

Marina Yukari Kubota

**Avaliação de MPLA como
adjuvante em formulações
vacinais contra leptospirose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/
Instituto Butantan, para o título de Mestre em
Biotecnologia.

**São Paulo
2015**

Marina Yukari Kubota

**Avaliação de MPLA como
adjuvante em formulações
vacinais contra leptospirose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/ Instituto Butantan, para o título de
Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elizabeth Angelica Leme
Martins

Versão Original

**São Paulo
2015**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Kubota, Marina Yukari.

Avaliação de MPLA como adjuvante em formulações vacinais contra leptospirose / Marina Yukari Kubota. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Profa. Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Adjuvantes vacinais.

Versão do título para o inglês: Avaliation of MPLA as adjuvant in vaccine formulation against leptospirosis.

1. Adjuvante 2. MPLA 3. LPS 4. Vacina 5. Leptospira 6. Salmonela I. Martins, Profa. Dra. Elizabeth Angélica Leme II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB077/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Marina Yukari Kubota.

Título da Dissertação: Avaliação de MPLA como adjuvante em formulações vacinais contra leptospirose.

Orientador(a): Profa. Dra. Elizabeth Angélica Leme Martins.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

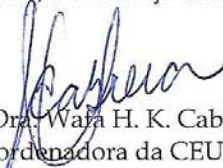
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Utilização de monofosforil lipídeo A de salmonelas e LPS e lipídeo A de leptospiras como adjuvantes na imunização com proteínas recombinantes de leptospiras", **protocolo n° 1365/15**, sob a responsabilidade de Elizabeth Angelica Leme Martins e Erika Nakajima, Marina Yukari Kubota – que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 19/2/2015.

This is to certify that the proposal "Utilization of monophosphoryl lipid A from salmonellas and LPS and Lipid A from leptospiras as adjuvant for immunization with leptospiral recombinant proteins", **protocol n° 1365/15**, under the responsibility of Elizabeth Angelica Leme Martins and Erika Nakajima, Marina Yukari Kubota – which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) – has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 2/19/2015. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	N° de animais/espécie
02/2015 - 03/2017 Biotecnologia Molecular III	90 Camundongos Balb/c 18-24g (F) – Procedentes do Biotério Central do Instituto Butantan; 110 Hamsters Gold 40g (M) - Procedência Anilab

São Paulo, 3 de março de 2015


Dra. Wafá H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

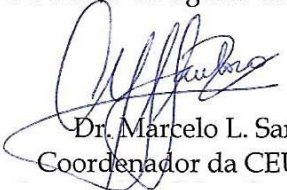
Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Utilização de monofosforil lipídeo A de salmonelas e LPS e lipídeo A de leptospiras como adjuvantes na imunização com proteínas recombinantes de leptospiras", **protocolo nº 937/12**, sob a responsabilidade de Elizabeth Angelica Leme Martins e Erika Nakajima - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 8/8/12.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
08/2012 - 08/2014 Laboratório de Biotecnologia Molecular III	120 camundongos Balb/c 21 dias (F); 140 hamsters dourado 21 dias (M)

São Paulo, 9 de agosto de 2012


Dr. Marcelo L. Santoro
Coordenador da CEUAIB

À família e amigos que apoiaram e
incentivaram durante este caminho.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe por sempre apoiar e contribuir em todas as minhas escolhas.

Ao meu irmão Eric pela presença e carinho.

Aos avós, primos, e tios pela compreensão das minhas frequentes ausências.

À Dra Elizabeth Martins pelo apoio, paciência e compreensão das minhas dificuldades.

À Dra. Erika Nakajima pelo apoio e auxílio em todas as etapas.

À Léa que participou e contribuiu para este trabalho.

À Claudia Iwashita, Daniela Jinzenji, Iuri Reino e Juliano Pinto pela companhia e amizade.

Aos técnicos Joselino, Sueli e Ronaldo pelo auxílio.

A todos do Centro de Biotecnologia que de alguma forma auxiliaram e apoiaram este projeto.

Ao apoio e suporte técnico dos colegas Gisele e Zenaide da Faculdade de Medicina Veterinária da USP

Ana, Leila, Angélica, Hissami, Chia, Kleber, Tomio, Tamyris, Dayane, Mariani, Dauanda, Ludimila, Camila, Tannile, Renato pela amizade e companheirismo.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Mestrado – Processo 2013/00939-5)

“Que minha solidão me sirva de companhia, que eu tenha a coragem de me enfrentar, que eu saiba ficar com o nada e mesmo assim me sentir como se estivesse plena de tudo.”
Clarice Lispector

“Trabalho é amor tornado visível.”
Khalil Gibran

“A questão que às vezes me deixa louco; louco sou eu ou são os outros?”
Albert Einstein

RESUMO

KUBOTA, M. Y. **Avaliação de MPLA como adjuvante em formulações vacinais contra leptospirose.** 2015. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Lipopolissacarídeos (LPS) de *L. interrogans*, *S. enterica* e *B. pertussis* foram extraídos e as subfrações monofosforil lipídeo A (MPLA) preparadas por hidrólise. O LPS é responsável por forte resposta imunológica e endotóxica em mamíferos, enquanto o MPLA apresenta baixa endotoxicidade e boa capacidade imunomoduladora. Estudamos a atividade adjuvante de LPS e de MPLA em formulações com antígenos LigA ou OmpA contra leptospirose. Testes de imunização e desafio em hamsters confirmaram alta atividade imunoprotetora de LigA e capacidade adjuvante do MPLA de salmonela e de LPS de leptospirosas, mas as formulações não foram capazes de bloquear a colonização renal na leptospirose. Os resultados sugerem diferenças na imunidade protetora sistêmica da imunidade protetora renal.

Palavras-Chave: *S. enterica*. *L. interrogans*. LPS. MPLA. Adjuvante. LigA. OmpA.

ABSTRACT

KUBOTA, M. Y. **Avaliação de MPLA as adjuvante na formulação de vacina contra leptospirose**. 2015. 126 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Lipopolysaccharides (LPS) of *L. interrogans*, *S. enterica* and *B. pertussis* were extracted and the subfraction monophosphoril lipid A (MPLA) prepared by hydrolysis. The LPS is responsible for immunological response and endotoxicity in mammals, while MPLA has reduced endotoxic activity, but maintain the immunomodulatory capacity. We studied the adjuvant capacity of LPS and MPLA in formulations with LigA or OmpA antigens against leptospirosis. Tests of immunization and challenge in hamsters confirmed the high immune protection activity of LigA and adjuvant capacity of MPLA of salmonella and LPS of leptospiras, however formulations did not block the renal colonization. The results suggest that there are differences in the systemic immune protection from the kidney immune protection.

Keyword: *S. enterica*. *L. interrogans*. LPS. MPLA. adjuvant. LigA. OmpA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da estrutura de membranas de bactérias Gram-negativas e modelo do LPS de salmonela.....	25
Figura 2 - Diferenças estruturais entre moléculas de lipídeo A.....	26
Figura 3 - Esquema da ligação do LPS ao receptor TLR4 e proteína adaptadora MD2.....	28
Figura 4 - Esquema da construção lpp_lpxE com sítios de restrição e inserção no vetor pMA.....	45
Figura 5 - Esquema do ensaio de imunização e desafio de hamsters.....	50
Figura 6 - Perfis dos LPS de leptospiras e de salmonelas avaliados por ureia_SDS-PAGE, com coloração por prata.....	59
Figura 7 - Elaboração da curva padrão de KDO.....	60
Figura 8 - Análise de LPS de salmonela e leptospiras (10A) e dos produtos de hidrólise, por ureia_SDS-PAGE.....	63
Figura 9 - Espectrometria de massa (MALDI – TOF) de MPLA de salmonela com modo de aquisição reflector negativo.....	64
Figura 10 - Espectro de massa ESI – MS de MPLA de leptospira.....	65
Figura 11 - Estruturas de MPLA de <i>L. interrogans</i> sugeridas pelos valores m/z obtidos por espectrometria de massa.....	66
Figura 12 - Análise de MPLA em placa HPTLC de sílica gel.....	68
Figura 13 - Curva padrão de fosfato inorgânico.....	69
Figura 14 - Plasmídeo pMA_lpp_lpxE obtido de DH5α digerido para liberação dos fragmentos de DNA lpp_lpxE e lpxE.....	71
Figura 15 - Confirmação da construção dos plasmídeos para expressão de LpxE, por ensaio de restrição.....	73
Figura 16 - Análise de expressão da proteína lpxE em clones de <i>E. coli</i> DH5-α com vetor pAEsox_lpxE induzido ou não por paraquat e vetores pMA_lpp_lpxE e pAE_lpp_lpxE.....	74
Figura 17 - Análise de MPLA de salmonela contendo o plasmídeo pAEsox_lpxE induzido em MALDI - TOF.....	75
Figura 18 - Análise das preparações das proteínas LigA e OmpA, por SDS-PAGE.....	76

Figura 19 - Esquema do primeiro ensaio de imunização em hamsters e coletas de amostras, sangue e rins dos animais sobreviventes ao desafio de <i>Leptospira</i>	77
Figura 20 - Monitoramento da sobrevivência dos hamsters após imunização e desafio com leptospiros virulentos (10^7 bactérias).....	80
Figura 21 - Imunolocalização de <i>Leptospira</i> em imprint de rim de hamster infectado.....	84
Figura 22 - Títulos de anticorpos contra as proteínas OmpA ou LigA nos soros dos animais dos diferentes grupos experimentais.....	85
Figura 23 - Dosagem de anticorpos específicos anti-LigA por ELISA cinético.....	87
Figura 24 - Os resultados dos coeficientes angulares das curvas de absorvância em função do tempo (k-ELISA).....	88
Figura 25 - Anticorpos anti-LigA e anti-OmpA medidos por ELISA cinético.....	90
Figura 26 - Curvas de sobrevivência dos hamsters imunizados.....	94
Figura 27 - Dosagem de anticorpos anti-LigA nos “pools” de soros dos animais de cada grupo experimental por ELISA cinético.....	97
Figura 28 - Anticorpos anti-LigA analisados individualmente para cada animal, medido por ELISA cinético.....	99
Figura 29 - Reconhecimento de LigA e LPS por anticorpos dos soros de hamsters imunizados com a vacina comercial ou com preparações de LPS de leptospiros, por western blotting.....	101
Figura 30 - Perfil de reconhecimento de proteínas do extrato de leptospira por anticorpos dos soros de animais imunizados com vacina comercial.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de bactérias utilizadas.....	32
Tabela 2 - Vetores e primers utilizados.....	33
Tabela 3 - Comparação da densidade de bactérias nos cultivos e massa celular recuperada.....	57
Tabela 4 - Dosagem de KDO em amostras de LPS de leptospira e salmonela.....	60
Tabela 5 - Dosagem de fosfato nas amostras de MPLA de leptospira para cálculo da concentração.....	70
Tabela 6 - Grupos experimentais e formulações vacinais para imunização de hamsters.....	79
Tabela 7 - Resultados de sobrevivência e isolamento de leptospiras dos rins por cultivo de macerados em meio Fletcher.....	82
Tabela 8 - Formulações das imunizações dadas aos hamsters.....	92
Tabela 9 - Análise da sobrevivência dos animais imunizados e desafiados com leptospiras virulentas.....	93

LISTA DE SIGLAS

μFD	microfaraday
μg	micrograma
μL	microlitro
Abs	absorbância
Alu	hidrato de alumínio
Amp	ampicilina
APC	antigens presenting cells
AS04	adjuvant system
BSA	bovine serum albumin
DNA	ácido desoxirribonucleico
DO	densidade ótica
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EMJH	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris
ESI-MS	Electrospray ionization – spectrometry of mass
FITC	fluoresceína de isotiocianato
G	força gravitacional
g	grama
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
HPTLC	high performance thin layer cromatography
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
IMAC	Immobilized metal-ion affinity chromatography
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kDa	quilodalton
KDO	3-deoxy-d-manno-oct-2-ulosonic acid
k-ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - cinético
Kpb	quilo pares de bases
kV	quilovolts
L	litros
Lig	Leptospiral immunoglobulin
LPS	lipopolissacarídeo

LPS _{le}	lipopolissacarídeo de leptospira
LPS _{sa}	lipopolissacarídeo de salmonela
M	molar
m/v	massa/ volume
m/z	massa/carga
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MAT	microaglutinação
MD2	myeloid differentiation protein-2
mg	miligrama
mL	mililitros
mM	milimolar
MPLA	monifosforil lipídeo A
MPLA _{bo}	monofosforil lipídeo A de bordetela
MPLA _{le}	monofosforil lipídeo A de leptospira
MPLA _{sa}	monofosforil lipídeo A de salmonela
NF- β	nuclear factor $\kappa\beta$
ng	nanograma
nm	nanômetro
nmol	nanomol
Omp	outer membrane protein
Paraquat	dicloreto de metil viologen hidratado
pb	pares de bases
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	potencial hidrogeniônico
PS	polissacarídeos
RNA	ribonucleic acid
S1,S2,S3	sangria 1, 2, 3
SDS -PAGE	Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel
T	tempo
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEMED	tetramethylethylenediamine
TLC	thin layer chromatography
TLR	Toll like receptor

TNF- α	tumor necrosis factor
TOF	time of flight
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
V	volts
WFI	water for injection
Δ Abs/ Δ T	variação da absorbância pela variação do tempo

LISTA DE SÍMBOLOS

-	negativo
%	por cento
+	positivo
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Leptospirose	22
1.2 Vacinas contra leptospirose	23
1.3 Adjuvantes vacinais	24
1.4 Caracterização de LPS, lipídeo A e MPLA	27
1.5 Ativação do sistema imune de mamíferos por LPS e seus derivados	27
1.6 Modificação de LPS de salmonela pela enzima heteróloga LpxE	29
1.7 Antígenos vacinais contra leptospirose	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Bactérias e plasmídeos	32
3.2 Cultivo das bactérias	34
3.2.1 Cultivo de bactérias <i>E. coli</i> DH5 α ou BL21(DE3)StarpLysS e de salmonelas SL4213 ou SL3261.....	34
3.3 Preparo de bactérias competentes e transformação	34
3.3.1 Preparo de <i>E. coli</i> competente por CaCl ₂	34
3.3.2 Transformação de bactérias competentes por choque térmico.....	35
3.3.3 Preparação de <i>S. enterica</i> Typhimurium eletrocompetentes.....	36
3.3.4 Transformação de salmonelas pelo método de eletroporação.....	36
3.4 Cultivos de bactérias recombinantes para expressão de proteínas	37
3.5 Cultivo de bactérias para extração de LPS	37
3.5.1 Cultivo de <i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium SL3261 e <i>Leptospira interrogans</i> sorovar Copenhageni 10A.....	37
3.5.2 Cultivo de <i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium SL3261 para extração de LPS.....	38
3.6 Preparação de LPS de <i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium SL3261 e de <i>Leptospira interrogans</i> sv Copenhageni 10A	39
3.6.1 Extração de LPS.....	39
3.6.2 Análise do LPS por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo ureia (ureia_SDS-PAGE) e coloração por prata.....	40

3.6.3	Quantificação de LPS por dosagem de KDO.....	41
3.7	Obtenção e análise de lipídeo A e MPLA.....	42
3.7.1	Hidrólise do LPS de salmonela e leptospira.....	42
3.7.2	Análise de MPLA por espectrometria de massa.....	43
3.7.3	Análise do MPLA por TLC.....	43
3.7.4	Dosagem de fosfato nas frações de lipídeo A e MPLA.....	44
3.8	Geração do clone recombinante de SL3261 expressando a enzima LpxE.....	44
3.8.1	Construção do cassete de expressão lpp_lpxE.....	44
3.8.2	Subclonagem do fragmento lpp_lpxE ou lpxE nos vetores pAE e pAEsox.....	45
3.8.3	Eletroforese em gel de agarose para análise de plasmídeos e fragmentos gênicos.....	46
3.9	Testes de expressão da proteína LpxE em DH5α, BL21DE3 e SL3261 com as diferentes construções plasmidiais.....	47
3.10	Preparo dos antígenos recombinantes.....	47
3.10.1	Expressão das proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	47
3.10.2	Purificação das proteínas em coluna IMAC.....	48
3.10.3	Análise dos cultivos bacterianos e das proteínas purificadas por SDS PAGE.....	49
3.11	Ensaio de imunização e desafio em hamsters.....	50
3.11.1	Imunização em hamsters.....	51
3.11.2	Cultivo de <i>Leptospira</i> para ensaio de desafio.....	51
3.11.3	Avaliação macroscópica dos rins dos animais sobreviventes.....	51
3.11.3.1	<i>Isolamento de Leptospira de macerados dos rins.....</i>	<i>52</i>
3.11.3.2	<i>Avaliação da presença de leptospiros nos rins por imprint e imunohistoquímica.....</i>	<i>53</i>
3.11.4	Avaliação da resposta imunológica por Western blot para detecção de anticorpos contra proteínas ou LPS.....	54
3.11.5	Avaliação da resposta imunológica por ELISA.....	55
3.12	Análise estatística.....	56
4	RESULTADOS.....	57
4.1	Preparo de monofosforil lipídeo A de salmonelas e de leptospiros.....	57
4.1.1	Extração de LPS	57
4.1.2	Dosagem de LPS de leptospira e salmonela por KDO.....	59

4.1.3 Hidrólise de LPS para obtenção de MPLA.....	61
4.1.3.1 <i>Análise das preparações de lipídeo A e MPLA de salmonelas e de leptospiras por espectrofotometria de massa.....</i>	62
4.1.3.2 <i>Análise de MPLA em placa de TLC.....</i>	67
4.1.3.3 <i>Dosagem de fosfato nas frações de MPLA.....</i>	68
4.2 Geração de clones de salmonelas para expressão da proteína LpxE.....	70
4.2.1 Geração dos plasmídeos pAE_lpxE, pAElpp_lpxE e pAEsox_lpxE.....	71
4.2.2 Análise de expressão da proteína lpxE.....	73
4.3 Preparo dos antígenos.....	75
4.4 Ensaio de imunização e desafio com leptospiras em hamsters.....	76
4.4.1 Primeiro ensaio de imunização e desafio em hamsters.....	77
4.4.2 Grupos experimentais do primeiro ensaio em animal.....	77
4.4.3 Desafio com leptospiras e análise da sobrevivência dos hamsters.....	78
4.4.4 Avaliação macroscópica dos rins dos animais sobreviventes.....	81
4.4.4.1 <i>Isolamento de leptospiras por cultivo dos macerados de rim.....</i>	83
4.4.4.2 <i>Imprint renal e imunolocalização de Leptospiras.....</i>	83
4.4.4.3 <i>Avaliação da resposta imunológica por ELISA.....</i>	84
4.5 Padronização do ELISA cinético para dosagem de anticorpos.....	86
4.6 Segundo ensaio de imunização e desafio com leptospiras em hamsters....	91
4.6.1 Desafio com leptospiras e análise da sobrevivência dos hamsters.....	91
4.7 Dosagem de anticorpos anti-LigA por ELISA cinético do segundo ensaio de imunização.....	96
4.8 Reconhecimento de LPS de leptospiras por anticorpos induzidos pela imunização com LPS de leptospiras ou com a vacina comercial.....	100
4.9 Reconhecimento dos anticorpos induzidos pela imunização com a vacina comercial por proteínas de extratos de leptospira.....	102
5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS.....	118

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose

A leptospirose é uma doença causada por bactérias espiroqueta do gênero *Leptospira*, que afeta milhões de pessoas no mundo (FAINE; SOLLY et al., 1999; GANOZA et al., 2006, SOLLY et al., 1999). A infecção em humanos ocorre principalmente através de água contaminada por urina de ratos portadores da bactéria (CHEVILLE; HUHN; CUTLIP, 1980). A doença ocorre, sobretudo, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento e prevalece em locais de clima tropical (GANOZA et al., 2006). O crescimento urbano desordenado e a falta de saneamento básico favorecem a presença desses roedores e a disseminação da doença, principalmente nos períodos de chuvas e enchentes (HOTEZ; FERRIS, 2006). Outros animais, tais como bovinos, suínos e caprinos também podem ser infectados e desenvolver a doença, resultando em grandes perdas para a pecuária (SLACK, 2010).

No Brasil, o número de infecções por leptospira alcança 5000 casos por ano e os casos fatais podem chegar a 25% do número de infecções registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Estima-se que ocorram 350.000 a 500.000 casos severos de leptospirose em humanos todos os anos no mundo. Estes números podem ser subestimados uma vez que os sintomas da leptospirose são confundidos com outras doenças (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

A leptospirose pode se manifestar de duas formas distintas, anictérica ou icterica. A forma anictérica é caracterizada por febre alta contínua, calafrios, dores de cabeça, dores musculares e abdominais, diarreia, náuseas e vômitos. A forma icterica, mais grave, também conhecida como síndrome de Weil, é caracterizada por icterícia, insuficiência renal, distúrbios hemorrágicos e alta mortalidade (FAINE, S. et al., 1999; TREVEJO et al., 1998;).

O número de casos de leptospirose é certamente subestimado devido às dificuldades de diagnóstico (KO et al., 1999). Na fase inicial da doença, o diagnóstico pode ser feito por visualização microscópica da bactéria no sangue, por cultivo da leptospira em meio apropriado ou detecção do DNA da bactéria por PCR. Em uma fase tardia, a bactéria pode ser coletada de urina, líquido ou sangue e cultivada *in vitro*. O crescimento da bactéria *in vitro* é lento, demorando em média

quatro semanas. Portanto, este tipo de diagnóstico não consegue acompanhar o desenvolvimento da doença (BROWN et al., 1995; ZUERNER; ALT; BOLIN, 1995). Após sete dias da infecção, quando começam a aparecer os sintomas da doença, é possível fazer a detecção de anticorpos, nesta fase o teste mais comum é o ELISA-IgM. É possível também fazer o teste de microaglutinação (MAT), entretanto o MAT necessita de manutenção das cepas marcadoras.

1.2 Vacinas contra leptospirose

As leptospiras, após a infecção, têm capacidade de se translocar rapidamente entre as células do hospedeiro, atingir a corrente sanguínea, se disseminar e colonizar alguns órgãos (BAROCCHI et al., 2002), a leptospira ainda consegue evadir-se do sistema imune do hospedeiro. Essas características da bactéria somadas à existência de grande variedade de sorovares determinam sérias dificuldades no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a leptospirose (WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Existem vacinas contra leptospirose para humanos que são baseadas em bacterinas, resultando em imunização efetiva, mas específicas contra os sorovares presentes nas formulações. Outro problema é que a proteção conferida por vacinas baseadas em bacterinas é de curta duração, o que possivelmente está relacionado às respostas imunes inatas contra a porção lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004).

Vacinas proteicas apresentam vantagem em relação a antígenos polissacarídicos, uma vez que se poderiam utilizar proteínas conservadas entre diferentes sorovares de leptospira, induzindo proteção de mais amplo espectro. Antígenos proteicos também induzem resposta imune adaptativa e de mais longa duração. Portanto, no desenvolvimento de vacinas são estudadas proteínas com alta capacidade antigênica e que induzam imunidade protetora.

No desenvolvimento de uma vacina ideal contra a leptospirose procuram-se as características: a - induzir resposta imune duradoura; b - capaz de induzir proteção eficiente contra septicemia; c - capaz de evitar a colonização renal pela bactéria; d - formulações não reatogênicas ou endotóxicas.

1.3 Adjuvantes vacinais

Os adjuvantes vacinais têm o papel de aumentar a produção de anticorpos ou modular a resposta imune entre imunidade de mucosa, humoral e celular e são usados para melhorar a capacidade protetora da imunização (MBOW et al., 2010).

Poucos adjuvantes são licenciados para o uso em humanos, podendo-se citar sais hidrato de alumínio, AS04 (adjuvante system) e emulsões de água e óleo (MF59) (O'HAGAN; DE GREGORIO, 2009).

O alumínio é o adjuvante mais utilizado nas vacinas por promover estabilidade e imunogenicidade dos antígenos, aumentando a produção de anticorpos (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008). O adjuvante AS04, uma mistura de monofosforil lipídeo A (MPLA) de salmonelas e alumínio que auxiliam em uma resposta rápida e local por ativação das células apresentadoras de antígenos (APC), induzindo a produção de NF- κ B e outras citocinas, devido à resposta imune inata (DIDIERLAURENT et al., 2009).

O MPLA de *Salmonella minnesota*, uma subfração do LPS da bactéria, tem sido usado como adjuvante vacinal em humanos (TAGLIABUE; RAPPUOLI, 2008) e estudos clínicos mostram que esta molécula é um agonista do Toll like receptor 4 (TLR4), apresentando boas respostas como adjuvante em vacinas contra *Pseudomonas aeruginosa* e vírus influenza (ROMERO et al., 2011). O MPLA de *Bordetella pertussis* também foi estudado como adjuvante em vacina contra vírus da influenza (QUINTILIO et al., 2009).

Em nosso laboratório, investigamos antígenos de leptospiros com potencial vacinal selecionados *in silico*, sobre o genoma da bactéria (GAMBERINI et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2004). Nesse contexto, investigamos o potencial adjuvante de MPLA de salmonelas e MPLA de leptospiros na modulação da resposta imune em formulações que contenham os antígenos proteicos com potencial vacinal contra leptospirose.

