protein incorporation, reaching a yield of 93% in a homogeneous proteoliposome population having a similar density than the single lipid vesicle. These results also show that the protein incorporation into proteoliposomes by the co-solubilization method is markedly dependent on the phospholipid polar head group used for reconstitution. The poor incorporation with PC other than dipalmitoyl (DP) suggest also a relationship between the fatty-acyl chain length (or the concomitant physical properties that the hydrocarbon portion confers to the lipid bilayer) and the protein incorporation yield (Table 2, Figs. 3 and 5).

It is long known that the length of the phospholipid hydrocarbon chains, as well as the type of polar head group, have a profound influence on the bilayer phase state at a particular temperature; on the other hand, it is also well known that proteins generally show preferential partition into liquid-crystalline phases, due to the better matching and compensation of lateral defects required for bilayer incorporation of bulky protein molecules, compared to the gel phase state [43]. However, we included in Table 2 the temperatures for the gel-to-liquid crystalline main phase transition of the phospholipids used and it can be seen that no simple correlation emerges regarding the phase transition temperature of the phospholipid and the yield of protein incorporation in the proteoliposome.

It has been shown that both the length and possibilities for configurational disorder of the hydrocarbon chains, in relation to the polar head group size, hydration and charge repulsion in the polar head group markedly influence the topology and spontaneous curvature of the self-assembled lipid structure in the aqueous medium [24,44]. These effects are exerted through the hydrocarbon chain length, volume and optimal cross-sectional area of the phospholipid, a geometrical combination of their influence is summarised in the critical packing parameter which allows to theoretically calculate the critical (minimum) spontaneous radius of curvature of the bilayer vesicle [24]. Table 2 shows both the calculated minimum spontaneous diameter and that actually measured for the lipid vesicles (liposomes and proteolipo-

somes) studied. Again, no simple correlation is found, and for the homologous series of phosphatidylcholines the yield shows an increase with the calculated vesicle critical diameter up to the values corresponding to DPPC.

The calculated critical diameter represents a minimum limit allowed by the molecular geometry and lower values are not possible due to the raise of uncompensated lateral and transverse tensions [43]. In agreement with this, the experimentally measured values found are more similar to the calculated values only for the larger liposomes (DPPC, DSPC), but are much higher in the case of the smaller ones (DLPC, DMPC), indicating that all the actual vesicles adopt more relaxed curvature tensions. In the case of DPPE the calculated critical diameter of a theoretical vesicle is larger than that experimentally found for the pure lipid. Even if on pure geometrical terms the critical packing parameter of DPPE should allow formation of relatively large relaxed vesicles, the relatively high transition temperature and comparatively low polar head group hydration of DPPE frequently lead to the preferential adoption of smaller, more strained, vesicles or even topologies such as HII-type phases [24,45]. For all proteoliposomes the diameters are even larger reflecting that the incorporation of proteins contributes to reduce curvature tensions and stabilize larger structures. This effect is clearly apparent in the case of DPPE proteoliposomes where the incorporation of proteins results in large vesicles with their diameter now exceeding the critical diameter (Table 2).

All the data analysed indicate that optimal *P. multocida* membrane proteins are incorporated most favourably in proteoliposomes formed by PCs having hydrocarbon chains of 14–16 carbon long, with a clear optimum for DPPC. This is probably related to the concept of hydrophobic matching controlling the partitioning of membrane proteins in bilayers, or regions of a multicomponent bilayer, having complementary lengths of their hydrophobic membrane-spanning moieties [46]; in more simple binary or ternary systems it has been shown for several proteins that PCs having a chain length of about 14–16 carbons, compared to those with 18 carbon chains, usually favour protein partitioning into their phase domains [46]. Let us consider a protein fraction such as that of *P. multocida* with a mean molecular weight of about 37 kDa and assume a protein specific volume of about 0.70–0.76 cm³/g [47]. This leads to an average protein cross-sectional area of about 13.9 nm² immersed in a proteoliposome of DPPC (with lipid cross-sectional mean molecular area of about 0.48 nm², at the average lateral surface pressure of 30 mN/m ascribed to lipid bilayers) [43]. In this system, it can be calculated that an average protein molecule would require about 34 lipid molecules to fully surround the perimeter of the protein inserted perpendicularly to the membrane surface. On the other hand, the number of lipid and protein molecules (considering the sectional areas mentioned above) present in the liposome and proteoliposome vesicles on the basis of the experimentally measured diameters (Table 2) gives a lipid/protein ratio of about 30. This is in remarkable

- [45] E. Sackman, Physical basis of self-organization and function of membranes; physics of vesicles, in: R. Lipowsky, E. Sackman (Eds.), *Structure and Dynamics of Membranes*, Elsevier, Amsterdam, 1995, pp. 213–304.
- [46] M. Bloom, E. Evans, O.G. Mouritsen, *Q. Rev. Biophys.* 24 (1991) 293.
- [47] T.E. Creighton, *Proteins, Structures and Molecular Properties*, Freeman & Co., New York, 1993, pp. 267–268.