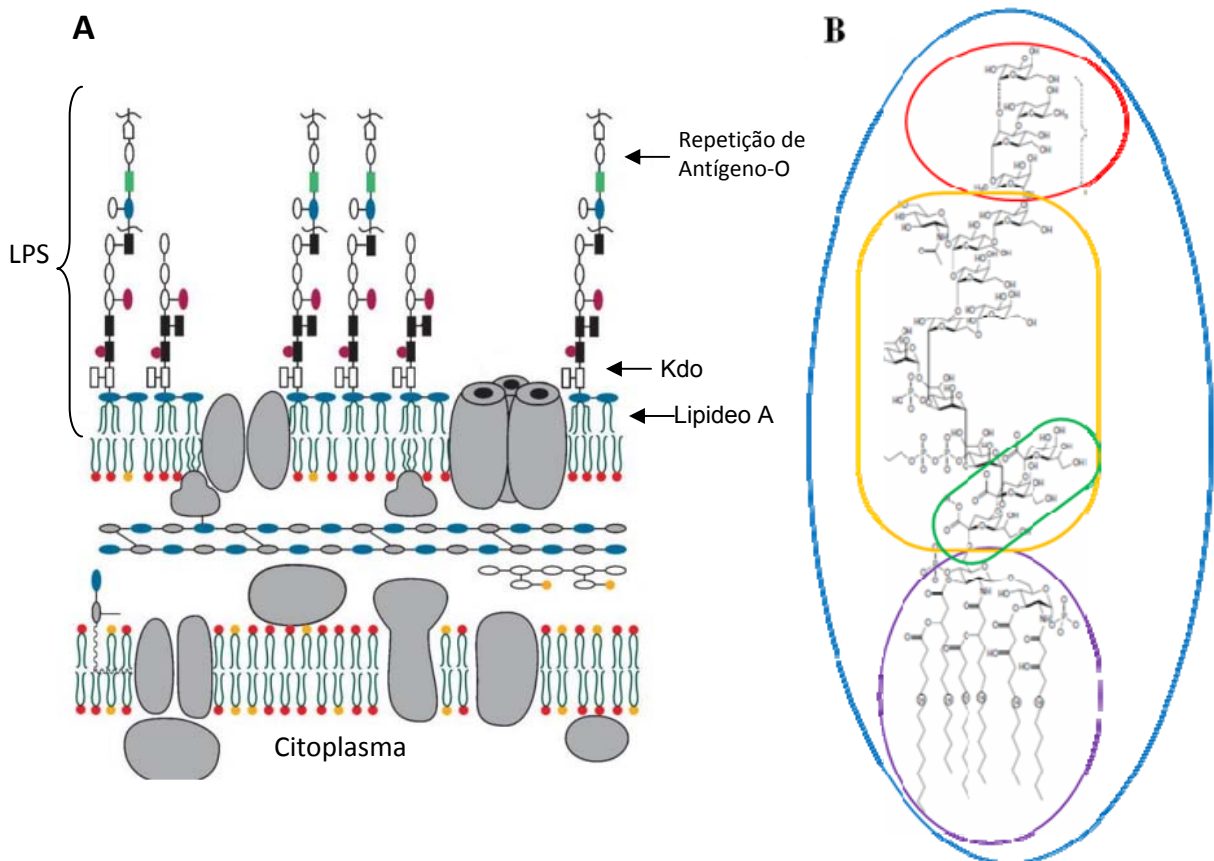
1.4 Caracterização de LPS, lipídeo A e MPLA

O LPS é o componente majoritário nas membranas de superfície das bactérias Gram-negativas. Esta molécula é um composto tóxico para mamíferos, sendo o causador de sintomas como febre, diarreia, choque séptico e morte (EL

HAMIDI et al., 2005). A Figura 1 apresenta um esquema das membranas interna e externa de bactérias Gram negativas.

A molécula possui três regiões distintas: (a) a porção lipídeo A, com açúcares glicosamina ligados a lipídeos compondo a membrana celular, (b) um core central polissacarídico e (c) uma porção de polissacarídeos específicos (PS) ligados ao core por oxigênio, denominada antígeno-O.

Figura 1 – **(A)** Esquema da estrutura de membranas de bactérias Gram-negativas. **(B)** Modelo do LPS de salmonela



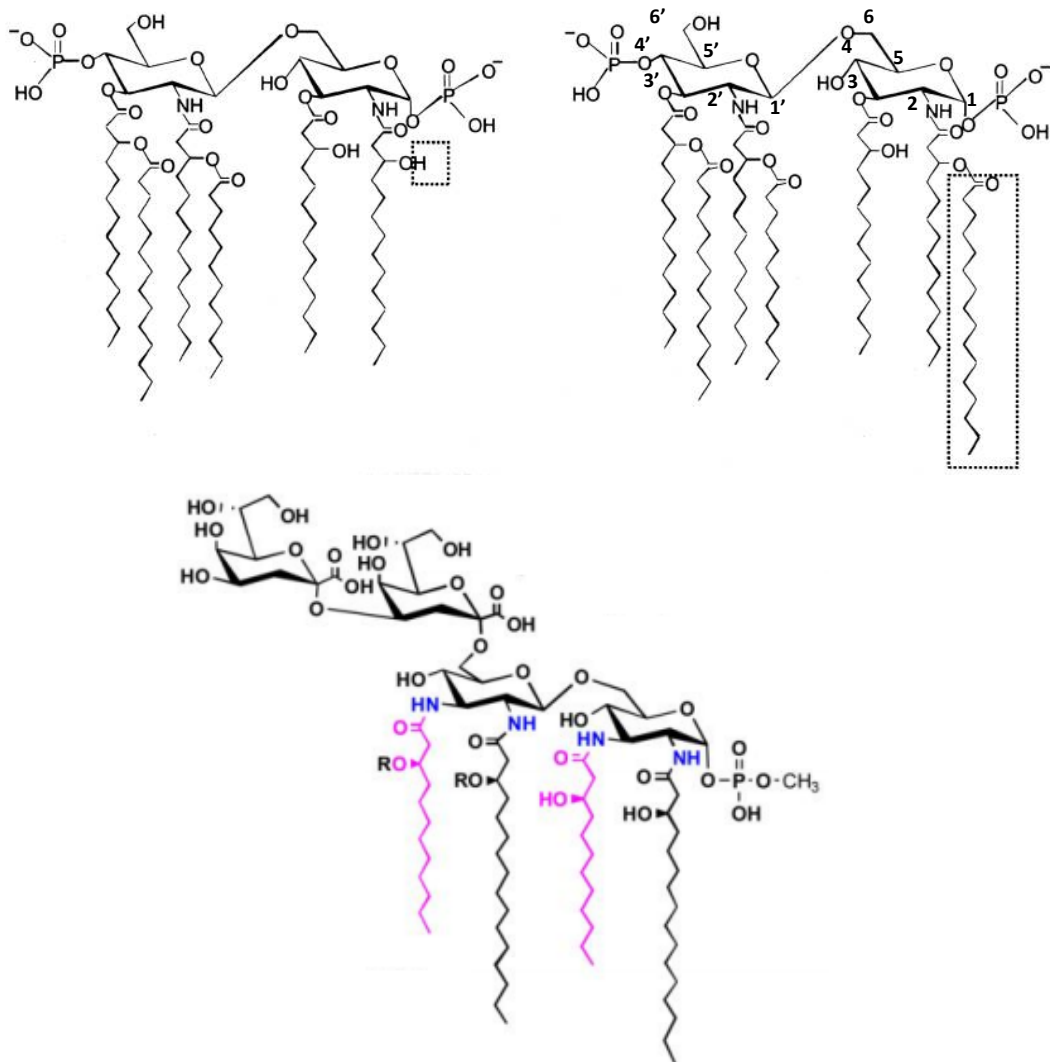
(A) Esquema da estrutura de membranas de bactérias Gram-negativas (RAETZ et al., 2009) **(B)** Modelo de LPS de salmonela (WILKINSON, 1996). O círculo violeta está sobre o esquema do lipídeo A, círculo verde está sobre a região do KDO; círculo laranja destaca o núcleo conservado de açúcares e, círculo vermelho indica porção polissacarídica (antígeno-O)

O lipídeo A é a porção responsável pela atividade endotóxica do LPS (GALANOS; FREUDENBERG et al., 1984), enquanto a porção antígeno-O é responsável pela indução de anticorpos específicos, os quais são usados para a classificação dos sorovares bacterianos através de reconhecimento específico de

anticorpos ao LPS, desta forma mais de 260 sorovares de leptospiras foram identificados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BULACH et al., 2000).

O LPS da maioria das bactérias Gram-negativas possui lipídeo A com dois grupos fosfatos, ligados aos açúcares glicosaminas proximal (posição 1) e distal (posição 4') (Figura 2) (RAETZ et al., 2007).

Figura 2 - Diferenças estruturais entre moléculas de lipídeo A.



E. coli (esquerda) e de *Salmonella* (direita) (MUROI; OHNISHI; TANAMOTO, 2002). Estrutura monofosforil lipídeo A de *Leptospira interrogans* (abaixo) (ROBINS; WILLIAMS; RAETZ, 2009).

A porção lipídeo A do LPS de leptospiras apresenta-se atípica em relação a outras bactérias Gram-negativas: seu lipídeo A pode apresentar entre quatro a seis cadeias lipídicas, de diferentes comprimentos com ligações insaturadas; quatro cadeias lipídicas são ligadas às glicosaminas por amidas; possui somente um grupo fosfato metilado na posição 1 do açúcar proximal (QUE-GEWIRTH et al., 2004). A

endotoxicidade do lipídeo A de leptospiras é cerca de 100 vezes menor quando comparado ao lipídeo A de outras bactérias Gram-negativas, o que se confirma por não promover coagulação de limulus, a reação típica de dosagem de endotoxina (NAHORI et al., 2005).

1.5 Ativação do sistema imune de mamíferos por LPS e seus derivados

Toll like receptors (TLRs) são proteínas presentes na superfície de células do sistema imune de mamíferos que interagem com componentes bacterianos conservados, tal como LPS, resultando na ativação do sistema imune (FITZGERALD; ROWE; GOLENBOCK, 2004; NAHORI et al., 2005; PARK et al., 2009; WERTS, 2010). Muitos estudos vêm esclarecendo a complexidade da resposta imunológica ao LPS e seus derivados, revelando uma intrincada rede de informações moleculares entre as células do hospedeiro (AYBAY; IMIR, 1998; BEUTLER, 2004; KAWAI; AKIRA, 2011). O reconhecimento do LPS pelos receptores celulares é traduzido em sinais que comandam a produção de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e outros fatores associados tanto à inflamação quanto às respostas imunes, resultando em efeito tóxico ou de proteção imune contra os patógenos bacterianos (ROMERO et al., 2011).

A topografia do complexo LPS /moléculas adaptadoras /TLR4 foi estudada por cristalografia, como esquematizado na Figura 3. A estrutura do TLR4 que engloba a porção lipídeo A da molécula de LPS é chamada de “pocket” (PARK et al., 2009).

O LPS da maioria das bactérias Gram negativas ligam-se principalmente ao TLR4 (GORIS et al., 2011; NAHORI et al., 2005; WERTS, 2010), entretanto, o LPS de leptospira liga-se principalmente ao receptor TLR2 de células humanas (WERTS et al., 2001). Outros estudos também indicaram que há interação do LPS de leptospira com TLR2, TLR4 e TLR5 e que resulta em produção de IL-6 e TNF- α (GORIS et al., 2011).

uso como adjuvante (ROMERO et al., 2011). Esta molécula também interage com as proteínas adaptadoras e o receptor TLR4, mas sinalizam diferentes vias da resposta imune, não induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como NF- κ B, IL-1, IL-6, TNF- α , mas mantendo ou até aumentando fatores e atividades relacionadas com resposta imune celular (COATS et al., 2011; MATA-HARO et al., 2007; ROMERO et al., 2011).

Lipídeo A e MPLA podem ser obtidos por hidrólise de LPS, as condições de hidrólise podem determinar a perda de cadeias lipídicas ou de um grupo fosfato, gerando preparações heterogêneas de lipídeo A com moléculas que podem ser agonistas, antagonistas ou inativas na interação com os receptores (KARIBIAN; DEPRUN; CAROFF; 1993). Diferenças estruturais do lipídeo A, como número e posição dos grupos fosfatos ou cadeias lipídicas, determinam diferentes propriedades imunológicas (AYBAY; IMIR, 1998; COATS et al., 2011).

1.6 Modificação de LPS de salmonela pela enzima heteróloga LpxE

Foi mostrado que o lipídeo A pode ser obtido monofosforilado em salmonelas recombinantes expressando a proteína LpxE de *Francisella tularensis*. LpxE (lipídeo A 1-fosfatase) é uma enzima que remove o grupo fosfato da posição 1 do lipídeo A (Figura 2). Para diminuir a endotoxicidade de salmonelas usadas como vacinas vivas, o gene *lpxE* foi inserido no microrganismo para expressão constitutiva, resultando em efetiva defosforilação do lipídeo A do LPS na membrana externa do microrganismo durante o cultivo (KONG et al., 2011).

1.7 Antígenos vacinais contra leptospirose

Diversas proteínas de leptospira têm sido investigadas com relação ao seu potencial vacinal. Neste estudo utilizamos os antígenos recombinantes LigA e OmpA.

Proteína LigA (leptospiral immunoglobulin – like protein) - está presente na membrana externa da leptospira e possui atividade antigênica, sendo reconhecida por soro de pacientes infectados. A proteína LigA é conservada entre os sorovares patogênicos de leptospira e a perda de expressão do gene está relacionada com perda de virulência (MATSUNAGA et al., 2003). Estudos anteriores do laboratório e

descritos na literatura (SILVA et al., 2007) mostraram que a imunização de hamsters com LigA resulta em alta proteção contra a leptospirose, embora não seja eficiente para evitar a colonização renal e assim determinar proteção esterilizante.

LigA possui domínios de aproximadamente 85 aminoácidos similares a imunoglobulinas de bactérias. Essa proteína tem a capacidade de se ligar a proteínas da matriz extracelular e a fibrinogênio sugerindo que estão envolvidas na colonização inicial e disseminação das leptospiras no hospedeiro (CHOY et al., 2007). A proteína nativa possui aproximadamente 128 kDa, proteínas de alto peso molecular são geralmente difíceis de purificar. Entretanto, neste trabalho, clonamos apenas a porção C-terminal da proteína (LigAc), com aproximadamente 62 kDa. A proteína LigAc foi capaz de induzir proteção contra infecção em hamsters imunizados (SILVA et al., 2007).

Proteína Omp A (Outer membrane protein) - também chamada Loa22, está presente na maioria das bactérias Gram-negativas ancorada aos peptidoglicanos. OmpA está envolvida em diversas funções da célula, tais como adesão celular, invasão tecidual (TENG et al., 2006) e atua na entrada e saída de solutos na célula (FINDLAY; MCCLAFFERTY; ASHLEY, 2005). Estudos prévios do laboratório demonstraram que OmpA de leptospira induziu proteção parcial dos hamsters contra leptospirose, corroborando dados da literatura (NALLY et al., 2007; TORRES et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Na linha de pesquisa “desenvolvimento de vacinas contra a leptospirose”, o objetivo deste projeto foi investigar a capacidade de MPLA de salmonelas e de leptospiras como adjuvante vacinal em formulações com antígenos OmpA e LigA.

2.2 Objetivos específicos

Para cumprir os objetivos gerais do projeto de mestrado as etapas específicas de trabalho foram:

- 1- Estudar diferentes métodos de extração de LPS e de hidrólise para obtenção de MPLA de salmonela e de leptospiras
- 2- Geração de clones de salmonela recombinante para promover modificação do componente lipídeo A do LPS em monofosforil lipídeo A, durante o cultivo do microrganismo.
- 3- Preparar os antígenos proteicos recombinantes de leptospira considerados bons candidatos vacinais, OmpA e LigA, garantindo baixos níveis de LPS contaminante.
- 4- Estudar a resposta imune em hamsters imunizados com as formulações de antígenos com ou sem MPLA como adjuvante, avaliando:
 - a- a indução de anticorpos contra os antígenos proteicos.
 - b- A proteção conferida contra leptospirose com relação a sobrevivência dos animais e à proteção contra colonização renal.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias e plasmídeos

Tabela 1 – Linhagens de bactérias utilizadas

Bactéria	Características
<i>E. coli</i> DH5α	Para a amplificação de plasmídeos
<i>E. coli</i> BL21(DE3) StarpLysS	Possui gene T7 RNA polimerase integrado no cromossomo induzível por IPTG. Usada para expressão de genes recombinantes clonados sob controle do promotor T7
<i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium SL4213	Usada para a transferência dos plasmídeos de <i>E. coli</i> para a salmonela vacinal. Possui genótipo deficiente no sistema de restrição de reconhecimento de DNA exógeno
<i>Salmonella enterica</i> sv Typhimurium SL3261	Genótipo (Lt2 <i>aroA</i> ⁻); linhagem vacinal para camundongos, atenuada por mutação no gene <i>aroA</i> . Utilizada para expressão das proteínas <i>in vivo</i>
<i>E. coli</i> BL21DE3 pAE_ligAc	BL21DE3 para produção de LigAc recombinante
<i>E. coli</i> BL21DE3 pAE_lpxE	BL21DE3 tese de expressão de LpxE recombinante
SL3261_pAE_ligAc*	Clone controle sem capacidade de expressão de LigAc
SL3261_pAE _{nir} _ligAc*	Clone para expressão de LigAc <i>in vivo</i> , na condição de baixa tensão de oxigênio
SL3261_pAE _{lpp} _lpxE*	Clone para expressão constitutiva de LpxE e obtenção de LPS com lipídeo A monofosforilado
SL3261_pAE _{sox} _lpxE*	Clone para expressão induzível de LpxE e obtenção de LPS com lipídeo A monofosforilado
<i>Leptospira interrogans</i> sv Copenhageni L1-130	Linhagem virulenta usada para desafio em hamsters
<i>Leptospira interrogans</i> sv Copenhageni estirpe 10A	Linhagem com virulência atenuada, por manutenção em cultura, usada para extração de LPS

* clones preparados neste trabalho

Tabela 2 – Vetores e primers utilizados

Vetor/Primer	Características
Vetor pAE	Possui pUC ori, gene <i>bla</i> (Amp ^R), sítio RBS, código de iniciação seguido de código para 6 histidinas e sítio de múltiplas clonagens
Vetor pAEsox*	Modificação do vetor pAE por inserção do locus soxRS para expressão de genes sob controle do promotor soxS, induzível in vitro por paraquat
Vetor pAEnir*	Modificação do vetor pAE, por inserção do promotor nirB (nitrito oxidase de <i>E. coli</i>) para expressão de genes in vivo ou in vitro em anaerobiose
Plasmídeo pMAIpp_lpxE	Sequência do promotor lpp e do gene lpxE de <i>Francisella tularensis</i> otimizada para expressão em salmonela. Sequência sintetizada e clonada em vetor pMA-T pela empresa Life Technologies
Plasmídeo pAEIpp_lpxE*	Vetor pAE com gene <i>lpxE</i> sob controle do promotor constitutivo lpp
Plasmídeo pAE_lpxE*	Para expressão da proteína LpxE sob controle do promotor T7, em <i>E. coli</i> BL21DE3 com gene T7-RNA polimerase induzível por IPTG
Plasmídeo pAEsox_lpxE*	Para expressão da proteína LpxE por adição de paraquat a cultura
Plasmídeo pAE_ligAc	Para expressão de LigAc sob controle do promotor T7 em <i>E. coli</i> BL21DE3, (cedido pela Dra. Patrícia Abreu Estima)
Plasmídeo pAEnir_ligAc*	Para expressão da proteína LigA in vivo sob condições de anaerobiose
Primer T7	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
Primer Prset reverse	5' ATGCTAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'
Primer lpxEintR:	5' GGAAGTGCTGGAAGTAGTGA 3'

* plasmídeos preparados neste trabalho

3.2 Cultivo das bactérias

3.2.1 Cultivo de bactérias *E. coli* DH5 α ou BL21(DE3)StarpLysS e de salmonelas SL4213 ou SL3261

Meio de cultivo

- Meio 2YT (pH 7,0): 1,6% Triptona, 1% extrato de levedo, 0,5% cloreto de sódio em água.

Os cultivos de *E. coli* e salmonelas foram feitos em meio 2YT para preparo de plasmídeos, expressão de proteínas recombinantes ou extração de LPS. Os cultivos foram feitos, geralmente, com um pré-inóculo em 10 mL de meio a partir de alíquotas das bactérias armazenadas a -80 °C. Os cultivos foram mantido a 37 °C sob agitação por 16 horas e então diluídos em 500 mL de meio 2YT.

3.3 Preparo de bactérias competentes e transformação

3.3.1 Preparo de *E. coli* competente por CaCl₂

Meios de cultivo e soluções

- Meio 2YT (pH 7,0): 1,6% Triptona, 1% extrato de levedo, 0,5% cloreto de sódio em água.

- Meio 2YTágar: 1,5% de select-ágar em meio de cultura líquido.

- Meio 2YTamp: 2YT com ampicilina 100 μ g/ ml.

- Solução de MgCl₂ 1 M.

- RF I: KCl 1 M, MnCl₄.2H₂O 1 M, acetato de potássio 0,5 M, CaCl₂. 2H₂O 1 M, glicerol 15%.

- Solução RFII - KCl 0,5 M, CaCl₂. 2H₂O 1 M, Na-MOPS 0,5 M pH 7,0, glicerol 15% em água milliQ.

As bactérias *Escherichia coli* DH5 α e BL21 DE3 foram estriadas em placa de 2YTágar e mantidas a 37°C por 16 horas. Uma colônia foi isolada, transferida para 5 mL de meio 2YT e incubada a 37 °C por 16 horas sob agitação.

O inóculo foi diluído em 100 mL de meio 2YT e incubado a 37 °C sob agitação até atingir $DO_{600} = 0,6$. Foi adicionado à cultura 4 mL de solução de cloreto de magnésio 1 M e incubada no gelo por 15 minutos. As células foram separadas por centrifugação 3200 G por 10 minutos a 4 °C. O sedimento foi ressuspensão em 20 mL de meio hipotônico gelado contendo cloreto de cálcio (solução RFI). As células foram novamente separadas por centrifugação por 15 minutos a 4 °C e o procedimento repetido. As células foram ressuspensas em 1 mL de solução RF II gelada. A suspensão foi dividida em alíquotas de 50 μ L e estocadas à -80 °C. Essas alíquotas são consideradas viáveis por alguns meses (MANIATIS, 1982)

3.3.2 Transformação de bactérias competentes por choque térmico

Meios de cultivo e soluções

- Meio 2YT (pH 7,0): 1,6% Triptona, 1% extrato de levedo, 0,5% cloreto de sódio em água.
- Meio 2YTágar: 1,5% de select-ágar em meio de cultura líquido.
- Meio 2YTamp: 2YT com ampicilina 100 μ g/ ml.

O método de transformação de bactérias competentes por choque térmico foi descrito por Maniatis (MANIATIS, 1982). Uma alíquota de bactérias competentes *E. coli* DH5 α e *E. coli* BL21(DE3)StarpLysS foi descongelada mantendo-se sempre em gelo; foi adicionado DNA plasmidial (1 a 10 μ L) mantendo-se a mistura em gelo por 30 minutos. A mistura foi transferida para banho a 42 °C por exatamente 2 minutos e novamente levada ao gelo por 5 minutos. A bactéria transformada recebeu 450 μ L de meio 2YT já pré-aquecido (37 °C) e a suspensão foi incubada por 90 minutos a 37 °C. A mistura foi plaqueada em 2YTágar com ampicilina em uma concentração de 100 μ g/ mL, bactérias transformadas são selecionadas por plaqueamento da suspensão bacteriana (25 a 200 μ L) e as placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. Colônias isoladas foram inoculadas em meio 2YTamp para congelamento dos clones e para isolamento dos plasmídeos.

3.3.3 Preparação de *S. enterica* Typhimurium eletrocompetentes

Meios de cultivo e soluções

- Meio 2YT (pH 7,0): 1,6% Triptona, 1% extrato de levedo, 0,5% cloreto de sódio em água.
- Meio 2YTágar: 1,5% de select-ágar em meio de cultura líquido.
- Solução estéril de glicerol 10%.

Cultivo de salmonela foi estriado em placa de 2YTágar e incubadas a 37 °C por 16 horas. Uma colônia isolada foi inoculada em 5 mL de meio 2YT e incubada por mais 16 horas a 37 °C sob agitação.

O inóculo foi diluído em 80 mL de 2YT, incubado a 37 °C sob agitação até $DO_{600} = 0,4$ em comprimento de onda 600 nm. O meio de cultura foi centrifugado a 2500 G por 20 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas com glicerol 10% estéril e gelado, esta lavagem foi feita com volumes que variavam de 20 mL a 5 mL intercaladas por série de centrifugações a 1500 G por 20 minutos a 4 °C, com o objetivo de eliminar o meio de cultura e também diminuir a força iônica da suspensão bacteriana. A suspensão final foi dividida em alíquotas de 50 μ L.

3.3.4 Transformação de salmonelas pelo método de eletroporação

Equipamento e meios de cultivo

- Eletroporador (Biorad).
- Meio 2YT (pH 7,0): 1,6% Triptona, 1% extrato de levedo, 0,5% cloreto de sódio em água.
- Meio 2YTágar: 1,5% de select-ágar em meio de cultura líquido.
- Meio 2YTamp: 2YT com ampicilina 100 μ g/ ml.
- Meio SOB: 1,6% Triptona, 0,4% extrato de levedo, 0,5% cloreto de sódio, 0,02% cloreto de potássio em água.
- Meio SOC: adicionar glicose para concentração final 0,36% em meio SOB

Alíquotas de *Salmonella typhimurium* SL4213 e SL3261 eletrocompetentes foram usadas imediatamente após o preparo. A suspensão de bactérias

eletrocompetentes com o DNA plasmidial foi submetida a voltagem 2,5 KV, 200 OHMS e 25 μ FD por aproximadamente 4 a 5 segundos (eletroporador Biorad), promovendo a internalização dos plasmídeos. Em seguida, foram adicionados 350 μ L de meio SOC pré-aquecido e a suspensão incubada por 90 minutos a 37 °C. As células foram plaqueadas em 2YTágar com ampicilina (25 a 200 μ L) e as placas incubadas a 37 °C por 16 horas (O'CALLAGHAN; CHARBIT, 1990). Colônias isoladas foram inoculadas em meio 2YTamp para congelamento dos clones em glicerol.

3.4 Cultivos de bactérias recombinantes para expressão de proteínas

Meio de cultivo e soluções

- Meio de cultura: 2YT com ampicilina 100 μ g/ mL.
- Indutores: isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG).
- Dicloreto de metil viologen hidratado (paraquat).
- Solução para lise: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0.

Para preparo de proteínas recombinantes, foi feito um pré-inóculo em 10 mL de meio 2YT em presença de antibiótico a partir de uma alíquota da bactéria armazenada a -80 °C. O cultivo foi mantido a 37 °C com agitação por 16 horas e então diluído em 500 mL de meio 2YT. Quando atingiram $DO_{600nm} = 0,5$ os cultivos receberam os indutores (IPTG ou Paraquat) e foram mantidos por 4 a 8 horas. As células foram separadas por centrifugação e os sedimentos armazenados para a purificação de proteínas ou para os testes de expressão.

3.5 Cultivo de bactérias para extração de LPS

3.5.1 Cultivo de *Salmonella enterica* sv Typhimurium SL3261 e *Leptospira interrogans* sv Copenhageni 10A

Meios de cultivo e equipamento

- Meio EMJH 0,23% de meio EMJH (BD Difco) com 10% de suplemento (BD Difco).
- Meio EMJH 0,23% de meio EMJH (BD Difco).

- Liofilizador Thermo Electro Corporation.

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni 10A, com virulência atenuada por manutenção em cultura, foi cultivada em meio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris) com suplemento para extração de LPS. O meio EMJH contém cloreto de amônio, nitrogênio, tiamina, polisorbato 80, albumina e cloreto de sódio para osmolaridade da célula. Os cultivos de leptospira foram auxiliados e cedidos pelo grupo do laboratório do Dr. Silvio Arruda Vasconcellos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP. Inicialmente, as culturas com volumes de 10 mL foram diluídas em 90 mL de meio de cultura e após sete dias, este cultivo de 100 mL foi transferido para 900 mL do mesmo meio. Esta última etapa foi repetida durante dez semanas. As bactérias possuem crescimento lento e foram mantidas em estufa a 30 °C com leve agitação por 7 dias. Após esse período, os cultivos foram analisados em microscópio de campo escuro para contagem das bactérias e visualização de possíveis contaminantes. Vários cultivos de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni 10A em meio EMJH com suplemento foram feitos para obtenção de massa de células. Os cultivos foram centrifugados em 15000 G por 30 minutos a 4 °C, as células foram ressuspendidas em meio EMJH sem suplemento. As suspensões celulares foram centrifugadas novamente e os sedimentos foram armazenados em freezer -80 °C para posterior liofilização.

As massas celulares congeladas foram liofilizadas em tubos de 50 mL em equipamento Thermo Electro Corporation por 30 horas

3.5.2 Cultivo de *Salmonella enterica* sv Typhimurium SL3261 para extração de LPS

Meio de cultivo e solução

- 2YT: Triptona 1,6% triptona, 1% extrato de levedura e 0,5% NaCl.

- Solução tampão fosfato-salina (PBS): cloreto de potássio 1,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato de sódio monobásico 8 mM, fosfato de sódio monobásico 1,5 mM.

Para o cultivo de Salmonela, foi feito pré-inóculo em 10 mL de meio 2YT a partir de alíquota da bactéria armazenada a -80 °C. O cultivo foi mantido a 37 °C sob agitação por 16 horas e então diluído em 500 mL de meio 2YT. As células foram separadas por centrifugação a 4500 G por 20 minutos em 10 °C e o sedimento

celular foi ressuspensionado em tampão fosfato salina (PBS). A suspensão celular foi novamente centrifugada e os sedimentos foram liofilizados e conservados em -80 °C.

3.6 Preparação de LPS de *Salmonella enterica* sv Typhimurium SL3261 e de *Leptospira interrogans* sv Copenhageni 10A

3.6.1 Extração de LPS

Equipamentos e soluções

- Agitador (Omni mixer homogenizer).
- Centrífuga (Sorvall).
- Banho maria (Labconco).
- Membrana para diálise corte de 3500 peso molecular (Snake skin Pleated Dialysis Tubing – Thermo Scientific).
- Fenol (Merck) 90%.
- Água do tipo WFI (water for injection).

Sedimentos bacterianos liofilizados foram usados para extração de LPS pelo método adaptado de fenol-água descrito anteriormente (GALANOS; LÜDERITZ; WESTPHAL, 1969). Todo o material usado nessas extrações foi lavado com solução de NaOH 1 M e enxaguado com água purificada (MilliQ) ou água para injetáveis. No primeiro ensaio de imunização, dada à dificuldade de obtenção de massa celular de cultivos de leptospira, foram feitas extrações também do LPS de vacinas comerciais. As vacinas bovina (Leptoven 10 - Vencofarma) e equina (Lepto Equus - Vencofarma) são bacterinas compostas de diferentes sorovares de leptospiros (*Icterohaemorrhagiae*, *Canicola*, *Copenhageni*, *Pomona*, *Wolffii*, *Grippothyphosa*, *Tarassovi*, *Hardjo*, *Pyrogenes* e *Bataviae*, Bratislava, Pajitno, Andamana, Ballum) e a imunização é baseada no LPS específico dos sorovares. Durante o processo de fabricação, as bactérias são inativadas por calor e formol.

As massas de bactérias foram pesadas e dissolvidas com água para injetáveis na proporção 6 mL para 180 mg de massa. A mesma quantidade de fenol 90% foi adicionada e a suspensão homogeneizada por agitação vigorosa (Omni Mixer) em banho-maria a 70 °C por 10 minutos.

Para extração de LPS de vacinas comerciais, utilizamos 40 mL da vacina liofilizada que resultou em 0,624 g de massa. A extração foi feita com o mesmo protocolo utilizado para os sedimentos celulares. Adicionamos 5 mL de fenol 90% e 5 mL de água a 70 °C.

A suspensão fenol água foi resfriada a 15 °C e centrifugada a 3000 G, por 30 minutos. Foram separadas as frações fenólica e aquosa, dispensando-se os sedimentos. As frações fenólicas e aquosas foram dialisadas contra 100 volumes de água do tipo WFI, realizando-se trocas duas vezes ao dia, durante três dias.

3.6.2 Análise do LPS por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo ureia (ureia_SDS-PAGE) e coloração por prata

Equipamentos

- Fonte para eletroforese (Biorad).
- Cuba de eletroforese (Biorad).

Gel de separação

- Acrilamida 30%: 29% acrilamida (Sigma) e 1%bis acrilamida (Sigma).
- Ureia acrilamida: na solução de acrilamida adicionar ureia 4M (Synth) para concentração final de 24%.
- Tampão Tris-HCl pH 8,8: tampão Tris-HCl 1,5 M e 0,1% SDS, pH 8,8.
- TEMED – N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamine.
- Solução de persulfato de amônio: persulfato de amônio 10%.

Gel de empilhamento

- Acrilamida 30%: 29% acrilamida 1%e bis acrilamida.
- Tampão Tris-HCl pH 6,8: tampão Tris-HCl 0,5 M e SDS 0,1%, pH 6,8.
- TEMED – N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamine.
- Solução de persulfato de amônio: persulfato de amônio 10%.
- Tampão de corrida: tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 0,1% SDS, pH 8,3.

Preparo de amostra

- Tampão de amostra redutor 5X: 10% Tris-HCl 50 mM pH 6,8, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, β -mercaptoetanol 100 mM, 0,1% SDS.

- Solução de fixação: 40% etanol e 5% ácido acético glacial.
- Solução de oxidação: adicionar 0,7% de ácido periódico (Chem Cruz) à solução de fixação.
- Reagente de coloração de prata: 1,5% hidróxido de amônio, 20% hidróxido de sódio 0,1N, 3% de solução de nitrato de prata 20%.
- Solução de revelação: 0,025% ácido cítrico, 0,025% formaldeído

O LPS extraído foi analisado por SDS-PAGE (acrilamida 15%) contendo ureia (4 M) submetido a uma corrente de 20 mA por 90 minutos e corado com prata (TSAI; FRASCH, 1982). O tampão de amostra redutor 5x foi adicionado às amostras, então foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e aplicadas no gel.

Os géis foram mantidos em solução de etanol e ácido acético por 16 horas para fixação. Em seguida, foi acrescentado 0,7% de ácido periódico à mesma solução e adicionada ao gel para a reação de oxidação, mantida sob agitação durante 5 minutos. Então, a solução foi descartada e o gel foi lavado com água deionizada três vezes durante 10 minutos. Em seguida, foi adicionado o reagente de coloração de prata por 10 minutos. O gel foi lavado novamente com água deionizada, e então a solução de revelação foi adicionada em agitação por aproximadamente 10 minutos até que as bandas se tornassem visíveis.

3.6.3 Quantificação de LPS por dosagem de KDO

Equipamentos e soluções

- Leitor de placa de ELISA (Spectra Max PC) com software SoftMax Pro 6.1 para análise de dados.
- Placa de ELISA (NUNC).
- Solução de Periodato de sódio 32 mM e 64 mM (Chem Cruz).
- Solução de Purpald 136 mM (Santa Cruz) dissolvido em NaOH 2 M.

Para quantificar o LPS de leptospira e salmonela nas preparações, o conteúdo de KDO (ácido 2-ceto-3-dexioctônico) foi dosado pelo método de Purpald (LEE; TSAI, 1999). Uma curva padrão com KDO comercial (Sigma Aldrich) foi feita e os resultados obtidos foram calculados pela equação da reta resultante das absorvâncias

Foram adicionados à placa de ELISA 10, 30 e 50 nmol de padrão de KDO e 20 e 40 µL de LPS de *Leptospira* e água para completar 50 µL de amostra. Em seguida, foram adicionados 50 µL metaperiodato de sódio 32 mM (Nuclear) e mantida ao abrigo de luz por 20 minutos. E então, foi adicionado 50 µL do reagente de Purpald (Santa Cruz) 136 mM, a placa foi mantida no escuro por 20 minutos e por último foi adicionado 50 µL de metaperiodato de sódio 64 mM e mantido ao abrigo de luz durante 20 minutos. Para retirar bolhas, foram adicionados 10 µL de álcool N-butílico e feito uma leitura em 550 nm no leitor de placa de ELISA.

3.7 Obtenção e análise de lipídeo A e MPLA

3.7.1 Hidrólise do LPS de salmonela e leptospira

Equipamentos e soluções

- Concentrador “speedvac” (Labconco).
- Solução acetato de sódio 125 mM e 250 mM pH 4,5 (acetado com NaOH 4 M) com 5% de SDS.
- Etanol 95% acidificado (HCl 4 M).
- Etanol 95% não acidificado.
- Clorofórmio: metano (4: 1).

O LPS de salmonela e leptospira foram submetidos à hidrólise com ácido brando para recuperação do MPLA, seguindo uma adaptação do protocolo de Yi e Hackett (2000). LPS de leptospira (1 mL) em uma concentração de aproximadamente 30 mg/ mL recebeu 100 µL de solução acetato de sódio 125 mM e LPS de salmonela na concentração de aproximadamente 50 mg/ ml recebeu 100 µL da solução de acetato de sódio 250 mM, as soluções de hidrólise foram ajustadas para o pH 4,5 com NaOH 4 M e continham SDS 5%. O LPS com a solução ácida foi mantido em banho-maria a 100 °C por uma hora. As amostras foram secas em “speedvac” e então ressuspensas em 100 µL de água e 500 µL de etanol 95% acidificado e mantidas em -20 °C por quatro horas para precipitação do MPLA. Em seguida, o LPS hidrolisado foi centrifugado a 12000 G durante 2 minutos e o sobrenadante foi descartado. As etapas de ressuspensão com etanol 95% não acidificado e centrifugação foram repetidas por duas vezes para remoção do SDS no

sobrenadante e recuperação do lipídeo A ou MPLA no sedimento. As amostras foram secas em “speedvac” e dissolvidas em clorofórmio: metanol (4:1).

3.7.2 Análise de MPLA por espectrometria de massa

O MPLA obtido a partir do LPS foi analisado por espectrometria de massa (KONG et al., 2011). As amostras de MPLA de *L. interrogans* Copenhageni 10A e *S. enterica* Typhimurium SL3261 foram dissolvidas em clorofórmio: metanol (4:1) e enviadas para a análise na Central Analítica do Instituto de Química - USP.

3.7.3 Análise do MPLA por TLC

Equipamentos e soluções

- Cuba para corrida.
- Placa HPTLC de sílica (Merck).
- Forno (Thermo Scientific).
- Fotodocumentador (EL Logic 2200 Imaging System) acoplado ao computador com programa Carestream.
- Aspersor.
- Bomba de vácuo (Fanem).
- Clorofórmio: piridina: ácido fórmico 88%: metanol: água (60:35:10:5:2-v:v:v:v).
- Solução de revelação: etanol com 10% ácido sulfúrico.

A análise do MPLA obtido foi feita por cromatografia de camada delgada (HPTLC - high performance thin layer chromatography) e amostra de MPLA comercial (Sigma Aldrich) foi usada como padrão. As placas de sílica (Merck) foram secas em forno por 1 hora a 150 °C e foi aplicado 2 µL das amostras dissolvidas em clorofórmio: metanol (4:1). A placa foi colocada em uma cuba usando como fase móvel solução de clorofórmio: piridina: ácido fórmico 88%: metanol: água (60:35:10:5:2-v:v:v:v), após a corrida, a placa foi revelada por tratamento de etanol com 10% ácido sulfúrico e colocada em forno a 150 °C por uma hora (QUEGEWIRTH et al., 2004). A imagem da placa foi registrada em fotodocumentador (EL Logic 2200 Imaging System) com luz trans UV e analisada com auxílio do programa Carestream.

3.7.4 Dosagem de fosfato nas frações de lipídeo A e MPLA

Equipamentos e soluções

- Bloco termodigestor (Cienlab).
- Banho maria (IKA HB 10 digital).
- Espectrofotômetro (Pharmacia Biotech).
- Ácido perclórico (HClO₄) (Merck).
- Soluções de 1,25% molibdato de amônio (Herzog) dissolvido a 80 °C.
- 3% Ácido ascórbico (Synth).

A dosagem de fosfato inorgânico foi usada para quantificar lipídeo A obtido das hidrólises de LPS e avaliar a extensão de hidrólise do fosfato. As dosagens foram feitas como descrito anteriormente (CHEN; TORIBARA; WARNER, 1956; ROUSER; FKEISCHER; YAMAMOTO, 1970). Resumidamente, uma solução padrão de KH₂PO₄ 1 mM foi usada para estabelecer duas curvas padrão de fosfato na faixa de 0 a 100 nmol, uma com as amostras digeridas e outra não digeridas. Todas as amostras foram preparadas em duplicatas em tubos de ensaio de vidro e foram totalmente secas em bloco termodigestor a 100 °C. Todas as amostras e padrões receberam 400 µL de ácido perclórico (HClO₄) e metade delas foi digerida em bloco termo digestor a 150 °C por 1 hora. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água, 400 µL de molibdato de amônio 1,25% dissolvido a 80 °C e 400 µL de ácido ascórbico 3%. Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C por 10 minutos e as absorbâncias de todas as amostras foram lidas em espectrofotômetro em 797 nm.

Curvas padrão foram estabelecidas com solução padrão 1 mM em amostras digeridas ou não. As equações determinadas foram usadas para calcular as massas de fosfato inorgânico nas amostras, sendo considerado fosfato orgânico a diferença entre as medidas nas amostras digeridas e não digeridas.

3.8 Geração do clone recombinante de SL3261 expressando a enzima LpxE

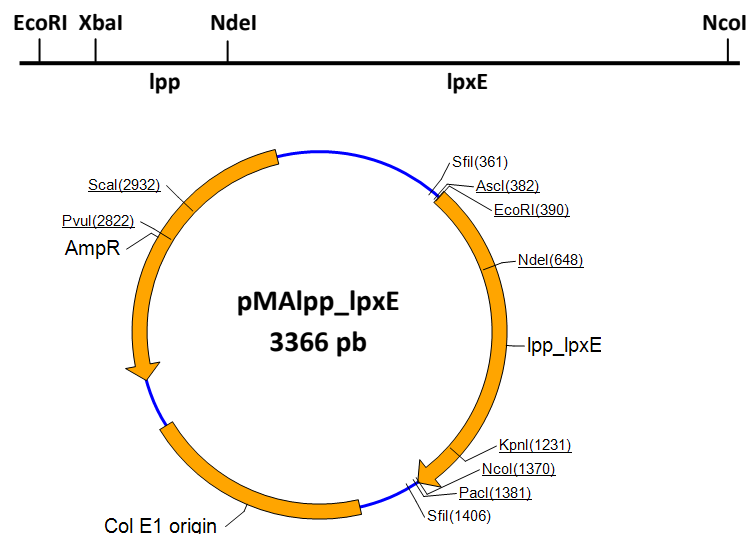
3.8.1 Construção do cassete de expressão lpp_lpxE

A sequência gênica de LpxE (lipídeo A 1-fosfatase) de *Francisella tularensis* subsp. novicida foi copiada do banco de dados NCBI (gi|51860757) e modificada

para “codon usage” de salmonela, utilizando o programa Jcat (Java codon adaptation tool – Institute for microbiology – Technical University of Braunschweig), disponível na internet (<http://www.jcat.de/>).

A sequência do promotor *lpp* da proteína *OmpA* de *E. coli* foi usada justaposta ao gene *lpxE* para expressão constitutiva da proteína. A sequência do promotor sofreu alterações pontuais para aumentar a expressão da proteína de interesse (INOUE; INOUE, 1985). A sequência *lpp_lpxE* desenhada com sítios de restrição para subclonagens foi sintetizada pela empresa GeneArt® Gene Synthesis (Life Technologies) e clonada no vetor pMA-T (Figura 4). O plasmídeo liofilizado foi ressuspensionado em água Milli Q, para concentração final de 100 ng/μL e então usado na transformação de bactérias *E. coli* DH5α competentes para amplificação de plasmídeos.

Figura 4 - Esquema da construção *lpp_lpxE* com sítios de restrição e inserção no vetor pMA.



3.8.2 Subclonagem do fragmento *lpp_lpxE* ou *lpxE* nos vetores pAE e pAEsox

O fragmento *lpp_lpxE* foi liberado do vetor pMA*lpp_lpxE* por digestão com as enzimas *XbaI* e *NcoI* (Thermo Scientific) e o fragmento *lpxE* foi liberado do vetor por digestão com as enzimas *NdeI* e *NcoI* (Thermo Scientific). Os vetores pAE e pAEsox foram digeridos com as mesmas enzimas. Os vetores linearizados e os fragmentos

gênicos foram purificados do gel de agarose utilizando o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE-Healthcare).

As amostras purificadas foram ligadas usando a enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific) e as reações de ligação foram usadas para transformar bactérias *E. coli* DH5 α para amplificação dos plasmídeos. Os clones obtidos das transformações foram armazenados a -80 °C com glicerol 15% e cultivados para extração do DNA plasmidial usando um kit de minipreparações (Illustra - GE Healthcare). Desta forma o fragmento lpp_lpxE foi inserido no vetor pAE para expressão constitutiva. E o gene lpxE foi inserido nos vetores pAE e pAEsox para a expressão controlada da proteína.

Os plasmídeos extraídos de DH5 α foram usados para transformar SL4213 e a linhagem vacinal atenuada SL3261 por transferência plasmidial. Todos os fragmentos gênicos obtidos das reações de digestão e os plasmídeos construídos foram analisados em gel de agarose 1%. Além disso, os plasmídeos foram confirmados por sequenciamento.

3.8.3 Eletroforese em gel de agarose para análise de plasmídeos e fragmentos gênicos

Equipamentos e soluções

- Cuba de eletroforese (Biorad).
- Fonte de eletroforese (Biorad).
- Tampão TAE: Tampão Tris acetato 40 mM EDTA 1 mM pH 8,5.
- Gel de agarose: 1% agarose em tampão TAE.
- Tampão de amostra xileno cianol: histopaque 20%, xileno cianol 0,03% em tampão TAE.
- Tampão de amostra xileno cianol e azul de bromofenol: glicerol 60%, de SDS 0,01%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,5% em tampão TAE.
- Solução de brometo de etídeo 10 mg/ mL.

As amostras de DNA de plasmídeos ou fragmentos digeridos foram analisadas em gel de agarose 1% em tampão TAE, seguindo o protocolo descrito por Maniatis (1982). Utilizamos um marcador de peso molecular, 1 Kb DNA ladder (Thermo Scientific) como padrão. Os géis foram mantidos a voltagem constante de

60 V por aproximadamente 90 minutos. Após a corrida, o gel foi incubado com brometo de etídeo (0,5 µg/ mL) em tampão TAE por 1 hora e depois lavado com água por 1 hora. Após a lavagem o gel foi visualizado e a imagem registrada em fotodocumentador (EL Logic 2200 Imaging System) utilizando o programa Carestream.

3.9 Testes de expressão da proteína LpxE em DH5α, BL21DE3 e SL3261 com as diferentes construções plasmidiais

O teste de expressão LpxE foi realizado em clones de *E. coli* DH5α e de salmonelas SL3261 com vetores pMALpp_lpxE, pAEIpp_lpxE e pAEsox_lpxE. Os clones foram cultivados em 500 mL de meio 2YT até $DO_{600nm} = 2$ para análise da expressão de LpxE e obtenção de massa celular para posterior extração de LPS.

Os clones com plasmídeo pAEsox_lpxE foram cultivados até $DO_{600nm} = 2$ em ausência ou presença de paraquat (100 µM) para indução da proteína recombinante LpxE, objetivando recuperar o LPS normal e LPS com lipídeo A monofosforilado.

3.10 Preparo dos antígenos recombinantes

3.10.1 Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

Equipamento, meio de cultivo e solução

- French Press (Thermo Scientific).
- Meio de cultura: 2YT com ampicilina 100 µg/ mL.
- Indutores: isopropil-b-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e Dicloreto de metil viologen hidratado (paraquat).
- Solução para lise: Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0.

O gene LIC10191 que codifica a proteína *OmpA* foi clonado previamente no laboratório pela Dr. Erika Nakajima no vetor pAEsox. O gene que codifica a porção c-terminal da proteína *ligA* (LigAc) clonado no vetor pAE foi gentilmente cedido pela Dra. Patrícia Abreu do laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. Essas clonagens permitem a expressão das proteínas recombinantes com cauda de histidina.

Para expressão dos antígenos recombinantes, clones de *E. coli* BL21 com os vetores pAEsox_ompA ou pAE_ligAc foram pré-cultivados em 30 mL de meio 2YT com ampicilina (2YTamp) por 14 horas a 37 °C com agitação. Os cultivos foram usados para inocular 500 mL de meio 2YTamp para $DO_{600nm} = 0,1$. As culturas foram mantidas até $DO_{600nm} = 0,5$ e induzidas por período de 5 a 8 horas, com a adição de paraquat, no caso da OmpA e com adição de IPTG, no caso da LigAc. As células foram separadas por centrifugação a 2700 G e ressuspensas em 30 mL de tampão tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0 e lisadas por French press (3 passagens a 1500 psi). As frações solúvel e insolúvel dos extratos foram separadas por centrifugação a 12000 G por 10 minutos a 4 °C.

3.10.2 Purificação das proteínas em coluna IMAC

Equipamentos e soluções

- Bomba peristáltica (Amersham Biosciences Pump P1).
- Coluna IMAC (GE Amersham).
- Tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0 com diferentes concentrações de Imidazol.
- Solução NaOH 1 M .
- Solução NaCl 1,5 M.
- Solução de 30% Isopropanol.
- Solução 20% etanol.
- Solução Sulfato de Níquel ($NiSO_4$) 0,3 M.

As proteínas usadas como antígenos nas imunizações foram purificadas a partir das frações solúveis dos extratos bacterianos por cromatografia em resina de afinidade a metal (IMAC-immobilized metal affinity chromatography - coluna de 5 mL Histrap HP - GE-Healthcare). Após a aplicação da amostra, a coluna foi reequilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM e Imidazol 5 mM e lavada com a mesma solução tampão contendo Imidazol 20 mM, 40 mM e 80 mM. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão contendo alta concentração de imidazol (500 mM). Após a purificação, a coluna foi lavada com solução de NaCl 1,5 M, NaOH 1 M, isopropanol 30% e vários volumes de coluna de água purificada entre

as soluções. A coluna foi armazenada com etanol 20% ou recarregada com NiSO₄ para uma nova purificação.

3.10.3 Análise dos cultivos bacterianos e das proteínas purificadas por SDS PAGE

Equipamentos e soluções

- Fonte para eletroforese (Biorad).
- Cuba de eletroforese (Biorad).
- Densitômetro GS-800 (Biorad).

Gel de separação

- Acrilamida 30%: acrilamida 29% e 1% bis acrilamida.
- Tampão Tris-HCl pH 8,8: Tris-HCl 1,5 M com 0,1% SDS, pH 8,8.
- TEMED – N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamine.
- Solução de persulfato de amônio: persulfato de amônio 10%.

Gel de empilhamento

- Acrilamida 30%: acrilamida 29% e bis acrilamida 1%.
- Tampão Tris-HCl pH 6,8: tampão Tris-HCl 0,5 M e 0,1% SDS pH 6,8.
- TEMED – N,N,N',N' – Tetramethylethylenediamine.
- Solução de persulfato de amônio: persulfato de amônio 10%.
- Tampão de corrida: tampão Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1% pH 8,3.

Preparo de amostra

- Tampão de amostra redutor 5X: Tris-HCl 50 mM pH 6,8, 10% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, β-mercaptoetanol 100 mM.

Amostras (10 mL) dos cultivos bacterianos induzidos e não induzidos (controle) foram lisados e as frações solúveis e insolúveis foram separadas para a verificação expressão das proteínas recombinantes.

Os géis de poliacrilamida foram preparados segundo (LAEMMLI, 1970). O gel de separação foi preparado na concentração 12,5% de poliacrilamida. Foi adicionado 50-75 µl de persulfato de amônio na concentração 10% e 3,3-5 µl de TEMED para a polimerização do gel. O gel de empilhamento foi preparado na

concentração 5% de poliacrilamida e 25 µl de persulfato de amônio 10% e 5 µl de TEMED foram adicionados para polimerização.

As amostras foram misturadas ao tampão de amostra redutor, aquecidas durante 5 minutos a 98 °C, para desnaturação das proteínas e aplicadas em SDS-PAGE (12,5%). A corrida foi feita em tampão Tris - glicina e aplicado uma corrente de 120 V durante 90 minutos.

Após a corrida, o gel foi colocado em recipiente com a solução de coomassie blue e incubado com agitação por 24 horas. Após esse período, o gel foi lavado com água purificada e digitalizado para análise em densitômetro GS-800 (Biorad).

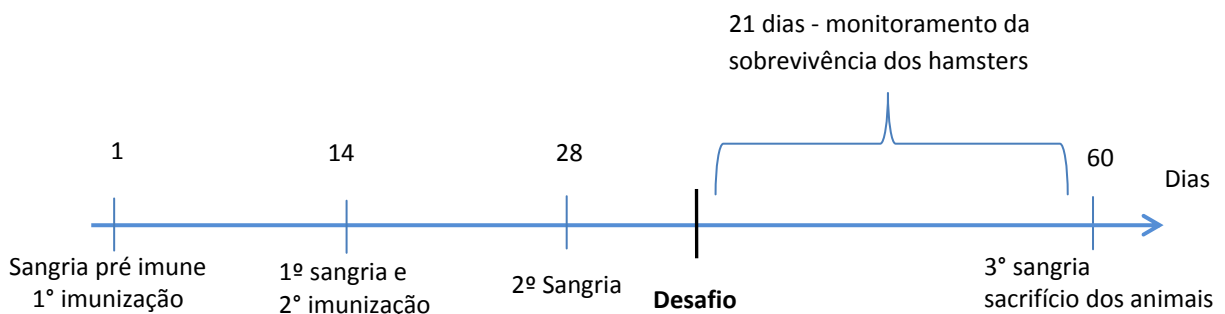
3.11 Ensaio de imunização e desafio em hamsters

Os ensaios com animais foram feitos seguindo protocolos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, de acordo com os certificados 937/12 e 1365/15.

Neste ensaio, visávamos quantificar a indução de anticorpos específicos por imunização com cada antígeno em formulações com os adjuvantes, avaliar a sobrevivência dos animais ao desafio com leptospiras virulentas e a possível proteção contra a colonização renal.

A Figura 5 apresenta o esquema experimental de imunizações, sangrias e desafio dos hamsters.

Figura 5 - Esquema do ensaio de imunização e desafio de hamsters



3.11.1 Imunização em hamsters

No primeiro ensaio em animais foram usados os antígenos OmpA e LigA e no segundo ensaio foi usado apenas LigA em formulações associados aos diferentes adjuvantes, hidrato de alumínio, MPLA de leptospira e MPLA de salmonela e ainda LPS de leptospiros. Os grupos de imunização de cada experimento e as doses usadas são apresentados com os resultados. Como controles do ensaio, foram mantidos grupos de imunização com a vacina comercial, imunizados somente com os adjuvantes e um grupo controle total que não foi imunizado ou desafiado.

Além dos grupos controle de imunização, também utilizamos grupos controle de dose de desafio, que recebiam o dobro da dose, a mesma dose ou metade da dose de desafio (dose desafio no primeiro ensaio $\sim 10^7$ *L. interrogans* Copenhageni L1-130 e no segundo ensaio $\sim 5 \times 10^7$). Alguns grupos foram imunizados com diferentes concentrações de MPLA ou LPS de leptospira, para observarmos possíveis efeitos de proteção direta dessas moléculas, não como adjuvante.

Grupos de 6 ou 10 hamsters (*Mesocricetus auratus*) machos foram inoculados a partir de 4 semanas de idade por via intraperitoneal, com duas doses das diferentes formulações vacinais, contendo 50 μ g dos antígenos proteicos, 45 μ g de adjuvante Alhydrogel (hidrato de alumínio - Alu) e 1,5 nmol de adjuvante MPLA de salmonela, bordetela ou leptospira em 200 μ L/dose, administradas com intervalo de 14 dias. Após dez dias da última injeção, os animais foram desafiados com bactérias *L. interrogans* sorovar Copenhageni virulentas por via intraperitoneal.

O sangue dos animais foi coletado por punção retro-orbital para preparo de soro e dosagem de IgG por ELISA. As coletas foram feitas após 14 dias de cada dose vacinal e 21 dias após o desafio nos animais sobreviventes.

3.11.2 Cultivo de Leptospira para ensaio de desafio

Meio de cultivo

- Meio EMJH: 0,23% de meio EMJH (BD Difco) com 10% de soro de coelho estéril ou suplemento (BD Difco).

A bactéria *L. interrogans* Copenhageni L1-130 utilizada no desafio foi mantida virulenta por passagens em hamsters. Concomitantemente ao início das

imunizações, animais de quatro semanas foram infectados por via intraperitoneal com 10^7 leptospiras e após cinco dias, quando apresentaram sintomas da doença, o fígado foi extraído e macerado em 10 mL de salina. Diluições do macerado 1:10 foram cultivadas por cerca de 15 dias a 30 °C em meio EMJH com suplemento específico para cultivo de leptospiras (BD Difco™ Leptospira Enrichment EMJH) (RIAZI et al., 2010; STALHEIM, 1968). Os cultivos foram repicados por diluição 1:10 em EMJH, cultivados por 10 dias para os ensaios de desafio, usando injeção intraperitoneal de 10^7 células por animal.

3.11.3 Avaliação macroscópica dos rins dos animais sobreviventes

Equipamentos e soluções

- Câmara de CO₂.
- Paraformoldeído 4% pH 7,2.

A coleta dos rins dos animais sobreviventes foram feitas para avaliação macroscópica para verificar possíveis danos causados pela infecção e analisar a presença de *L. interrogans* nos órgãos. Os animais que sobreviveram ao desafio foram sacrificados em câmara de CO₂ e rins foram removidos em condições assépticas.

Os rins foram observados macroscopicamente e classificados (0 a 3 cruces) quanto à aparência saudável ou doente. O rim direito de cada animal foi macerado para análise de isolamento de leptospiras por cultivo em meio Fletcher. O rim esquerdo foi cortado em duas partes, uma para análise por “imprint” em lâmina e a outra parte foi conservada em paraformol (paraformoldeído 4% pH 7,2).

3.11.3.1 Isolamento de *Leptospira* de macerados dos rins

Meio de cultivo

- Meio Fletcher: 0,23% de meio Fletcher (BD Difco) com 15% de soro de coelho estéril.

O isolamento de *Leptospira* do rim esquerdo de cada animal foi feito por cultivo em meio Fletcher semi-sólido (meio Fletcher 0,25% e soro de coelho 15%). O órgão foi coletado em ambiente estéril e macerado em Stomacher® 80 Biomaster por 30 segundos com 4,5 mL de solução salina. E então 0,5 mL dessa suspensão diluída foi transferida para tubos contendo aproximadamente 3,5 mL de meio Fletcher semi - sólido. Os tubos foram colocados na estufa a 30 °C para observação do crescimento de *Leptospira*.

Após seis semanas, o cultivo em meio Fletcher foi observado em microscópio e os resultados foram presença ou ausência de *Leptospira* classificados + ou –, respectivamente.

3.11.3.2 *Avaliação da presença de leptospiros nos rins por imprint e imunohistoquímica*

Soluções

- poly-L-lisina para análise imunohistoquímica (Sigma).
- Acetona para fixação de imprint.
- Solução salina: NaCl 150 mM.
- Solução tampão fosfato-salina (PBS): cloreto de potássio 1,7 mM, cloreto de sódio 137 mM, fosfato de sódio monobásico 8 mM, fosfato de sódio monobásico 1,5 mM.
- PBS com Triton X100: solução PBS com 0,4% de Triton X100
- PBSTween: solução PBS com 0,05% de Tween 20 (Merck).
- PBSTween com leite em pó desnatado: solução PBSTween com 10% de leite em pó desnatado (Molico).
- Para conservação da fluorescência VECTASHIELD[®] Mounting Media (Vector Laboratories).

A presença de leptospiros nos rins foi avaliada por imprint e imunohistoquímica (ATHANAZIO et al., 2008). O rim direito retirado dos animais sacrificados foi cortado ao meio para fazer um carimbo (“imprint”), encostando o rim na lâmina previamente coberta com 20 µL de poly-L-lisina. A fixação foi feita com acetona por três minutos, a lâmina foi lavada com PBS e conservada em temperatura entre 2 a 8 °C.

Os imprints foram circulados com um lápis hidrofóbico, sobre a marcação foi aplicado 40µL do anticorpo anti-Lepto L1-130 produzido em coelho no laboratório da Dra. Patrícia Abreu, diluído em PBS Triton X 100 em uma concentração de 1:100. A lâmina foi guardada no escuro por 60 minutos, e então lavada com PBS Triton X100. Foi aplicado 400 µL anti-soro de coelho conjugado com FITC (Santa Cruz) diluído 1:600 µL de PBS Triton. A lâmina foi lavada novamente com PBS Triton X100 e as últimas lavagens foram feitas apenas com PBS. Para conservar a fluorescência, foi aplicado sobre o imprint seco 7,5 µL de VECTASHIELD® Mounting Media (Vector Laboratories), a lamínula foi colocada e vedada com esmalte incolor. As lâminas foram conservadas no escuro a 4 °C e observadas em microscópio de fluorescência (CHAGAS-JUNIOR et al., 2009).

3.11.4 Avaliação da resposta imunológica por Western blot para detecção de anticorpos contra proteínas ou LPS

- Membrana de PVDF para transferência de proteína (GE Healthcare - Life Sciences).
- Membrana de nitrocelulose para transferência de LPS (GE Healthcare - Life Sciences).
- Solução TBST - NaCl 150 mM, Tris Base 10 mM pH 7,4 e tween 0,05%.
- Tampão de transferência - Tris base 25 mM pH 8,0, glicina 192 mM, SDS 0,02% e metanol 20%.
- Corante de Ponceau: Ponceau S 0,5%, ácido acético glacial 10% e água milliQ.
- Solução de bloqueio: leite desnatado 10%, em solução TBS.
- Anticorpo secundário: anti-IgG (H+L) hamster produzido em cabra conjugado com peroxidase (KPL).
- Solução de revelação: Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

Para avaliar a presença de anticorpos específicos nos soros, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e o LPS separado em ureia_SDS-PAGE e transferidas para a membrana. A transferência foi realizada pela passagem de corrente elétrica de 400 mA por aproximadamente 180 minutos para a transferência da proteína LigA e quatro horas para transferência de LPS. As membranas foram

coradas com solução de Ponceau S para a visualização das bandas de proteína, e em seguida, foram lavadas com TBST e bloqueadas com solução TBST com 10% de leite em pó desnatado, sendo incubadas por aproximadamente 3 horas.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com a mesma solução contendo o primeiro anticorpo (soro dos hamsters imunizados com as diferentes formulações) foi aplicado na membrana em uma diluição 1:500 por aproximadamente 3 horas. As membranas foram lavadas com solução de TBST e o segundo anticorpo anti-IgG hamster conjugado com peroxidase foi adicionado na solução de bloqueio na diluição 1:1000, as membranas foram incubadas nesta solução por 2 horas. Em seguida, as membranas foram lavadas e reveladas com Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) durante 5 minutos.

3.11.5 Avaliação da resposta imunológica por ELISA

Equipamento e soluções

- Leitor de ELISA Spectra Max 340 PC com auxílio do software SoftMax Pro 6.1
- Tampão carbonato/ bicarbonato: solução bicarbonato de sódio 0,1 M e adicionar carbonato de sódio 0,1 M até atingir pH 9,5.
- Solução de lavagem PBSTween: tampão PBS com 0,05% de Tween 20.
- Solução de bloqueio: tampão PBS com 0,01% de Tween 20 e 10% de leite em pó desnatado (Molico®)
- Solução de revelação: Sureblue TMB microwell peroxidase substrate (KPL)
- Solução de parada: HCL 1 M

A resposta de anticorpos IgG dos soros dos animais imunizados foram analisados por ELISA cinético (k-ELISA) e ELISA convencional endpoint (ELISAend). A sensibilização das placas de ELISA foi feita com 500 ng de LigA ou OmpA por poço em 100 µL de tampão carbonato/bicarbonato por 3 horas a 37 °C em câmara úmida. As placas foram lavadas três vezes com PBS Tween e então foi feito bloqueio com 200 µL de PBS Tween com 10% (m/v) de leite desnatado (PBS Tween Molico) para evitar ligação espúria de anticorpos na placa. O bloqueio foi mantido por 16 horas a 4 °C. As placas foram lavadas três vezes com PBS Tween e os soros dos animais imunizados foram introduzidos em diferentes diluições (1:400,

1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400) em PBS Tween com leite em pó desnatado. As placas foram mantidas por 3 horas a 37 °C em câmara úmida. Foram lavadas novamente com PBS Tween e o anticorpo secundário, anti-IgG de hamster produzido em cabra conjugado com peroxidase (KPL), foi aplicado na placa em uma diluição 1:10.000 em PBS Tween. As placas foram lavadas e 100 µL do substrato da peroxidase TMB (Sureblue® Microwell Peroxidase Substrate - TMB) foram adicionados. O desenvolvimento da cor foi acompanhado entre 1 a 15 minutos, com leituras a cada 10 segundos em 640 nm, no leitor de ELISA Spectra Max 340 PC com auxílio do software SoftMax Pro 6.1, que permite coleta de dados cinético, manutenção da temperatura 37 °C e agitação entre as leituras. Para o cálculo do ELISA cinético foram considerados os dados entre 1 e 4 minutos de reação, estabelecendo-se uma equação linear de variação da absorbância pela variação do tempo. Para validar os ensaios k-ELISA, os coeficientes angulares ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{T}$) das equações de diferentes diluições de uma mesma amostra de soro foram usados para verificar a linearidade da velocidade da reação com as diluições, estabelecendo-se uma nova equação linear correlacionando $\Delta\text{Abs}/\Delta\text{T}$ e diluição. O coeficiente angular ($\Delta\text{Abs}/\Delta\text{T}$) em função da diluição 1:400 foi usado para comparar a produção de anticorpos específicos dos diferentes soros.

Após as leituras do ELISA cinético, foi adicionado 50 µL/poço de HCl 1 M para a parada da reação e foi realizada uma leitura final em 450 nm para estabelecer a curva de absorbâncias por diluição e estabelecer os títulos pelo ELISA convencional. Os títulos de anticorpos específicos foram considerados como a maior diluição que ainda determina absorbância em 450 nm maior que 0,1.

3.12 Análise estatística

Foi feita análise estatística por “One-way ANOVA com Turkey post test entre os dados de cada par de grupo, usando GraphPad Prism version 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com)”.

4 RESULTADOS

4.1 Preparo de monofosforil lipídeo A de salmonelas e de leptospiaras

4.1.1 Extração de LPS

Para extração de LPS as bactérias salmonela SL3261 e leptospiaras virulenta L1-130 e avirulenta 10A foram cultivadas e as massas bacterianas foram liofilizadas. Na tabela 3 apresentamos os valores médios de densidade celular e massas secas de bactérias obtidas em nossos ensaios.

Tabela 3 – Comparação da densidade de bactérias nos cultivos e massa celular recuperada.

Bactéria	Tempo de cultivo	Densidade celular por mL	Massa seca por litro de cultivo
Salmonela SL3261	16 horas	2 a 5 x 10 ⁹	1000 mg
Leptospira*	7 dias	2 a 5 x10 ^{8**}	~100 mg***

- * Similar para leptospiaras L1-130 e para 10A
- ** densidade máxima atingida em cultivos com soro ou com suplemento
- *** A massa de *L. interrogans* possui residual significativo de albumina do meio de cultivo

Inicialmente, o cultivo de leptospiaras foi bastante demorado e resultou em baixo rendimento de massa celular e LPS extraído. Por isso propusemos investigar a extração de LPS de vacinas veterinárias comerciais baseadas em bacterinas. Os testes de extração mostraram que a recuperação de LPS a partir das vacinas foi mínimo.

Foram feitos sub cultivos de leptospiaras semanalmente na diluição 1:10, e desta forma, obtivemos um maior número de células após 10 passagens, resultando em massa de bactérias suficiente para as extrações. Mas trata-se de cultivos difíceis por ser uma bactéria de crescimento lento. Isso pressupõe a dificuldade de preparo das vacinas convencionais baseadas em bacterinas com diversos sorovares.

A massa de salmonela para extração de LPS é obtida facilmente, enquanto a massa de leptospira é de difícil obtenção devido à baixa densidade celular e crescimento lento do microrganismo.

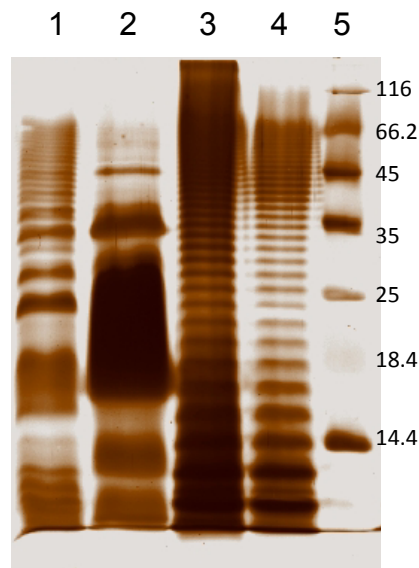
O LPS das bactérias foi extraído pelo método fenol quente (GALANOS, LÜDERITZ; WESTPHAL, 1969). No ensaio descrito, as massas secas de bactérias usadas para as extrações foram aproximadamente 1 g de salmonela, 480 mg de *L. interrogans* 10A (~ 4,5 L de cultivo) e 50 mg da *L. interrogans* L1-130. O LPS de salmonelas (LPS_{Sa}) foi obtido na fração aquosa dos extratos, enquanto o LPS de Leptospiras (LPS_{Le}), interessantemente, foi obtido na fração fenólica dos extratos, a despeito da semelhança das moléculas de LPS dos dois microrganismos. Massa de leptospiras virulentas foi utilizada somente em um ensaio, verificando-se semelhança com LPS da linhagem *L. Interrogans* 10A.

Já havia sido mostrado que o LPS de alguns sorovares de leptospira era extraído na fração orgânica (VIHN, 1985), mas os autores sugeriram que o sorovar Copenhageni era obtido na fração aquosa. Entretanto nós verificamos a extração do LPS deste sorovar na fração fenólica, enquanto que o LPS de salmonela foi obtido na fração aquosa, como já descrito por outros autores (GALANOS; LEHMANN, et al., 1984). Possivelmente, a diferença de hidrofobicidade verificada entre as moléculas pode estar relacionada com a ausência de um fosfato, com o maior comprimento das cadeias lipídicas e insaturadas na molécula de LPS de leptospira.

Após diálise, as frações foram clarificadas por centrifugação a 2000 G e foram liofilizadas, compondo os extratos de LPS (GALANOS; LÜDERITZ; WESTPHAL, 1969; WU; TSAI; FRASCH, 1987). Outros métodos de extração de LPS foram avaliados, como o método que usa soluções de Bligh Dyer, as quais são compostas de diferentes proporções de clorofórmio, metanol e água para formar soluções homogêneas ou bifásicas na separação de moléculas lipídicas (BLIGH; DYER, 1959). Testamos também o uso de Trizol Reagent (Life Technologies) descrito para purificar micro quantidades de LPS (YI; HACKETT, 2000). Entretanto, o método mais eficiente para obtenção de LPS foi extração por fenol quente.

Na primeira fase do trabalho obtivemos LPS e MPLA de leptospiras suficiente para estudos qualitativos, mas não para os ensaios em animais. As amostras foram analisadas por ureia_SDS-PAGE (Figura 6) e os géis corados com prata. A coloração por prata é bastante sensível para revelar os açúcares dessas moléculas.

Figura 6 – Perfis dos LPS de leptospiras e de salmonelas avaliados por ureia_SDS-PAGE, com coloração por prata.



Canaletas: **1 e 2**- LPS de leptospira, extratos das fases aquosa (8 μ L) e fenólica (4 μ L), respectivamente. **3 e 4**. LPS de salmonelas, extratos das fases aquosa (2 μ L) e fenólica (8 μ L), respectivamente; **5**. Marcador de massa molecular de proteína (6 μ L #SM0431- Fermentas).

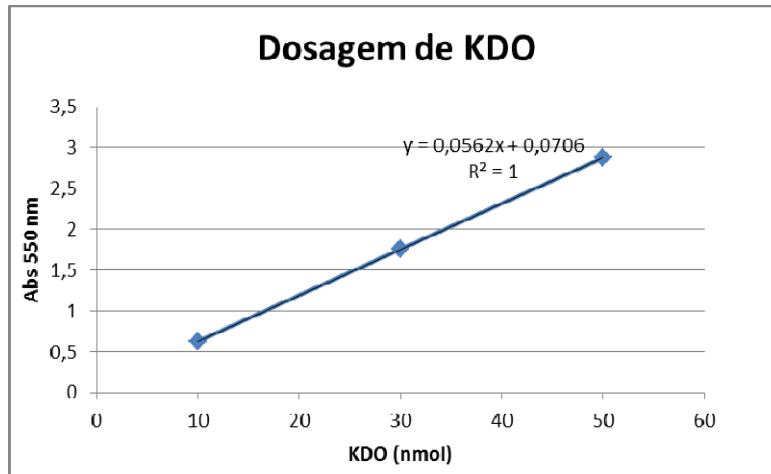
O LPS de salmonelas determina um padrão de bandas típico em escada, relativas ao tamanho das moléculas com diferentes números de repetições de açúcares da porção antígeno-O. O LPS de leptospira, obtido na fração fenólica, apresenta quatro bandas principais bem distintas. O perfil de LPS da *L. interrogans* Copenhageni mostra-se ligeiramente diferente do perfil mostrado por Vinh e colaboradores para as *L. interrogans* Hardjoprajitno e Hardjobovis (VINH et al., 1989). A coloração por prata é bastante sensível para revelar a fração polissacarídica dessas moléculas.

4.1.2 Dosagem de LPS de leptospira e salmonela por KDO

Estima-se que o LPS de *Leptospira interrogans* apresenta dois a 4 KDOs por molécula (VINH et al., 1989), tendo sido caracterizado como não típico, ou seja, possui substituições que dificultam a dosagem. Para quantificar o LPS extraído consideramos 2 KDO por molécula de LPS, e a dosagem foi feita seguindo o protocolo de Lee e Tsai (1999).

Usamos KDO comercial (Sigma Aldrich) na concentração de 1 mM como padrão para elaborar uma curva de dosagem (Figura 7), seguindo o protocolo descrito em materiais e métodos.

Figura 7 – Elaboração da curva padrão de KDO.



A curva determina a equação usada para cálculo de KDO das amostras.

Diferentes volumes da preparação de LPS de leptospira e de salmonelas foram usados para dosagem de KDO e os valores de absorvância foram usados para o cálculo da concentração de LPS usando a equação da curva padrão. Os valores na tabela 4 ilustram a quantificação de KDO em um dos extratos.

Tabela 4 – Dosagem de KDO em amostras de LPS de leptospira e salmonela.

Amostra de LPS	Absorbância (550 nm)	[KDO]		
		nmol na reação	nmol/ μ L na amostra	Média nmol / μ L
20 μ L lepto	0,544	8,423	0,421	0,427 (lepto)
40 μ L lepto	1,0445	17,330	0,433	
30 μ L salmo	1,260	21,160	0,710	0,700 (Salmo)
50 μ L salmo	2,029	34,850	0,700	

Considerando que cada molécula de LPS de Leptospira possui dois KDOs, calculamos que nossa preparação de LPS tem concentração 0,214 nmol/ μ L. A

preparação de LPS foi feita a partir de cerca de 480 mg de massa seca de leptospiras e o LPS recuperado em aproximadamente 15 mL. Portanto recuperamos 3,2 μmol de LPS/ 480 mg de massa bacteriana, equivalente a $\sim 6,7$ $\mu\text{mol/g}$ de massa seca, ou ainda 0,57 $\mu\text{mol/litro}$ de cultivo.

Considerando o peso médio do LPS de leptospiras 20 kDa (valor estimado pelos marcadores no gel), teríamos obtido ~ 130 mg de LPS por grama de massa seca. Esse valor pode estar superestimado, uma vez que na literatura se menciona rendimentos máximos de 3-5% de LPS (VIHN, 1985). O método de Purpald é utilizado como específico para dosagem de KDO, mas podem ocorrer reações com outros açúcares presentes no LPS, inferindo um rendimento maior do que o real (LEE; TSAI, 1999). Por outro lado, substituições verificadas no KDO atípico do LPS de leptospiras podem interferir diminuindo a dosagem.

No caso de salmonelas, partindo de 450 mg de massa seca obtivemos ~ 5 mL de solução de LPS com dosagem de KDO 0,7 $\mu\text{mol/mL}$. Como conhecido que o LPS de salmonela possui três KDOs (HEINRICHS; YETHON; WHITFIELD, 1998), recuperamos o LPS em concentração 0,23 $\mu\text{mol/mL}$ e um total de 1,15 μmol nessa preparação, rendimento de 2,55 μmol por grama de massa seca de salmonela.

A massa média de LPS de salmonelas pode ser considerada 50 kDa e portanto temos o rendimento de aproximadamente 127 mg de LPS por grama de massa de bactérias.

A quantificação de LPS pela dosagem de KDO torna-se um controle interno de rendimentos para diferentes experimentos, mas supõem rendimentos mais altos que o esperado. Para aperfeiçoar a quantificação de LPS, seria necessário maior controle dos interferentes, tais como a interação dos reagentes de dosagem com outros açúcares do LPS, as substituições no KDO atípico e ainda maior número de extrações.

4.1.3 Hidrólise de LPS para obtenção de MPLA

Para obtenção de monofosforil lipídeo A (MPLA), o LPS de salmonela foi hidrolisado com acetato de sódio (25 mM, pH 4,5, SDS 0,5%, a 100 °C por 1 hora), e o LPS de leptospira foi hidrolisado com menor concentração de acetato de sódio (12,5 mM, pH 4,5, SDS 0,5%, a 100 °C por 1 hora). Os produtos hidrolisados foram

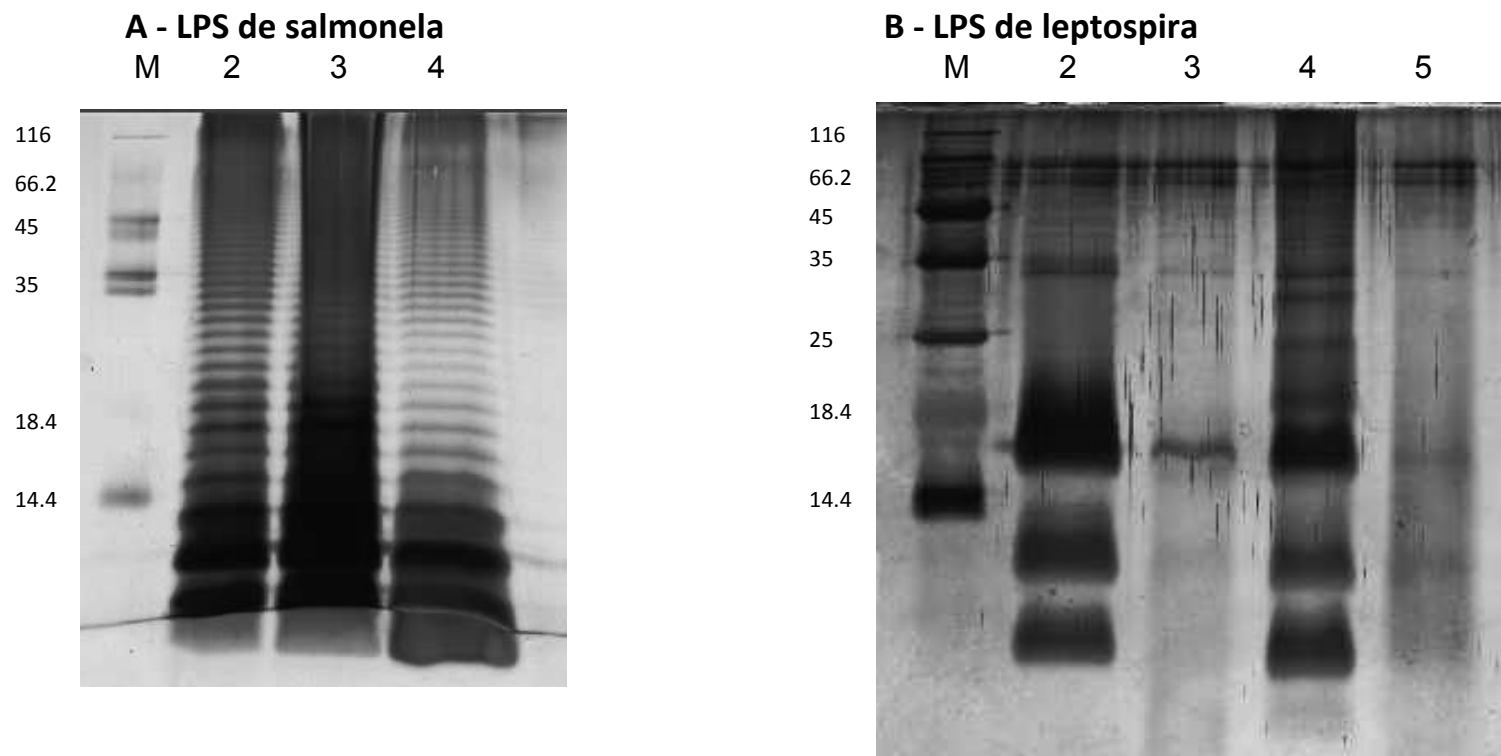
purificados como descrito em materiais e métodos e analisados por ureia_SDS-PAGE para verificar a degradação da porção PS das moléculas (Figura 8).

Comparado ao perfil do LPS de salmonela, o perfil do LPS de *L. interrogans* é bastante diferente, pois apresenta somente três ou quatro bandas distintas, segundo a literatura (VIHN, 1985). Comparando-se as amostras com ácido antes e após o aquecimento, nota-se que porções PS foram removidas parcialmente na hidrólise branda, especialmente no caso do LPS de salmonelas. Diferentes reações foram testadas e os resultados indicaram que as proporções LPS e ácido devam ser otimizadas.

4.1.3.1 Análise das preparações de lipídeo A e MPLA de salmonelas e de leptospiras por espectrometria de massa

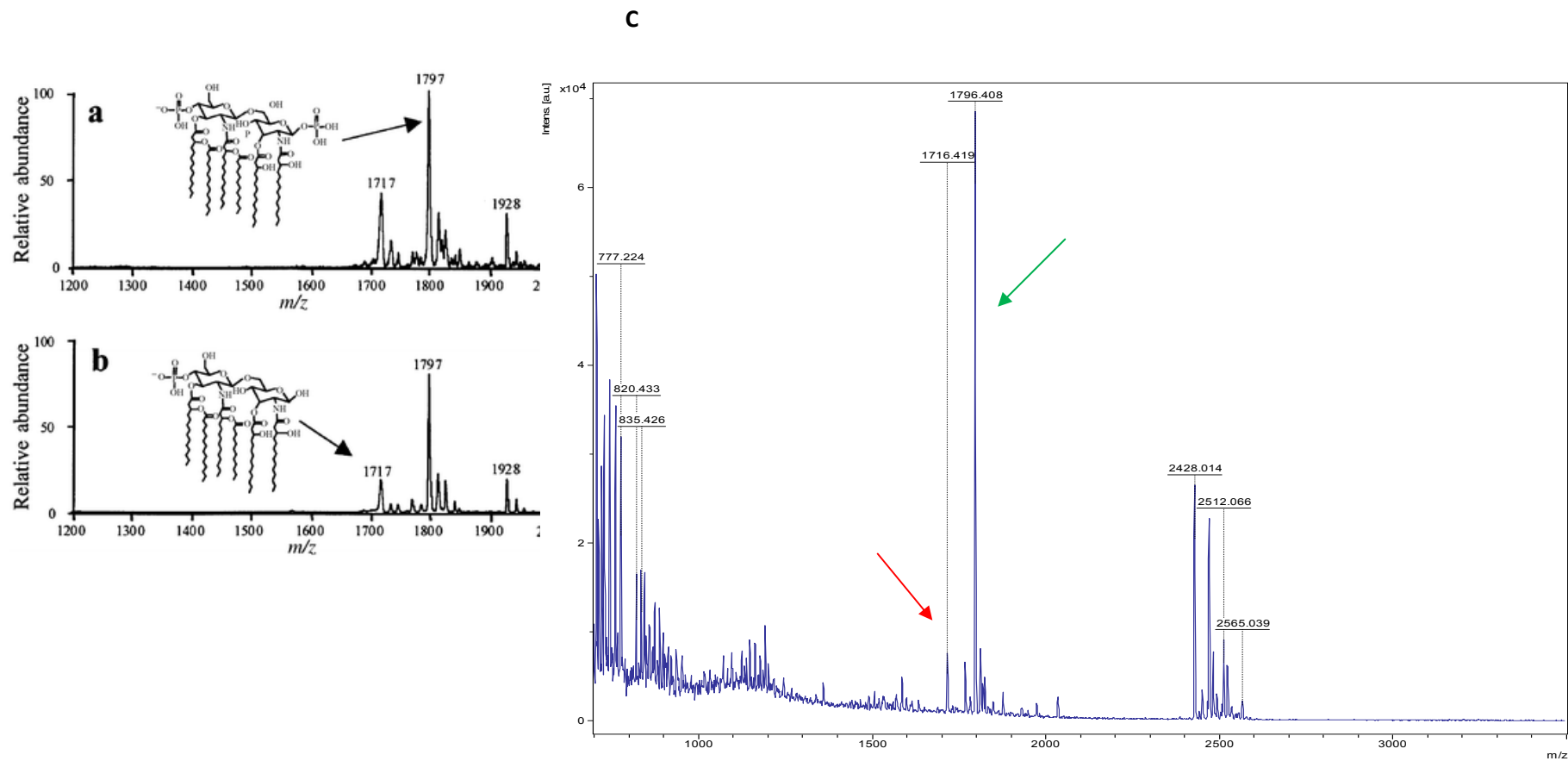
Amostras de LPS hidrolisado de salmonela SL3261 foram enviadas dissolvidas em clorofórmio: metanol (4:1) para análise por espectrometria de massa (MALDI -TOF) na Central Analítica do Instituto de Química - USP. A Figura 9 ilustra o espectro de massa de MPLA comercial descrito na literatura (YI; HACKETT, 2000) e o espectro de massa da amostra de MPLA preparada a partir do LPS de SL3261.

Figura 8 – Análise de LPS de salmonela e leptospiras (10A) e dos produtos de hidrólise, por ureia_SDS-PAGE.



Gel A canaletas M - Marcador de massa molecular, 2 - LPS salmonela recuperado da fração aquosa do extrato; 3 - LPS salmonela em ácido (antes da hidrólise por aquecimento), 4 - produto de hidrólise do LPS salmonela. **Gel B** - Canaleta M - Marcador de massa molecular; 2 - LPS de leptospira fração fenólica (10 μ L); 3 - LPS de leptospira fração fenólica hidrolisado (10 μ L); 4-LPS de leptospira fração aquosa (10 μ L); 5- LPS de leptospira fração aquosa hidrolisado (10 μ L).

Figura 9 - Espectrometria de massa (MALDI - TOF) de MPLA de salmonela com modo de aquisição reflector negativo.



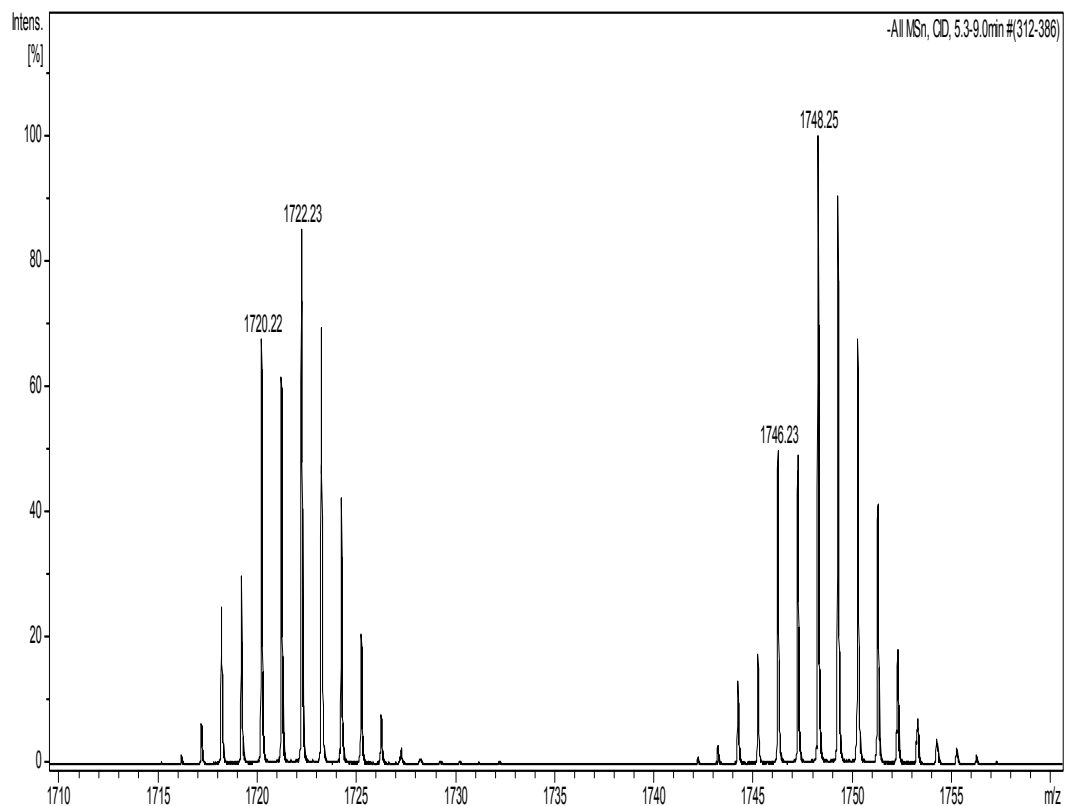
(a) e (b) padrão de LPS de *S. enterica* Typhimurium (Referência: Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria) (YI; HACKETT, 2000); (c) - Espectro de massa de MPLA de salmonela SL3261. As setas vermelha e verde apontam os picos esperados de MPLA e lipídeo A, respectivamente.

O espectro da amostra hidrolisada de LPS de salmonela, semelhante ao descrito por Yi e Hackett (Figura 9), mostra um pico proeminente de massa/carga (m/z) 1796 (seta verde) que corresponde ao lipídeo A, e um pico menor com m/z 1716 (seta vermelha) que corresponde à molécula desejada de MPLA, comprovando que nas condições utilizadas a hidrólise não foi capaz de remover um fosfato do lipídeo A de salmonela. O espectro também mostrou picos na região m/z 2500 que pode corresponder à molécula de lipídeo A ainda com moléculas de KDO e outros açúcares.

Outras formas de hidrólise, usando maiores concentrações de ácido ou maior tempo de aquecimento foram testadas. Em paralelo uma nova estratégia de obtenção de MPLA de salmonela foi proposta, usando clones que expressem a enzima LpxE, como será descrito abaixo.

Espectrometria de massa de MPLA de leptospira foi realizada por ESI - MS. O espectro é mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Espectro de massa ESI - MS de MPLA de leptospira.



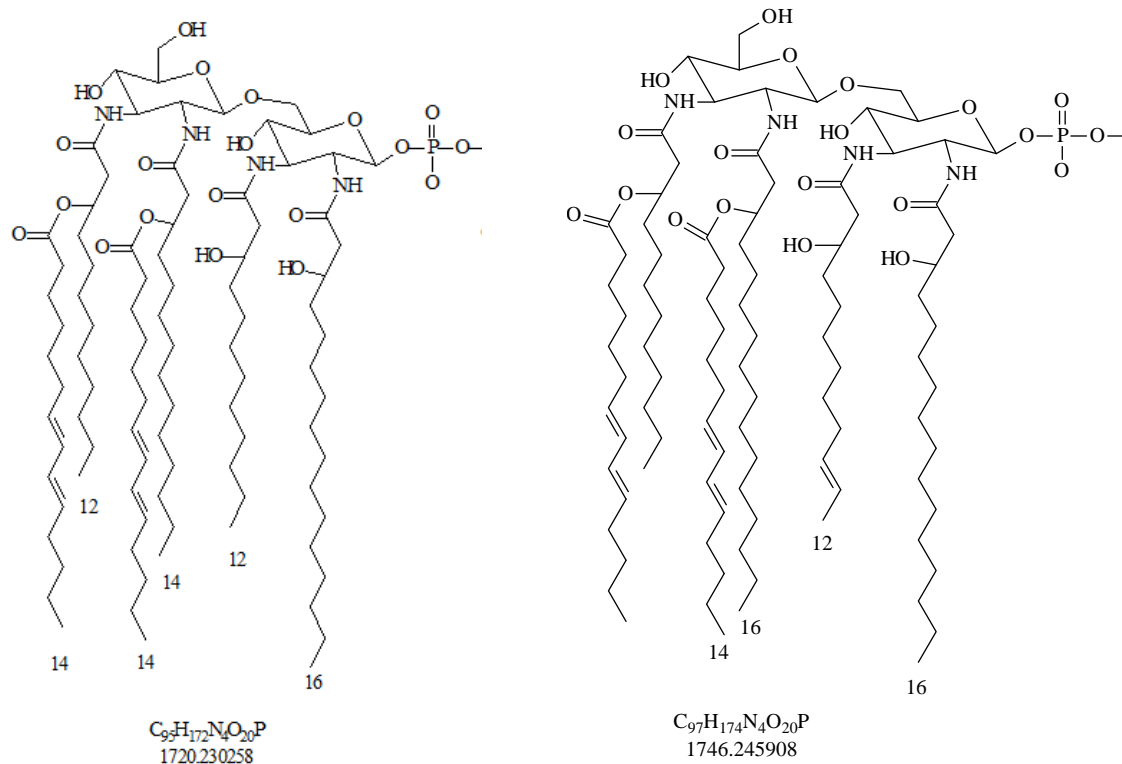
A análise de MPLA por ESI-MS mostra dois picos proeminentes de razão massa/carga 1722 e 1748 e outros picos derivados

Os picos principais observados no espectro de massa de MPLA de *L. interrogans* foram $m/z = 1720,3$, $m/z = 1722,3$, $m/z = 1746,2$ e $m/z = 1748,2$. Podemos citar como referência espectro de massa do lipídeo A de *L. Interrogans* sorovar Pomona que apresentou m/z de 1726.4 (QUE-GEWIRTH et al., 2004). Para cada conjunto de picos as variações sugeridas para moléculas são:



A variação do número de carbonos e prótons sugere variações no comprimento e número de duplas ligações nas cadeias alquílicas, entretanto não se pode inferir o local exato. A Figura 11 ilustra possíveis estruturas para MPLA de lepstopiras nas nossas preparações.

Figura 11 - Estruturas de MPLA de *L. interrogans* sugeridas pelos valores m/z obtidos por espectrometria de massa.



Os dados obtidos por espectrometria de massa sugerem inserção de dois carbonos e variação no número de duplas ligações nas cadeias lipídicas.

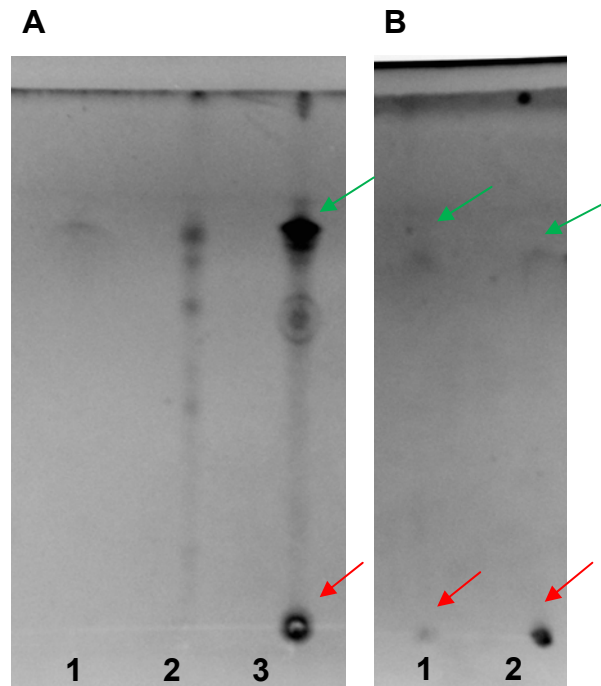
De acordo com a análise por espectrometria de massa, os açúcares do lipídeo A de leptospira foram removidos com a hidrólise branda. As variações de m/z são comuns após esse processo, pois as amostras não são completamente homogêneas (AYBAY; IMIR, 1998). Esta preparação de MPLA de leptospira foi utilizada nas imunizações dos animais.

4.1.3.2 Análise de MPLA em placa de TLC

As preparações de MPLA resultantes da hidrólise do LPS de leptospiras e de salmonelas foram analisadas por HPTLC.

O perfil de MPLA de salmonela comercial (Salmonella Minesota Re595 -Re mutant - Sigma) usado como padrão apresenta várias manchas indicando uma mistura das moléculas de MPLA, possivelmente relacionado com a presença de lipídeo A residual e moléculas com diferentes números de cadeias lipídicas. O perfil do MPLA de SL3261 apresentou também várias manchas, com intensidades diferentes do padrão utilizado, indicando uma mistura diferente (Figura 12). A hidrólise parcial se confirma pelo acúmulo de amostras no ponto de origem do TLC (setas vermelhas). As bandas observadas nas amostras de MPLA de leptopiras estão em posição esperada segundo a literatura (seta verde) (QUE-GEWIRTH et al., 2004).

Figura 12 - Análise de MPLA em placa HPTLC de sílica gel.



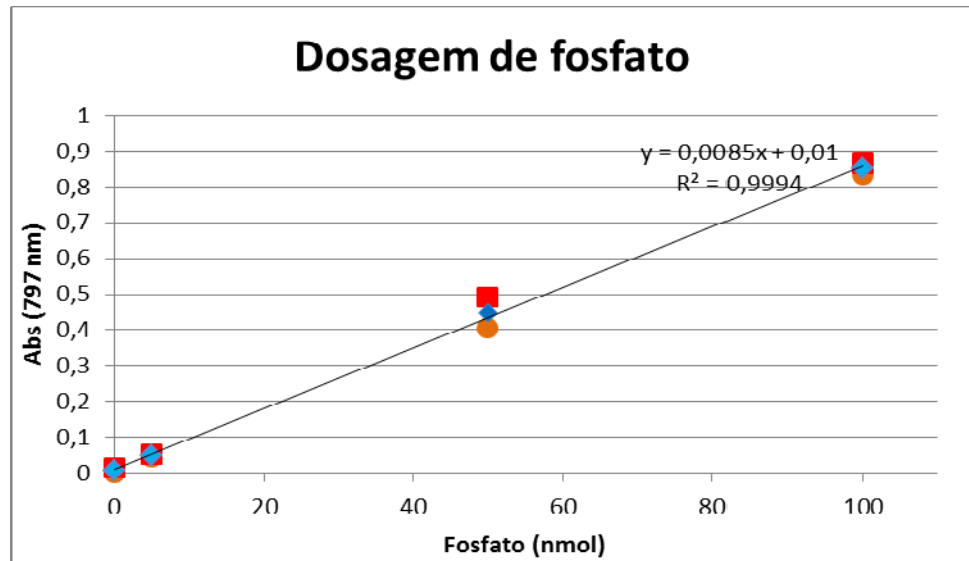
Fase móvel clorofórmio: piridina: ácido fórmico 88%: metanol: água (60:35:10:5:2). **Placa A:** 1- SDS 0,5%, 2 - MPLA de salmonela comercial (Sigma Aldrich), 3 – Hidrolisado de LPS de leptospira. **Placa B:** 1 e 2 MPLA de salmonela. As setas vermelhas indicam acúmulo de LPS não digerido na região de origem e as setas verdes indicam a banda de MPLA.

4.1.3.3 Dosagem de fosfato nas frações de MPLA

As dosagens de fosfato foram realizadas nas amostras de MPLA de *Leptospira interrogans*. A dosagem baseia-se na digestão ácida de fosfato orgânico a inorgânico. A concentração de fosfato orgânico foi calculada, subtraindo-se o fosfato inorgânico contaminante medido antes da digestão.

As curvas de dosagem com solução padrão de fosfato inorgânico foram estabelecidas com massas conhecidas entre 0 e 100 nmol. As amostras foram preparadas em duplicatas e tratadas como descrito em materiais e métodos. A forma de dosagem das amostras padrão, as curvas padrão (Figura 13) e a equação linear de absorvância em função das massas de fosfato estão ilustradas abaixo.

Figura 13 – Curva padrão de fosfato inorgânico.



Na dosagem foram usados diferentes volumes de amostra padrão de fosfato inorgânico (1 mM). Dosagens das amostras não digeridas (círculos laranja), digeridas (quadrados vermelhos) e os valores das médias (losangos azuis) foram usados na determinação da equação linear usada para o cálculo de fosfato nas amostras de MPLA.

Consideramos que não houve diferença entre as amostras padrão digeridas e não digeridas e incluímos todos os dados na curva, resultando na equação linear:

$$\text{Abs}_{797\text{nm}} = 0,0085 (\text{massa}) + 0,01.$$

A concentração de MPLA de *B. pertussis* foi considerada como rotulada pela produção do Instituto Butantan. Para a imunização dos hamsters foi aplicado 2,2 μg (1,5 nmol) de MPLA por dose.

Tabela 5 - Dosagem de fosfato nas amostras de MPLA de leptospira para cálculo da concentração

Amostra MPLA leptospira	Volume (µL)	Abs 797 nm	Fosfato			Conc. MPLA na amostra*
			nmol na reação	nmol/ µL na amostra	nmol/ µL média	
não	3	0,05	4,70	1,56		
digerida	5	0,06	5,88	1,17	1,45	
	7	0,106	11,27	1,61		5,5 nmol /µL
digerida	3	0,11	11,76	3,92		
	5	0,33	37,65	7,52	6,72	
	7	0,53	61,18	8,73		

*diferença calculada entre o digerido e o não digerido. Concentração de MPLA considerada igual à concentração de fosfato orgânico

O ensaio ilustra as dosagens de fosfato no cálculo de MPLA. A concentração de MPLA de leptospira na preparação utilizada nos ensaios em animal foi calculada em 4,5 nmol/ µL considerando que o fosfato orgânico medido é somente o da molécula de MPLA.

Por espectrometria de massa, observamos que a hidrólise branda do lipídeo A de salmonela não promoveu a defosforilação da molécula, por isso, para os ensaios de imunização de hamster, utilizamos MPLA de salmonela comercial.

4.2 Geração de clones de salmonelas para expressão da proteína LpxE

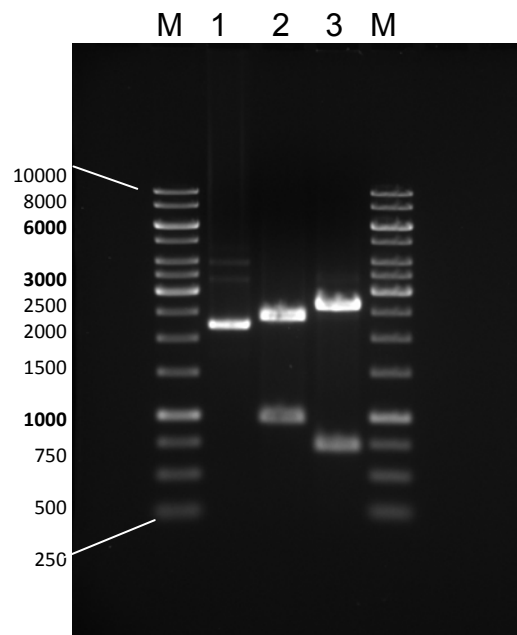
Verificamos por espectrometria de massa que a hidrólise ácida de LPS de salmonela não remove o grupo fosfato para obtenção do MPLA. Por isso, seguindo dados da literatura (KONG et al., 2011), propusemos a geração de clones de *S. enterica* Typhimurium SL3261 expressando a proteína heteróloga LpxE, a qual promove a remoção de um fosfato do LPS na estrutura de membrana durante o cultivo da bactéria, gerando o LPS com a fração do lipídeo A monofosforilada.

O fragmento de DNA com o gene *lpxE* justaposto ao promotor *lpp* foi sintetizado (Life Technologies) e inserido no plasmídeo pMA. O plasmídeo pMA_{lpp_lpxE} foi amplificado em *E. coli* DH5α e usado na transformação de SL4213 e em seguida SL3261, para expressão constitutiva da proteína.

4.2.1 Geração dos plasmídeos pAE_lpxE, pAElpp_lpxE e pAEsox_lpxE.

A partir do plasmídeo pMAlpp_lpxE outros vetores foram construídos para estudarmos a expressão controlada da proteína LpxE. Transferimos o gene ainda sob controle do promotor lpp para o vetor pAE. Para isso, o plasmídeo pMAlpp_lpxE foi digerido com enzimas de restrição XbaI e NcoI liberando os fragmentos de DNA lpp_lpxE de 986 pb e o plasmídeo pMA (2380 pb) (Figura 14). Na figura pode-se observar a banda do plasmídeo superenovelado e dos fragmentos das digestões com as enzimas de restrição.

Figura 14 - Plasmídeo pMAlpp_lpxE obtido de DH5 α digerido para liberação dos fragmentos de DNA lpp_lpxE e lpxE.



Amostras de mini-preparação de pMAlpp_lpxE 1 - não digerido; 2 - digerido com XbaI e NcoI; 3 - digerido com NdeI e NcoI; M - Marcado 1kpb DNA ladder.

O fragmento lpp_lpxE foi inserido no vetor pAE cortado com as enzimas XbaI e NcoI, gerando o vetor pAElpp_lpxE para expressão constitutiva de LpxE em vetor que se multiplica na bactéria em maior número de cópias que o vetor pMA.

O fragmento de 726 pb correspondente ao gene lpxE liberado do plasmídeo pMA usando as enzimas de restrição NdeI e NcoI, foi purificado e inserido nos vetores pAE e pAEsox digeridos com as mesmas enzimas, para a geração de clones

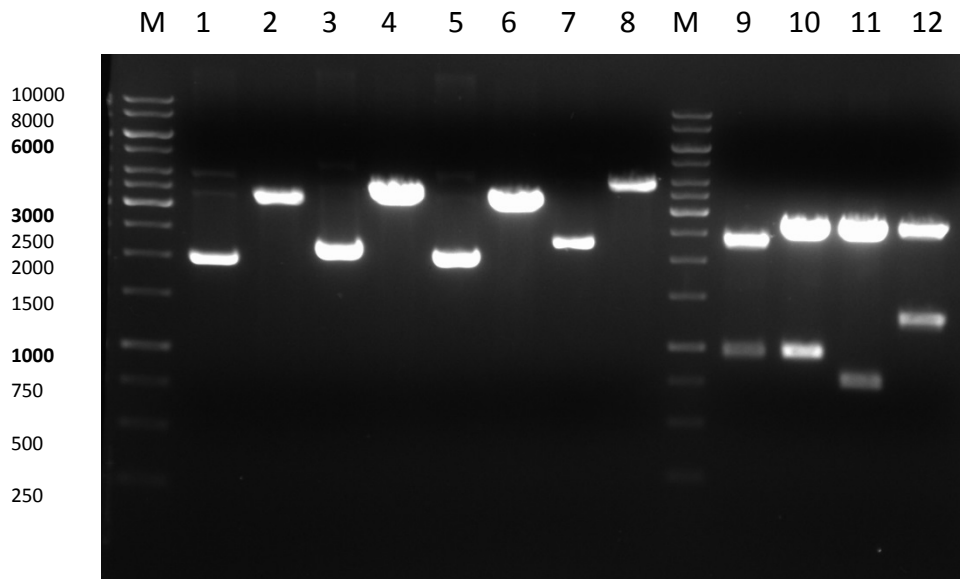
expressando a proteína LpxE de maneira induzível sob controle dos promotores T7 e sox respectivamente.

O fragmento lpp_lpxE foi inserido no vetor pAE cortado com as enzimas XbaI e NcoI, gerando o vetor pAElpp_lpxE, nesta construção, a expressão de LpxE deve ser constitutiva.

O fragmento de 726 pb correspondente ao gene lpxE liberado do plasmídeo pMA usando as enzimas de restrição NdeI e NcoI, o fragmento foi purificado e inserido nos vetores pAE e pAEsox digeridos com as mesmas enzimas, para a geração de clones expressando a proteína LpxE de maneira induzível sob controle dos promotores T7 e sox respectivamente.

Os plasmídeos foram amplificados em clones de *E.coli* DH5 α , purificados e avaliados pelo padrão de digestão com enzimas de restrição NdeI e NcoI ou XbaI e NcoI em gel de agarose (Figura 15). Os plasmídeos obtidos foram usados para transformar *Salmonella* SL4213 e em seguida em SL3261.

Figura 15 - Confirmação da construção dos plasmídeos para expressão de LpxE, por ensaio de restrição.

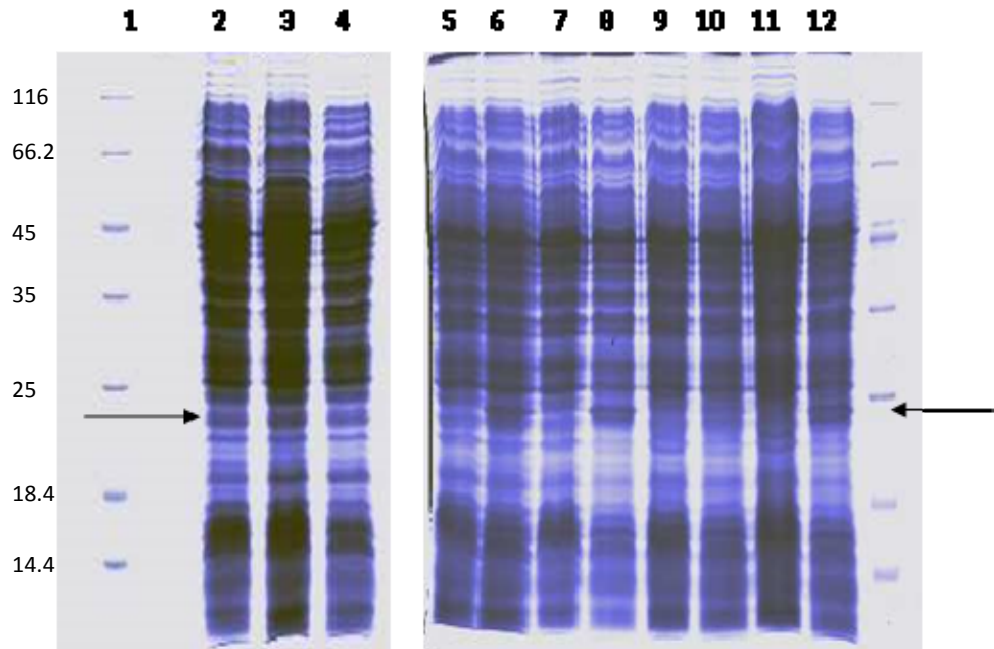


Amostras de mini preparações plasmidiais obtidas de *E. coli* DH5- α foram digeridas com enzimas de restrição. Canaletas: plasmídeo **pMAIpp_lpxE** 1- Não digerido, 2- simples digestão NdeI (3,4 kpb), 9- dupla digestão XbaI e NcoI (2,4 kpb + 980 pb); plasmídeo **pAEIpp_lpxE** 3- Não digerido, 4- simples digestão NdeI (3,8 kpb), 10- dupla digestão XbaI e NcoI (2,9 kpb + 980 pb); plasmídeo **pAE_lpxE** 5- Não digerido, 6- simples digestão NdeI (3,6 kpb), 11- dupla digestão XbaI e NcoI (2,8 kpb + 800 pb); plasmídeo pAEsox_lpxE 7- Não digerido, 8- simples digestão NdeI (4,2 kpb), 12- dupla digestão XbaI e NcoI (2,8.kpb + 1,2 kpb) M - Marcador de peso molecular.

4.2.2 - Análise de expressão da proteína lpxE

Clones de *E. coli* com os plasmídeos pMAIpp_lpxE e pAEsox_lpxE foram usados para expressão constitutiva ou induzida (por paraquat) da proteína LpxE. A expressão de proteína foi analisada em gel de acrilamida.

Figura 16 – Análise de expressão da proteína lpxE em clones de *E. coli* DH5- α com vetor pAEsox_lpxE induzido ou não por paraquat e vetores pMAIpp_lpxE e pAEIpp_lpxE.

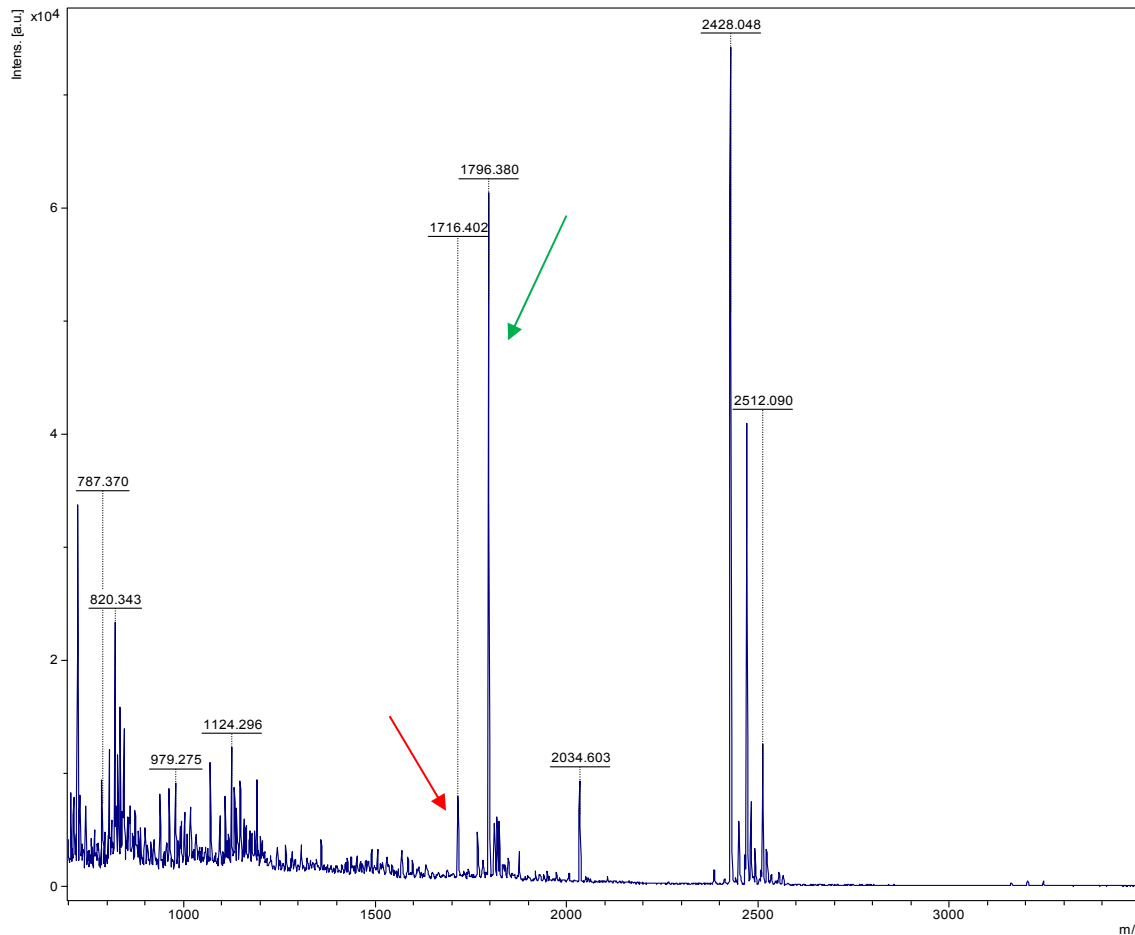


Canaletas: 1 - marcador de peso molecular de proteínas, 2 e 3 - clones com vetor pMAIpp_lpxE, 4 - Clone com pAEIpp_lpxE, 5 a 12 - quatro clones diferentes com vetor pAEsox_lpxE. Canaletas ímpares são cultivos não induzidos e, canaletas pares são cultivos induzidos por paraquat.

A expressão da enzima LpxE nos clones de SL3261 com os vetores pMAIpp_lpxE, pAEIpp_lpxE e pAEsox_lpxE ainda não foi confirmada. O vetor pAE_lpxE para expressão de LpxE sob controle do promotor T7 está sendo testada em bactéria BL21DE3.

Preparamos LPS e MPLA dos clones SL3261 pAEsox_lpxE induzidos para expressão de LpxE. Amostra do LPS hidrolisado foi enviada para análise por espectrometria de massa. O espectro indica que ainda não foi recuperado MPLA, apresentando o mesmo pico proeminente de m/z 1796 relativo ao lipídeo A (Figura 17) (seta verde) e indicando que não houve atividade de LpxE. Os ensaios de indução de expressão de LpxE estão sendo otimizados.

Figura 17 - Análise de MPLA de salmonela contendo o plasmídeo pAEsox_lpxE induzido em MALDI - TOF.



O espectro de massa indicou que o lipídeo A não foi defosforilado, e, portanto ainda não tivemos sucesso na obtenção de MPLA de salmonelas. Por isso, nos ensaio em animais foi usado o MPLA de salmonelas comercial como adjuvante.

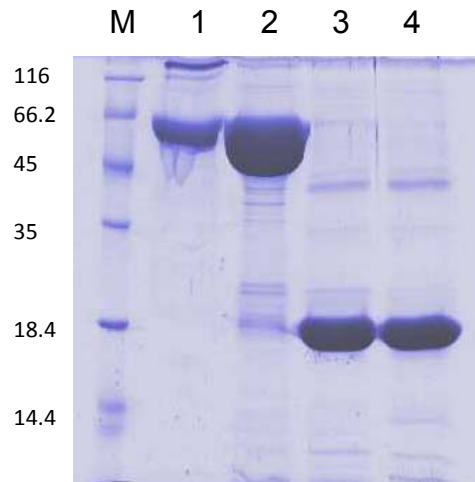
4.3 Preparo dos antígenos

Para os ensaios de imunização de animais a expressão das proteínas OmpA e LigA foram induzidas por IPTG em culturas de clones de *E. coli* BL21DE3 com os vetores pAE_ompA ou pAE_LigAc (este cedido pela Dra. Patrícia Abreu). Essas proteínas foram purificadas a partir da fração solúvel recuperada.

As proteínas OmpA e LigA, expressas com cauda de histidina, foram purificadas em coluna IMAC e analisadas em gel de SDS-PAGE. As massas de proteína purificadas foram estimadas por densitometria do gel, usando massas

conhecidas de BSA como padrão. As concentrações das proteínas foram também dosadas por Bradford. Na Figura 18, o gel ilustra a recuperação das proteínas após purificação.

Figura 18 - Análise das preparações das proteínas LigA e OmpA, por SDS-PAGE.



M- Marcador (Unstained protein molecular weight marker - Thermo Scientific), 1- BSA 2 μg , 2- LigA 15 μL , 3 e 4 – Ompa 15 μL .

A concentração dos antígenos foi calculada a cada preparação, baseada em densitometria dos géis e dosagens por Bradford. Para o primeiro ensaio em animais, a preparação da proteína OmpA foi 0,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e da proteína LigA 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. No segundo ensaio a preparação de LigA tinha concentração de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Essas concentrações foram consideradas para as formulações de imunização, utilizando 50 μg de proteína por dose em volume de 200 μL para cada hamster.

4.4 Ensaio de imunização e desafio com leptospiras em hamsters

Os ensaios em animais foram propostos para verificar a capacidade protetora da imunização, foram usados os antígenos LigA e OmpA com os adjuvantes MPLA de salmonelas, de *Bordetella pertussis* e *Leptospira interrogans*.

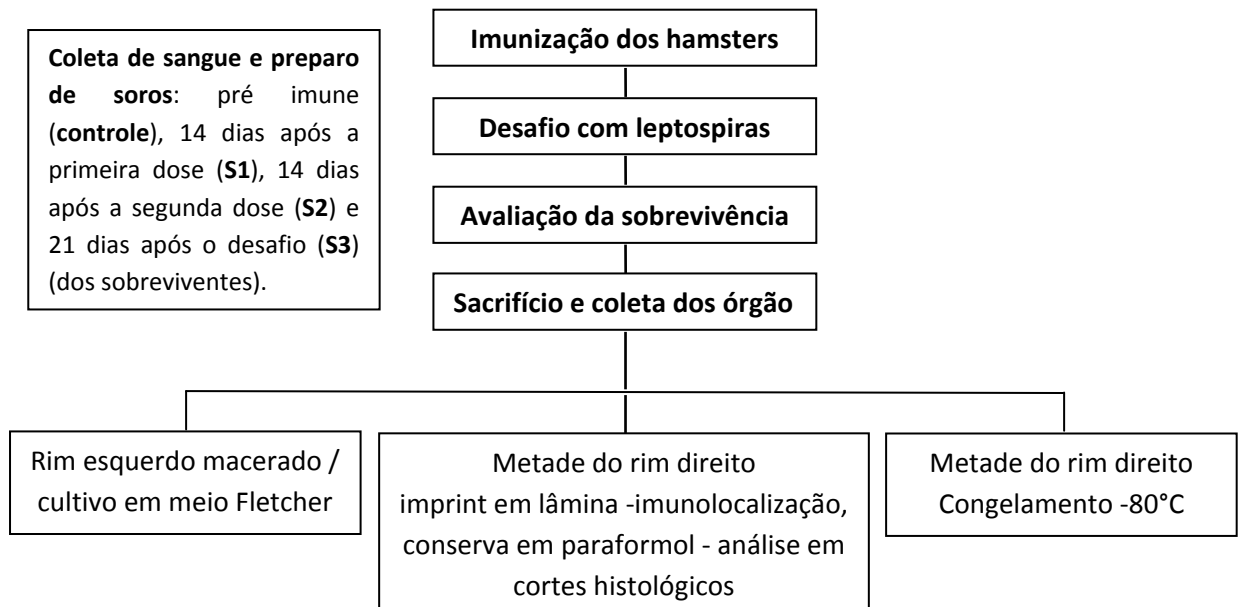
No primeiro ensaio em animais, foram utilizados os adjuvantes MPLA de salmonela (comercial), MPLA de *Bordetella pertussis* (proveniente da Divisão de produção do Instituto Butantan). Em todas as formulações foi usado o adjuvante hidrato de alumínio (Alhydrogel). E no segundo ensaio em animais, foram utilizados

MPLA de *Leptospira interrogans* Copenhageni 10A e novamente o MPLA de salmonela (comercial), juntamente com alhydrogel.

4.4.1 Primeiro ensaio de imunização e desafio em hamsters

Um esquema geral do primeiro ensaio em animal e coletas de amostras é apresentado na Figura 19

Figura 19 - Esquema do primeiro ensaio de imunização em hamsters e coletas de amostras, sangue e rins dos animais sobreviventes ao desafio de *Leptospira*.



4.4.2 Grupos experimentais do primeiro ensaio em animal

As formulações de imunização e o número de hamsters por grupo experimental estão apresentados na tabela 6. Os antígenos LigA ou OmpA foram usados com os adjuvantes MPLA de bordetela (MPLA_{bo}) ou MPLA de salmonela (MPLA_{sa}) sempre com hidrato de alumínio Alhydrogel (Alu). Os animais foram imunizados com duas injeções subcutâneas em intervalo de 15 dias.

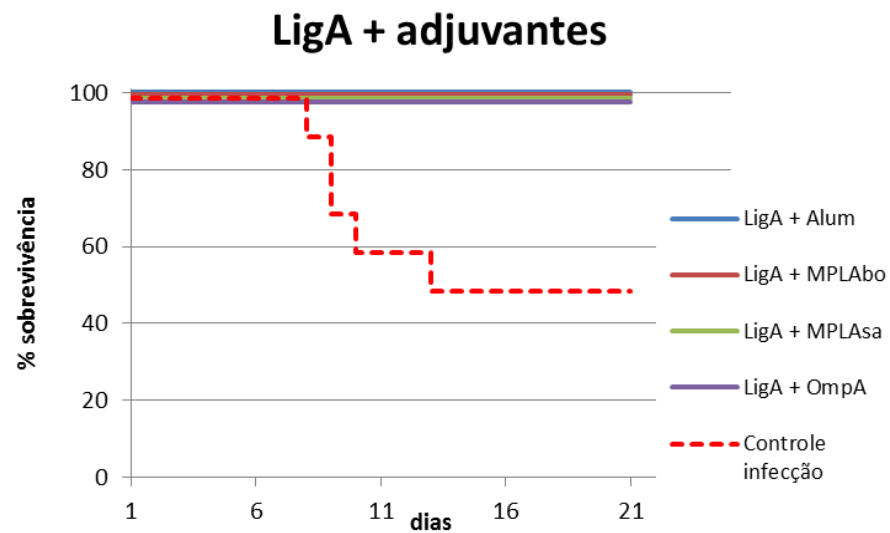
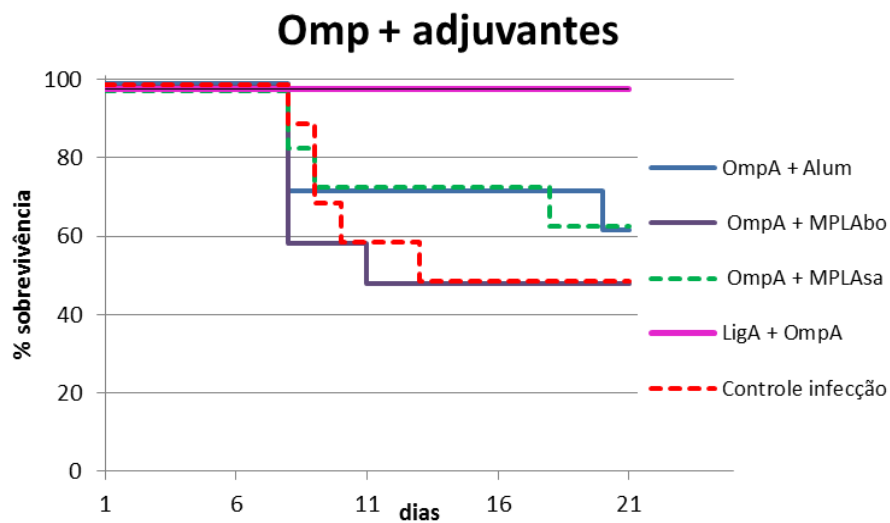
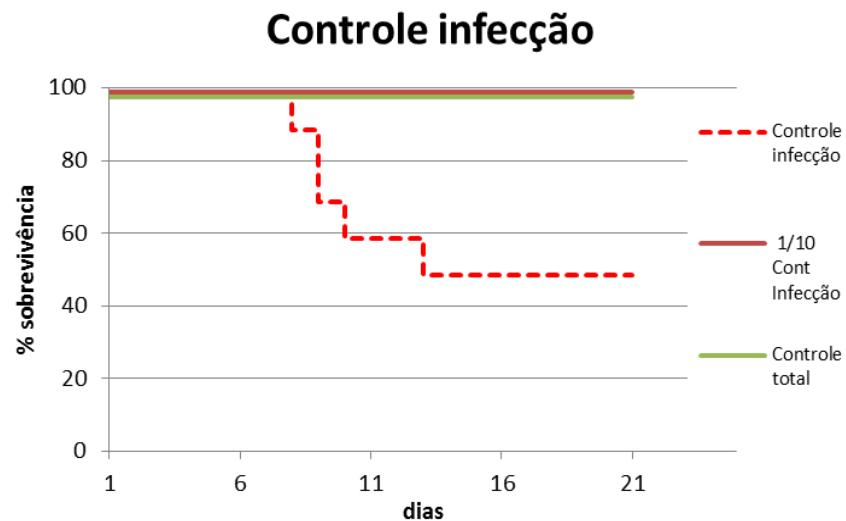
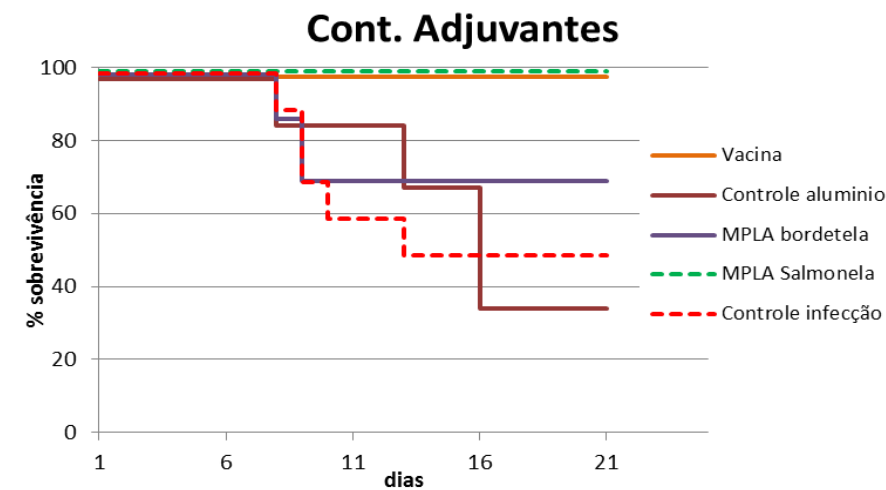
4.4.3 Desafio com leptospiras e análise da sobrevivência dos hamsters

Quinze dias após a segunda dose de imunização os animais foram desafiados por injeção intraperitoneal com 10^7 leptospiras cultivadas como descrito em materiais e métodos. A Figura 20 ilustra as curvas de sobrevivência dos animais ao longo de 21 dias de observação.

Tabela 6 - Grupos experimentais e formulações vacinais para imunização de hamsters

Grupos	Imunógenos (número de animais no grupo)	Formulações para doses em 200 µL
1	Vacina comercial (10)	Vacina comercial (Farrow Sure® B Gold - Pfizer) 200 µL por animal
2	Controle Alu (6)	15 µL de suspensão Alhydrogel/dose
3	Controle Alu + MPLAbo (6)	2,2 µg de MPLAbo/dose (~1,5 nmol / dose) + 15 µL Alu/dose
4	Controle Alu + MPLAsa (6)	2,2 µg MPLAsa/dose (~1,5 nmol / dose) + 15 µL Alu/dose
5	OmpA + Alu (10)	50 µg de OmpA/dose + 15 µL Alu/dose
6	OmpA + Alu + MPLAbo (10)	50 µg de OmpA/dose + 15 µL Alu/dose + 2,2 µg/dose MPLAbo
7	OmpA + Alu + MPLAsa (10)	50 µg de OmpA/dose + 15 µL Alu/dose + 2,2 µg/dose MPLAsa
8	LigA + Alu (10)	50 µg de LigA/dose + 15 µL/dose Alhydrogel
9	LigA + Alu + MPLAbo (10)	50 µg de LigA /dose + 2,2 µg/dose MPLAbo + 15 µL/dose Alhydrogel
10	LigA + Alu + MPLAsa (10)	50 µg de LigA /dose + 2,2 µg/dose MPLAsa + 15 µL/dose Alhydrogel
11	Lig A + OmpA + Alu (10)	50 µg de LigA /dose + 70 µL/dose OmpA + 15 µL/dose Alhydrogel
12	Controle infecção (10)	Não recebeu imunização e foi desafiado com 10 ⁷ leptospiras
13	Controle infecção1/10 (5)	Não recebeu imunização e foi desafiado com 10 ⁶ leptospiras
14	Controle total (5)	Não foi imunizado nem desafiado

Figura 20 - Monitoramento da sobrevivência dos hamsters após imunização e desafio com leptospiras virulentas (10⁷ bactérias).



No primeiro ensaio o grupo controle de infecção apresentou 50% de sobrevivência, o que dificultou a avaliação de proteção. Ainda assim foi possível confirmar a proteção pela imunização com LigA, verificando-se 100% de sobrevivência dos animais imunizados com esse antígeno, comparável à imunização com a vacina comercial. Diferente dos outros grupos, esses animais não apresentaram sintomas da leptospirose, semelhante ao grupo imunizado com a vacina comercial.

Os grupos de animais imunizados com a proteína OmpA com adjuvantes alumínio ou alumínio + MPLAsa apresentaram sobrevivência maior que o grupo controle de infecção. Muitos desses animais apresentaram sintomas da doença, portanto concluímos que a imunização com OmpA não resultou em proteção.

Neste ensaio não verificamos diferenças na sobrevivência dos animais imunizados com os antígenos com ou sem os adjuvantes MPLA.

4.4.4 Avaliação macroscópica dos rins dos animais sobreviventes

Os animais sobreviventes ao desafio foram sangrados pelo plexo retro orbital, em seguida, foram sacrificados e os seus rins coletados para análises.

Os rins foram observados macroscopicamente e analisados quanto à presença de alterações, sendo classificados com 0 a 3 cruces dependendo da intensidade dos danos observados. Os resultados estão na tabela 7.

Todos os hamsters imunizados com a vacina comercial apresentaram rins saudáveis (classificação 0). Os animais que tinham algum grau de infecção apresentaram desde pontos esbranquiçados nos órgãos (classificação +), aparência rugosa (classificação ++) ou até uma aparência atrofiada e sem irrigação sanguínea (classificação +++)

Os rins de todos os animais imunizados com o antígeno LigA tinham aparência saudável, assim como os rins dos animais do grupo imunizado com vacinacomercial.

Tabela 7 - Resultados de sobrevivência e isolamento de leptospiros dos rins por cultivo de macerados em meio Fletcher.

Grupo	Sobreviventes (%)	Isolamento em meio Fletcher	Aparência dos rins por animal	
			Direito	Esquerdo
1 Vacina	10/10 (100%)	10 (-)	(0) (todos)	(0) (todos)
2 Controle Alu	2/6 (33%)	2 (+)	(+) (0)	(0) (+)
3 MPLAbo	4/6 (66%)	2 (+) 2 (-)	(+) (++) (+) (+)	(+) (+++) (++) (+)
4 MPLAsa	6/6 (100%)	6 (+)	(+) (+) (+) (0) (++) (++)	(++) (++) (++) (+) (++) (+)
5 OmpA + Alu	6/10 (60%)	4 (+) 2(-)	(0) (0) (+) (+) (++) (++)	(++) (+) (++) (+) (+++) (++)
6 OmpA + Alu + MPLAbo	5/10 (50%)	5 (+)	(+) (++) (+) (++) (++)	(++) (++) (+) (++) (+++)
7 OmpA + Alu + MPLAsa	6/10 (60%)	6 (+)	(0) (++) (+) (0) (+) (++)	(+) (+) (0) (0) (++) (+)
8 LigA + Alu	10/10 (100%)	10 (+)	(0) (todos)	(0) (todos)
9 LigA + Alu + MPLAbo	10/10 (100%)	10 (+)	(0) (todos)	(0) (todos)
10 LigA + Alu + MPLAsa	10/10 (100%)	10 (+)	(0) (todos)	(0) (todos)
11 Lig A + OmpA	10/10 (100%)	10 (+)	(0) (todos)	(0) (todos)
12 Controle infectado	5/10 (50%)	4 (+) 1 (-)	(+++)(+++)(++)(+)(+)	(+)(+++)(0)(++) (0)
13 Controle infectado 1/10	5/5 (100%)	5 (+)	(0) (0) (0) (0) (0)	(0) (0) (0) (+) (+)
14 Controle total	5/5 (100%)	5(-)	(0) (todos)	(0) (todos)

Análise macroscópica dos rins e classificação da patologia (0) rim normal, (+) rim apresenta alguns pontos hemorrágicos, (++) rim apresenta uma maior quantidade de pontos hemorrágicos, podendo apresentar alteração de cor, (+++) rim apresenta aspecto enrugado, alterações de cor e tamanho.

4.4.4.1 Isolamento de leptospiras por cultivo dos macerados de rim

Para verificar possível imunidade protetora contra a colonização renal por leptospiras, macerados renais dos animais sobreviventes ao desafio foram cultivados em meio semi-sólido Fletcher. Os cultivos foram analisados quanto ao crescimento de leptospiras, e os resultados negativo (-) ou positivo (+), inferindo colonização dos rins, é apresentada na tabela 7.

Os animais imunizados com a vacina comercial tiveram 100% de sobrevivência, o rim tinha uma aparência saudável pela avaliação macroscópica, além de não apresentarem infecção renal pela bactéria, quando o macerado do órgão foi cultivado em meio Fletcher.

Em geral, os animais que receberam apenas adjuvantes (Alhydrogel, MPLA bordetela ou MPLA salmonela) apresentaram resultado positivo para colonização renal pelo cultivo em meio Fletcher. Pela observação macroscópica os rins dos animais apresentavam danos em maior ou menor grau.

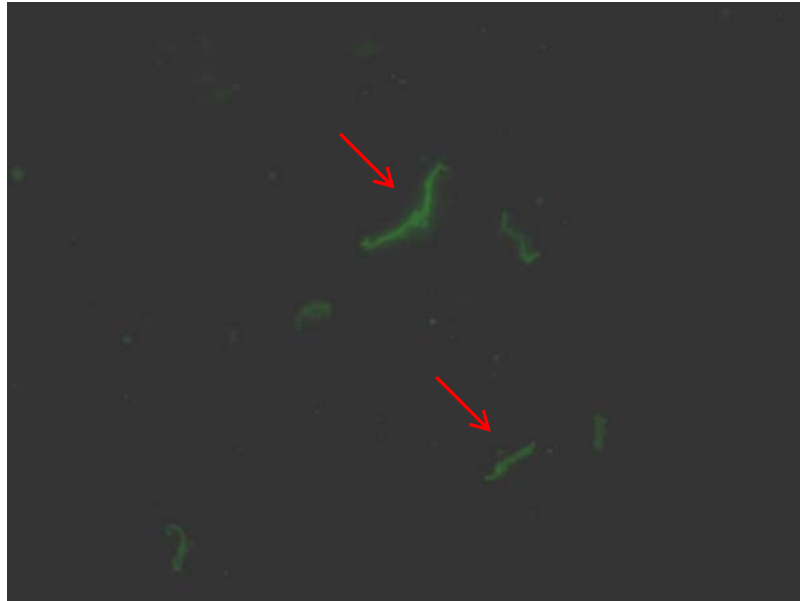
Os animais imunizados com o antígeno proteico OmpA, tiveram uma sobrevivência de 57%, não significativamente diferente do grupo controle de infecção. Em geral, apresentaram infecção renal por cultivo dos macerados em meio Fletcher e os rins apresentavam algum tipo de dano visível macroscópico.

No ensaio descrito, os hamsters que foram imunizados com a proteína LigA tiveram 100% de sobrevivência. Quando analisados macroscopicamente, os rins de todos os animais tinham uma aparência saudável, sem qualquer tipo de alteração, embora todos tenham apresentado colonização renal por leptospiras.

4.4.4.2 Imprint renal e imunolocalização de Leptospiras

Ensaio de imprints de rins foram realizados para verificar a presença de leptospiras nos rins dos animais sobreviventes ao desafio, por imunohistoquímica, como descrito por Chagas-Junior (CHAGAS-JUNIOR et al., 2009). A Figura 21 apresenta a imagem de uma lâmina de imprint, positiva para leptospira.

Figura 21 – Imunolocalização de *Leptospira* em imprint de rim de hamster infectado.



Imunolocalização de *Leptospira* em imprint de rim de hamster usando anticorpos anti-leptospira feito em coelho e anticorpo anti-coelho conjugado com FITC em microscópio confocal de varredura à laser (LSM META) em aumento de 400x.

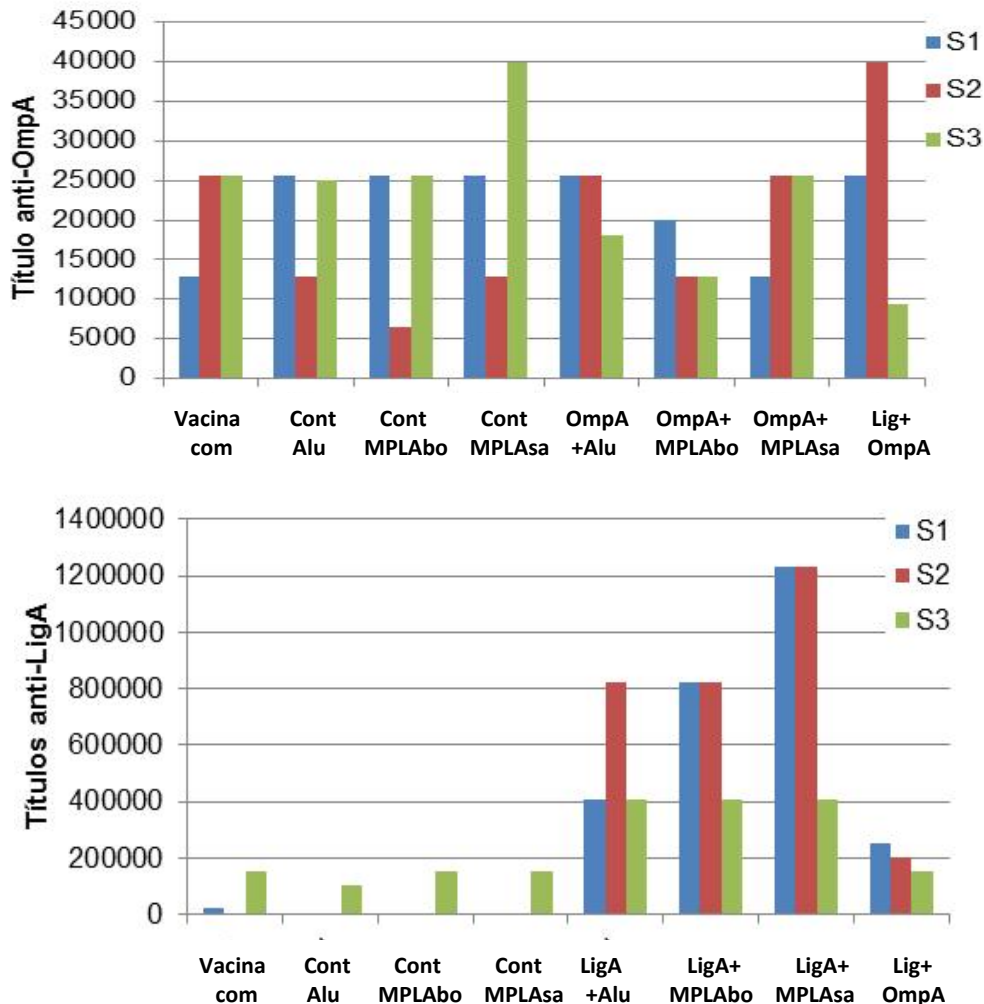
Não foram detectadas leptospiros nos imprints renais de animais imunizados com a vacina comercial pelo ensaio imunohistoquímico, ao contrário dos imprints renais dos animais imunizados com a proteína OmpA. Os imprints renais dos hamsters imunizados com a proteína LigA também apresentaram resultado positivo na detecção da bactéria.

Embora os resultados de imprint estivessem em acordo com os resultados de cultivo em meio Fletcher, o ensaio teria que ser otimizado para resultados quantitativos, como é proposto pelo autor. O ensaio de imprint é trabalhoso e caro em comparação com os cultivos de macerados renais, e estes nos parece fornecer resultados mais precisos.

4.4.4.3 Avaliação da resposta imunológica por ELISA

A avaliação da resposta imunológica quanto à concentração de IgG específico anti-OmpA e anti-LigA no soro dos animais imunizados foi feita por método convencional de ELISA. A Figura 22 ilustra os títulos de anticorpos nos diferentes grupos experimentais após cada imunização (sangrias S1 e S2) e após o desafio por infecção com leptospiros (S3).

Figura 22 – Títulos de anticorpos contra as proteínas OmpA ou LigA nos soros dos animais dos diferentes grupos experimentais.



Os títulos de anticorpos anti-OmpA ou anti-LigA foram feitas em em pool de soros dos animais de cada grupo. Títulos como diluição para atingir absorbância 0,1.

Os títulos de anticorpos anti-LigA atingiram valores até um milhão, medidos após imunização, indicando sua alta imunogenicidade. Em comparação, o antígeno OmpA foi muito menos imunogênico, atingindo títulos máximos entre 25 mil a 40 mil, semelhante aos valores de grupos controle.

Curiosamente, o grupo imunizado com os dois antígenos, LigA + OmpA, apresentou baixos títulos de anticorpos anti LigA (~200.000), mas, ainda assim todos os animais do grupo sobreviveram.

Importante notar que os títulos de anticorpos anti LigA diminuem na terceira sangria, quando os animais estão infectados. Essa sangria é feita 36 dias após o “booster”, e aparentemente a infecção não aumenta a indução dos anticorpos nesses grupos, mas apenas nos grupos controle .

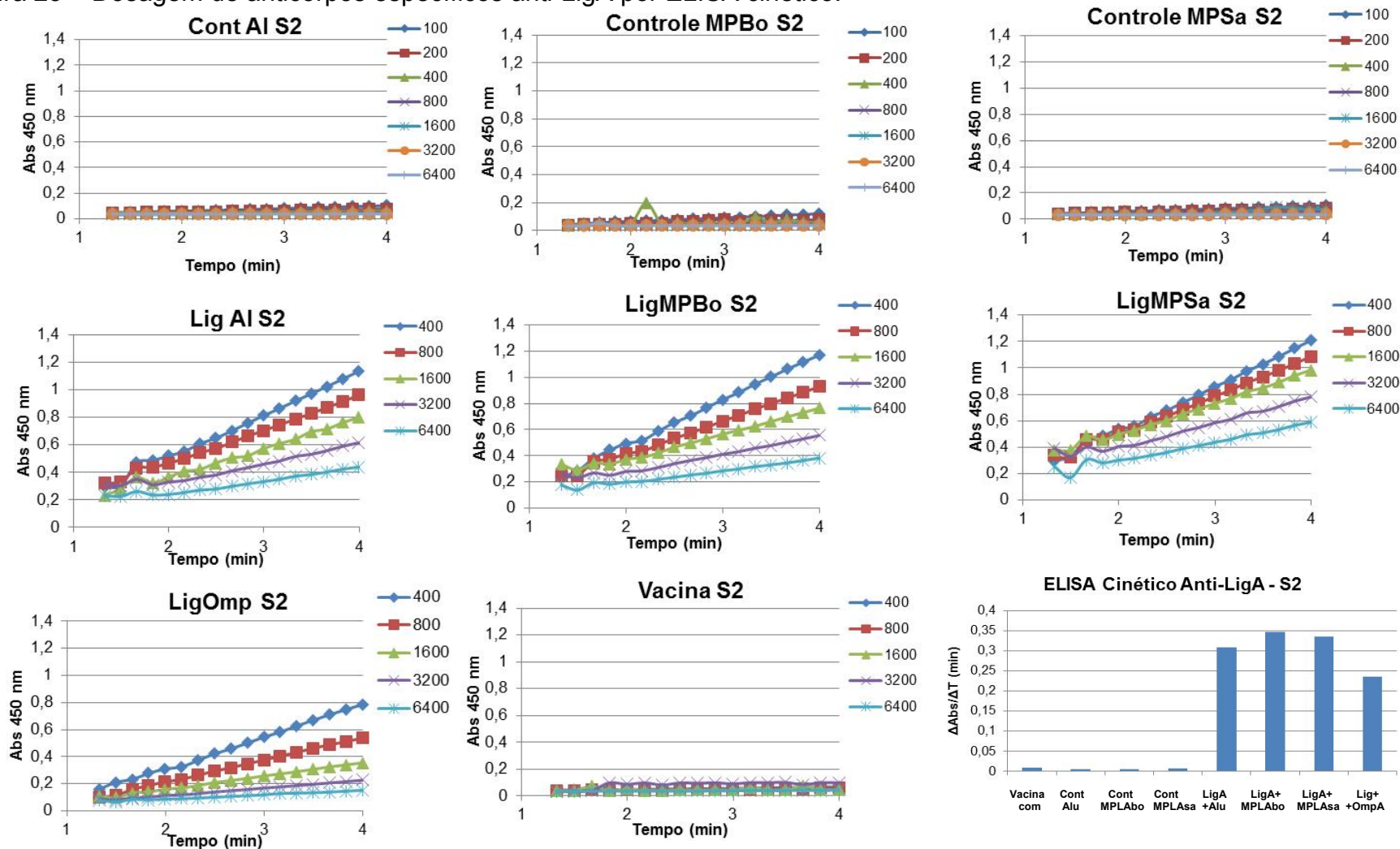
4.5 Padronização do ELISA cinético para dosagem de anticorpos

O método de ELISA convencional baseia-se na dosagem de produção de anticorpos em um soro, detectados por um anticorpo secundário. O anticorpo secundário faz conjugação com uma enzima, por exemplo peroxidase, que permitirá a dosagem por reação colorimétrica. A dosagem se dá através da reação de peroxidase conjugada ao anticorpo secundário sobre o substrato por determinado tempo. Convenciona-se como título do soro a diluição que resulta em leitura de absorbância $\sim 0,1$ ao final do tempo decorrido de reação.

O ELISA cinético foi descrito em 1983 e baseia-se na velocidade inicial de reação da peroxidase com o substrato (TSANG; WILSON; PERALTA, 1983). A disponibilidade de leitor de ELISA que permite múltiplas leituras das placas em curtos intervalos, além de possibilitar agitação e manutenção em temperatura controlada, nos permitiu aplicar o ELISA cinético para dosagens dos soros obtidos no experimento descrito.

Validamos o ensaio utilizando os soros coletados dos animais após a segunda dose de imunização (S2). As curvas cinéticas obtidas com diferentes diluições dos soros de animais controle ou imunizados com formulações de LigA estão apresentadas na Figura 23. Note-se que pelo ELISA convencional a imunização com LigA induziu anticorpos específicos atingindo títulos de 800 mil a 1 milhão. Os resultados do ELISA cinético são apresentados como os coeficientes angulares das retas determinadas pela absorbância em função do tempo. Para comparação entre os soros estabelecemos a diluição 400 dos soros e o tempo de leituras entre 1 e 4 minutos. A primeira leitura em 1 minuto refere-se ao tempo de início de reação pela adição do substrato.

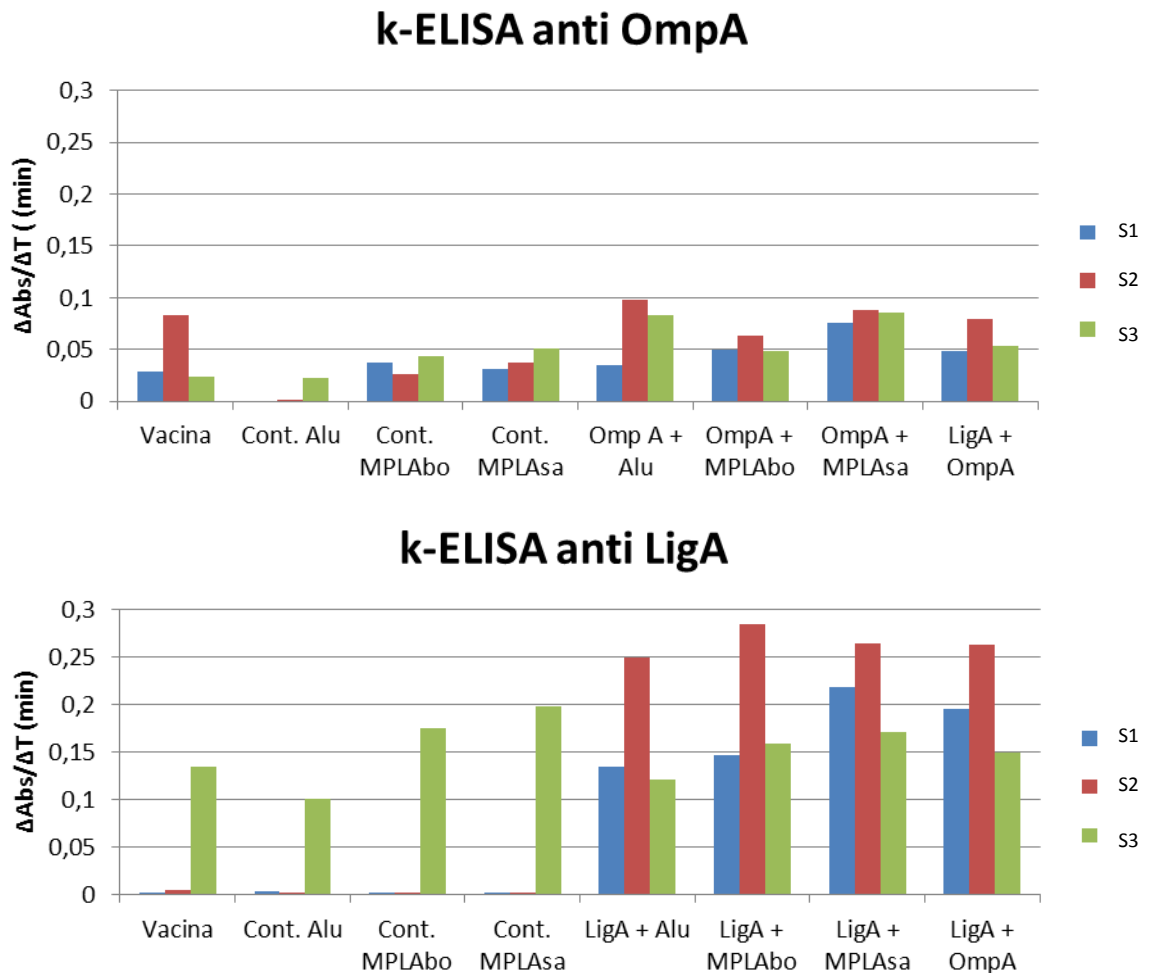
Figura 23 – Dosagem de anticorpos específicos anti-LigA por ELISA cinético.



As placas foram sensibilizadas com LigA e os soros introduzidos nas diluições indicadas. As leituras de absorbância (640nm) foram obtidas a cada 10 segundos entre 1 e 4 minutos após adição de substrato. O gráfico de barras compara o coeficiente angular das medidas dos soros na diluição 400

Os resultados do ELISA cinético dos grupos experimentais no primeiro ensaio de imunização em hamster estão ilustrados na figura 24.

Figura 24 - Os resultados dos coeficientes angulares das curvas de absorbância em função do tempo (k-ELISA)



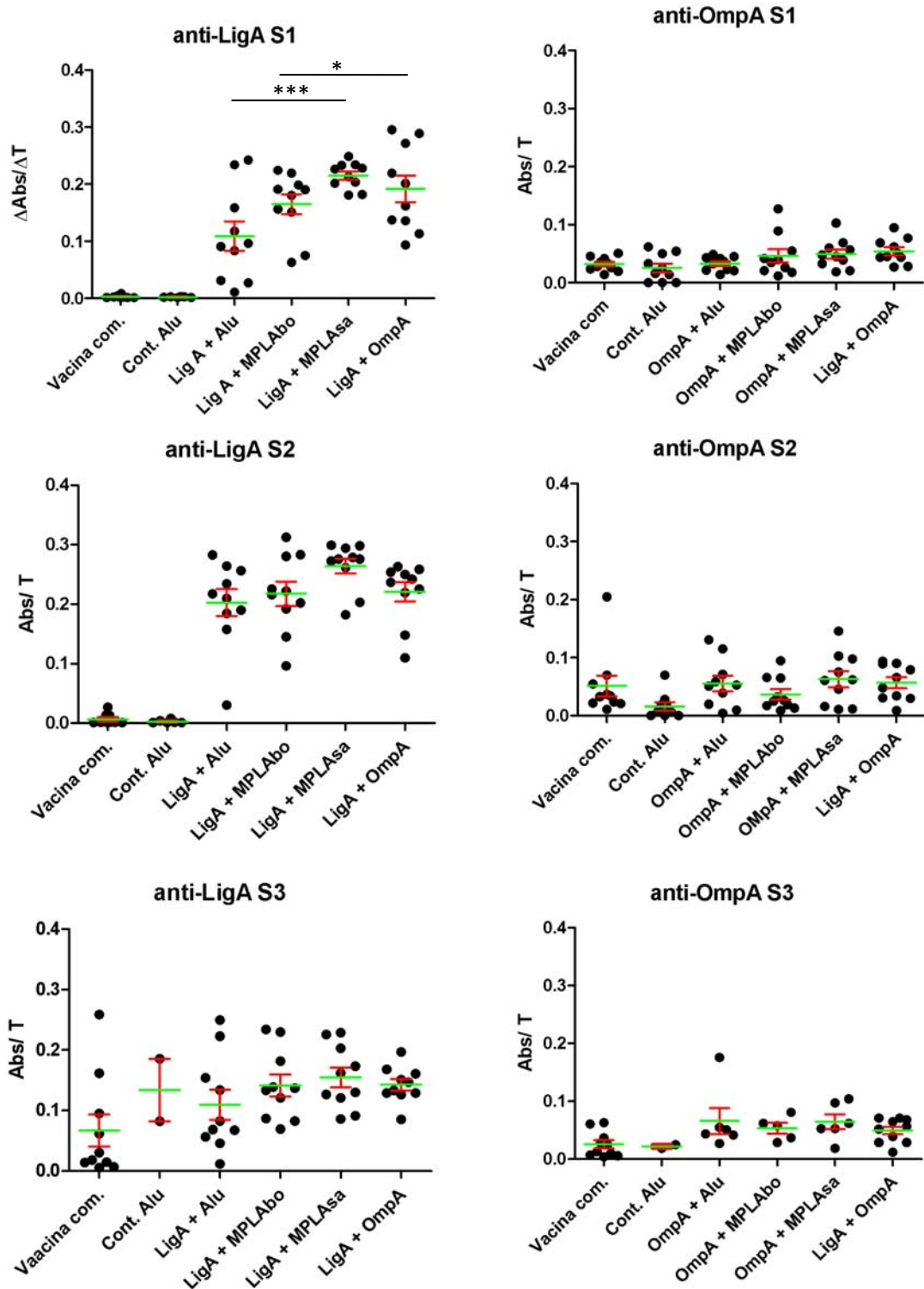
As amostras foram medidas em 640 nm entre 1 e 4 minutos após adição de substrato. Nesse gráfico os valores de $\Delta\text{Abs}/\Delta\text{T}$ (k-ELISA) são comparados usando os diferentes soros em diluição 400.

A indução de anticorpos anti-LigA pela imunização com a vacina comercial foi baixa, mesmo sendo baseada em bacterina. É interessante notar que embora a resposta de anticorpos anti-LigA seja induzida fortemente pela infecção, não foi induzida pela vacinação. Era esperado que a resposta imune protetora conferida pela vacina fosse baseada em anticorpos contra o LPS dos diferentes sorovares que compõem a vacina, porém também era esperado a indução de anticorpos contra o

antígeno LigA que se mostra fortemente imunogênico tanto na imunização com o antígeno recombinante quanto na infecção.

Nesses ELISAs cinéticos as dosagens de anti-LigA resultaram em coeficiente angular da ordem de 0,3, enquanto para anti-OmpA resultaram em 0,1, para soros com a mesma diluição 1:400, denotando a sensibilidade do ensaio. Para avaliação estatística os anticorpos foram dosados no soro de cada animal.

Figura 25 - Anticorpos anti-LigA e anti-OmpA medidos por ELISA cinético no soro de cada animal.



Placas de ELISA sensibilizadas com LigA ou OmpA foram bloqueadas e o soro de cada animal introduzido na diluição 1:400. Solução de anticorpos anti imunoglobulina de hamster conjugado com peroxidase (KPL) foi introduzida na diluição 1: 10000 e a reação da peroxidase desenvolvida com substrato TMB. Foi registrado o aumento de absorbância entre 1 e 4 minutos. ** Diferenças estatisticamente significantes (p value <0,05).

4.6 Segundo ensaio de imunização e desafio com leptospiras em hamsters

O segundo ensaio de imunização e desafio em animais foi proposto para verificar a capacidade protetora da imunização com o antígeno LigA e analisar uma possível atividade adjuvante de MPLA de salmonelas e MPLA de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni 10A.

No primeiro ensaio em animais, verificamos que a proteína OmpA não se mostrou imunogênica ou protetora, mesmo com a atividade adjuvante de MPLA de salmonelas. Em contraste, o antígeno LigA mostrou-se fortemente protetor e a imunogenicidade ainda foi aumentada pelo adjuvante MPLA de salmonela. Por isso, no segundo ensaio utilizamos somente o antígeno LigA, em formulações com MPLA de leptospiras (nossa preparação) e MPLA de salmonelas (comercial). Duas novas questões foram consideradas nesse ensaio, 1- quanto à proteção induzida por LPS de leptospiras e 2- quanto à indução de resposta imune quando o antígeno LigA é apresentado por salmonelas vivas atenuadas recombinantes (a utilização das salmonelas vivas está sendo realizada em colaboração com a Dra. Erika Nakajima). Neste ensaio com hamsters avaliamos a sobrevivência dos animais imunizados, a produção de anticorpos e a colonização renal por leptospira. Os animais foram imunizados com as formulações apresentadas na tabela 8.

4.6.1 Desafio com leptospiras e análise da sobrevivência dos hamsters

Após quinze dias da segunda dose de imunização, os hamsters foram infectados por injeção intraperitoneal com $5,6 \times 10^7$ *L. interrogans* Copenhageni Li-130 virulentas, cultivadas como descrito em materiais e métodos. A Figura 25 ilustra as curvas de sobrevivência dos animais ao longo de 21 dias de observação. Após este período, os animais sobreviventes foram sangrados pelo plexo retro orbital e sacrificados. Os rins foram coletados para análise macroscópica e para cultivo de macerados em meio Fletcher semi-sólido.

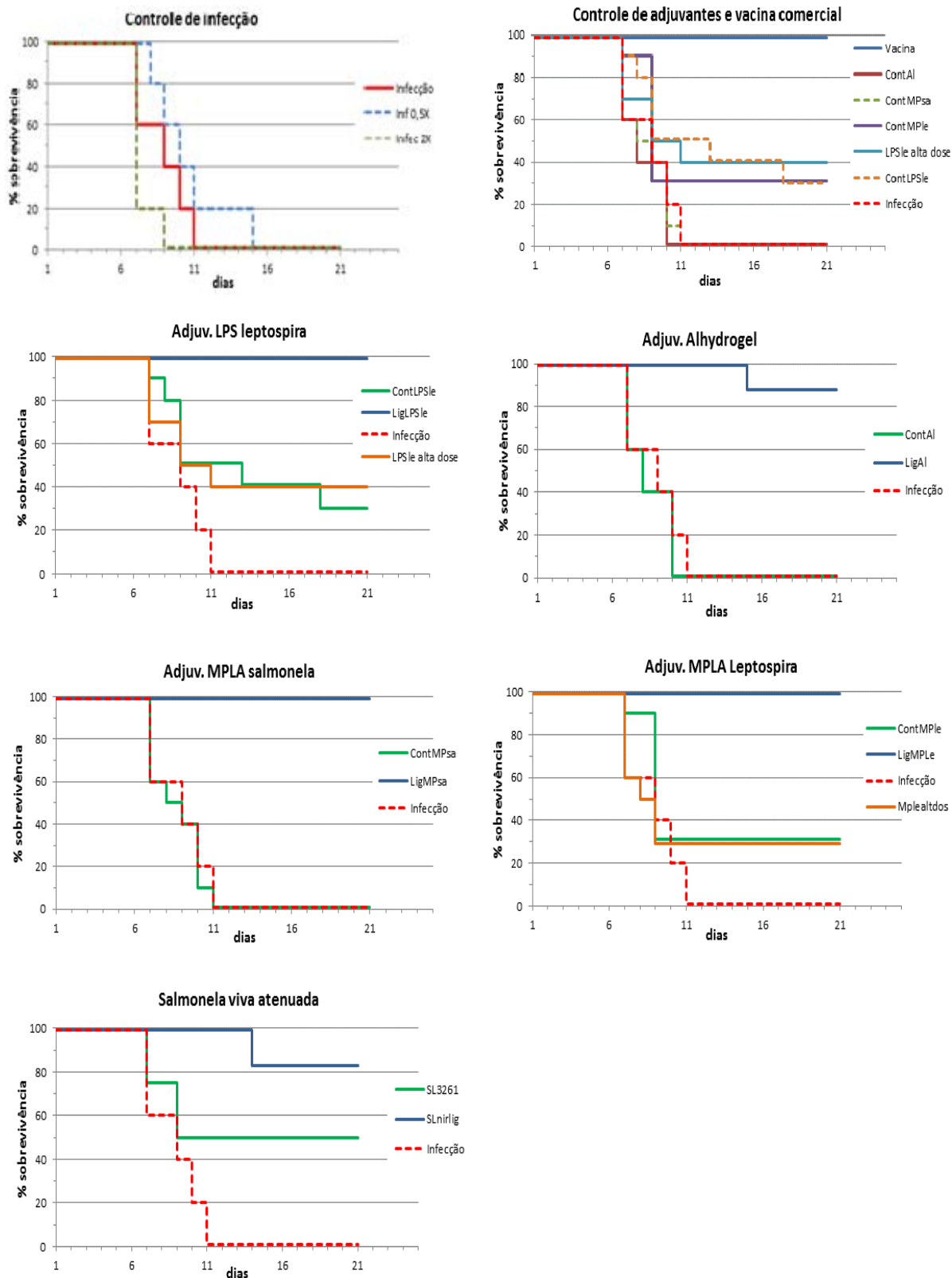
Tabela 8 – Formulações das imunizações dadas aos hamsters no segundo ensaio de imunização.

Grupo (número de animais)	Formulação por dose
1 Vacina comercial (10)	200 µL da vacina comercial Pfizer FarrowSure B Gold
2 Controle Alu (10)	15 µL de Alhydrogel
3 Controle Alu + MPLAsa (10)	15 µL de Alhydrogel + 1,5 nmol MPLAsa
4 Controle Alu + MPLAle (10)	15 µL de Alhydrogel + 1,5 nmol MPLAle
5 Controle Alu + MPLAle alta dose (10)	15 µL de Alhydrogel + 3 nmol MPLAle
6 Controle Alu + LPSle alta dose (10)	15 µL de Alhydrogel + 60 µg LPSle
7 Controle Alu + LPSle (10)	15 µL de Alhydrogel + 6 µg LPSle
8 LigA + Alu (10)	50 µg LigA + 15 µL de Alhydrogel
9 LigA + Alu + MPLAsa (10)	50 µg LigA + 15 µL de Alhydrogel+1,5 nmol MPLAsa
10 LigA + Alu + MPLAle (10)	50 µg LigA + 15 µL de Alhydrogel+1,5 nmol MPLAle
11 LigA + Alu + LPSle (6)	50 µg LigA + 15 µL de Alhydrogel+ 6 µg LPSle
12 Salmonela SL3261 pAE_ligA	3×10^7 bactérias via ip em 200 µL de salina (não expressa LigA)
13 Salmonela SL3261 pAEnir_ligA	3×10^7 salmonela expressando LigAc induzida in vivo
14 Controle dose 2x desafio (5)	Animais não imunizados desafiados com 10^8 leptospiras
15 Controle dose 1x desafio (10)	Animais não imunizados desafiados com $5,6 \times 10^7$ leptospiras
16 Controle dose 0,5x desafio (5)	Animais não imunizados desafiados com $2,3 \times 10^7$ leptospiras
17 Controle total (5)	Animais não imunizados e não desafiados

Tabela 9 – Análise da sobrevivência dos animais imunizados e desafiados com leptospiras virulentas

Grupo (número de animais)	Sobrevivência (%) Após 21 dias do desafio
1 Vacina comercial (10)	100
2 Controle Alu (10)	0
3 Controle Alu + MPLAsa (10)	0
4 Controle Alu + MPLAle (10)	30
5 Controle Alu + MPLAle alta dose (10)	30
6 Controle Alu + LPSle alta dose (10)	40
7 Controle Alu + LPSle (10)	30
8 LigA + Alu (10)	80
9 LigA + Alu + MPLAsa (10)	100
10 LigA + Alu + MPLAle (10)	100
11 LigA + Alu + LPSle (6)	100
12 Salmonela 3261 pAEnir (4)	50
13 Salmonela 3261 pAEnir_LigA (6)	83
14 Controle dose 2xdesafio (5)	0
15 Controle dose 1x desafio (10)	0
16 Controle dose 0,5x desafio (5)	0
17 Controle total (5)	100

Figura 26 - Curvas de sobrevivência dos hamsters imunizados



Os animais receberam duas doses das formulações indicadas e desafiados com leptospira virulentas ($5,6 \times 10^7$ células).

No segundo ensaio, o desafio foi realizado com dose 5 vezes superior ($5,6 \times 10^7$ bactérias) àquela usada no ensaio anterior e desta vez resultou em 100% de morte nos animais controle, o que é importante para o teste, pois indica que a bactéria estava suficientemente virulenta para o desafio.

As curvas de sobrevivência de controle de infecção mostraram que o dobro ou metade da dose de desafio também resultaram em 100% de mortes, com pequeno desvio na frequência de mortes. Não somente o número de bactérias é importante, mas também o estado de virulência dos cultivos. Neste caso somente uma passagem em cultivo após isolamento garantiu a virulência adequada. Hoje sabemos que diferentes sorovares de leptospiras podem ter virulências bastante variadas. Por exemplo, com o sorovar Pomona, com dose 10.000 vezes inferior pode resultar em 100% de mortes em ensaio semelhante.

Interessante notar que os grupos imunizados com 1,5 nmol ou 3 nmol de MPLA de leptospiras ou 6 ou 60 μg de LPS de leptospiras tiveram sobrevivência significativa, entre 30 e 40%, uma vez que todos os controles resultaram em 100% de mortes. Na verdade esperávamos que a imunização com LPS do mesmo sorovar do desafio conferisse sobrevivência maior, dada a importância desse componente nas vacinas comerciais baseadas em bacterinas. A dose de 60 μg de LPS foi determinada como semelhante à das vacinas comerciais para cada sorovar. O resultado indica que, embora o LPS seja importante, outros componentes da vacina participam na proteção. Entretanto, é importante notar que o MPLA teve o mesmo resultado de proteção, embora a proteção sorovar específica seja sempre atribuída à porção polissacarídica do LPS.

Como no ensaio anterior, a imunização com LigA conferiu 100% de sobrevivência em todos os grupos, exceto no grupo LigA com hidrato de alumínio com 90% de sobrevivência. No ensaio anterior constatamos que, embora os animais parecessem saudáveis e os rins tivessem aparência normal macroscopicamente, todos os rins estavam colonizados. Desta vez, provavelmente devido à maior dose de desafio, notamos que ao final dos 21 dias de desafio alguns animais já apresentavam sinais da doença.

Observamos que a utilização de LPS ou MPLA como adjuvantes não foi eficiente para impedir a doença renal.

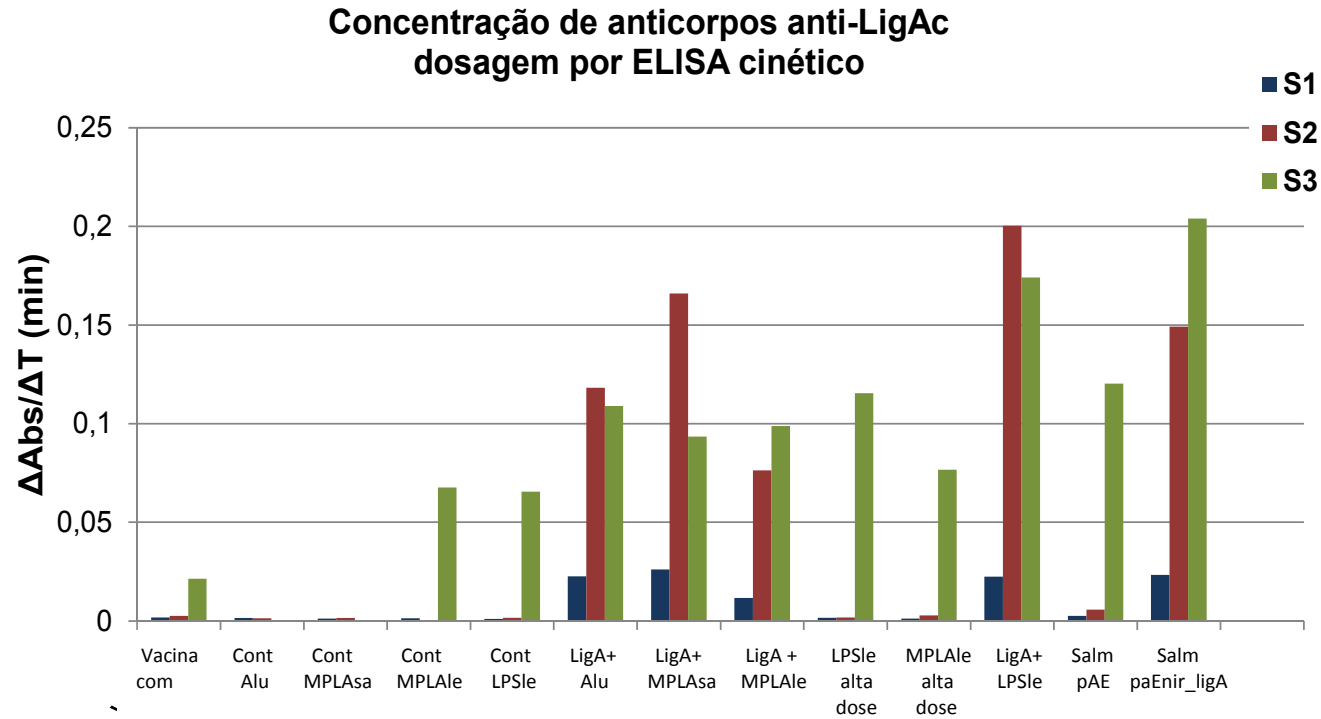
Outra observação importante é relativa à sobrevivência de todos os animais imunizados com salmonela viva atenuada apresentando o antígeno LigA. Nesse clone a expressão do antígeno está sob controle do promotor nir, induzível in vivo no ambiente anaeróbico dos tecidos do mamífero. Segundo a literatura, a apresentação de antígenos por salmonelas resulta em imunidade humoral e celular (JACKSON et al., 1994; WU; CHEN; KUO, 2006). Porém, este grupo também apresentou sobrevivência de 83% dos animais (grupo composto por 6 animais) e os rins apresentavam claros sinais de leptospirose.

Como no primeiro ensaio de imunização e desafio, o grupo imunizado com a vacina comercial apresentou 100% de sobrevivência e os rins de todos os animais tinham aparência saudável.

4.7 Dosagem de anticorpos anti-LigA por ELISA cinético do segundo ensaio de imunização

No segundo ensaio de imunização e desafio, o sangue dos animais foi coletado quinze dias após cada injeção (S1 e S2) ou 21 dias após o desafio (S3) e os soros dos animais foram testados em “pool” por ELISA cinético para medir o conteúdo de anticorpos anti-ligA. A Figura 27 mostra os resultados da variação da absorbância com o tempo ($\Delta\text{abs}/\Delta T$) no período 1 a 4 minutos de reação colorimétrica. Todos os soros foram usados na diluição padronizada 1:400.

Figura 27 - Dosagem de anticorpos anti-LigA nos “pools” de soros dos animais de cada grupo experimental por ELISA cinético.



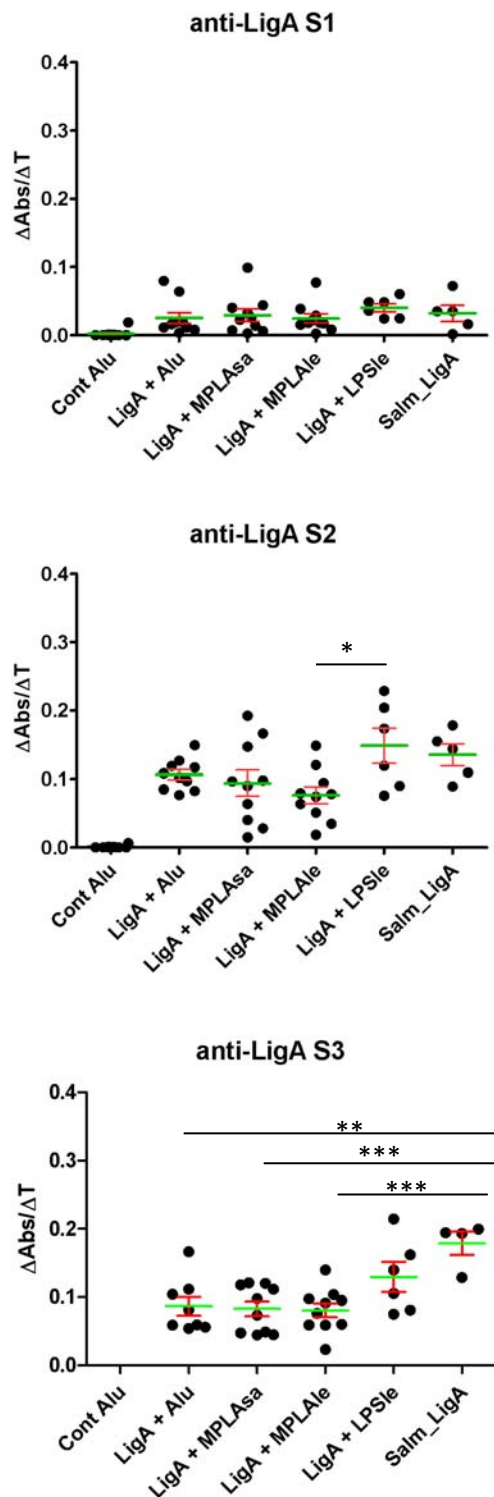
As placas de ELISA foram sensibilizadas com LigA recombinante, bloqueadas com proteínas de leite e o soro de cada grupo introduzido na diluição 1:400. Solução de anticorpos anti imunoglobulina de hamster conjugado com peroxidase (KPL) foi introduzido na diluição 1: 10000 e a reação colorimétrica da peroxidase foi desenvolvida por adição de substrato TMB. O resultado é apresentado como velocidade de aumentos de absorbância medido entre 1 e 4 minutos de reação.

Observa-se, especialmente nos soros de segunda sangria, que a resposta imune é mais proeminente nos grupos imunizados com LigA com os adjuvantes MPLA de salmonela e LPS de leptospiras. Também se observa alta concentração de anticorpos contra o antígeno no grupo imunizado com salmonelas vivas apresentando LigA.

É interessante notar que a imunização com a vacina comercial não induziu anticorpos anti-LigA. Os resultados indicam que a infecção determina indução de anticorpos anti-LigA, em intensidade possivelmente relacionada com a persistência da bactéria no organismo, uma vez que as bactérias não persistem nos hamsters imunizados com a vacina comercial e nestes animais a indução de anticorpos foi baixa.

Para análise estatística foi feita dosagem de anticorpos nos soros de cada animal do grupo controle alumínio e dos grupos imunizados com LigA. A Figura 28 mostra os resultados dos ELISA cinéticos.

Figura 28 - Anticorpos anti-LigA analisados individualmente para cada animal, medido por ELISA cinético.



Placas de ELISA sensibilizadas com LigA foram bloqueadas e o soro de cada animal introduzido na diluição 1:400. Solução de anticorpos anti imunoglobulina de hamster conjugado com peroxidase (KPL) foi introduzida na diluição 1: 10000 e a reação da peroxidase desenvolvida com substrato TMB. Foi registrado o aumento de absorvância entre 1 e 4 minutos. ** Diferenças estatisticamente significantes (p value <0,05).

Os resultados indicam o aumento significativo de anticorpos anti-LigA em todos os grupos imunizados com o antígeno em relação ao grupo controle, como esperado.

Na segunda sangria, observamos que os soros dos animais imunizados com formulações com Lig mais os adjuvantes MPLAsa, MPLAle e LPSle apresentaram alta variação na quantidade de anticorpos anti-LigA, em comparação com os soros dos animais imunizados com a proteína e apenas hidrato de alumínio, nos quais as respostas imunes foram mais homogêneas.

Os resultados indicaram diferença significativa entre os grupos imunizados com LigA mais os adjuvantes MPLAle e LPSle, mas não foi possível confirmar a atividade adjuvante de MPLA de leptosiras ou de salmonelas.

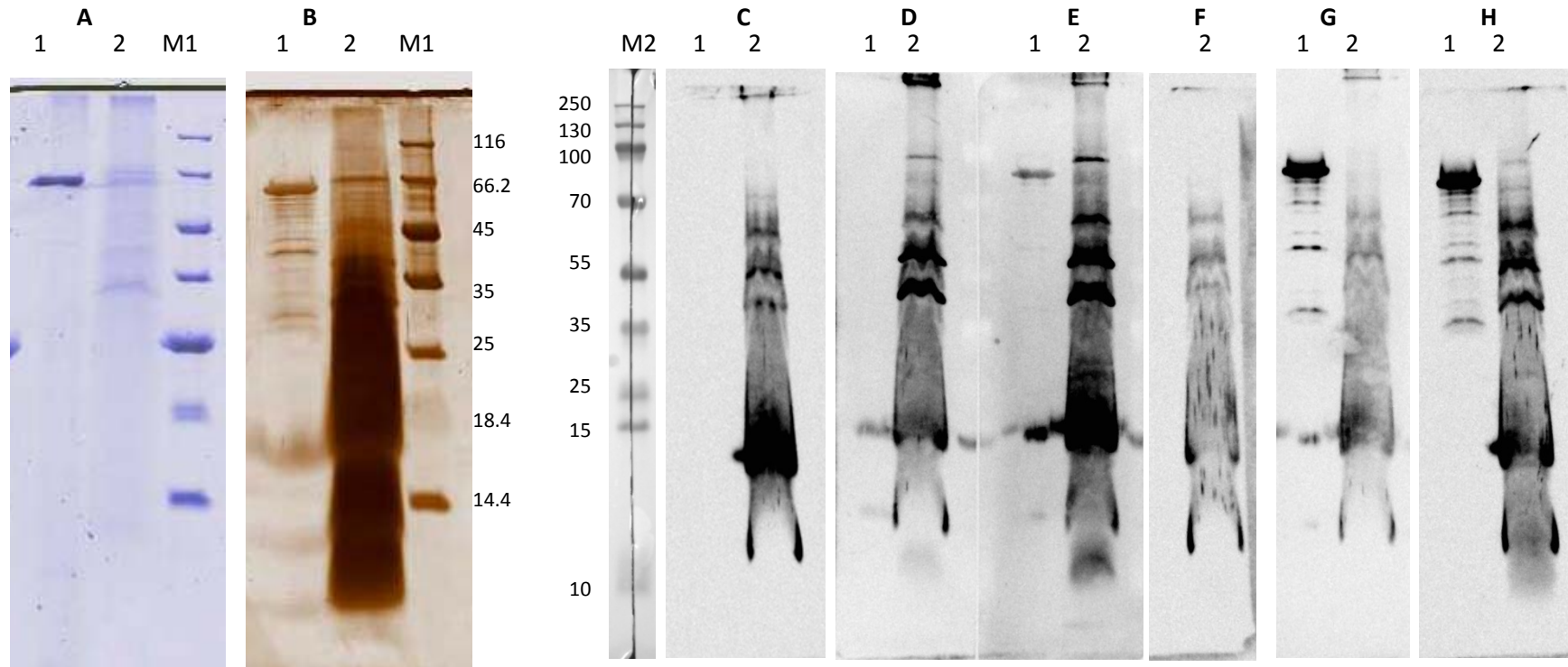
Na terceira sangria, os dados indicaram que a quantidade de anticorpos anti-LigA no grupo imunizado com salmonela viva atenuada apresentando o antígeno foi significativamente maior que nos outros grupos imunizados com LigA. Sendo a terceira sangria realizada após a infecção, supomos que a dosagem esteja refletindo na forma de apresentação do antígeno pela leptospira. Nesse caso, maior quantidade de anticorpos anti-LigA pode significar persistência da infecção.

4.8 Reconhecimento de LPS de leptosiras por anticorpos induzidos pela imunização com LPS de leptosiras ou com a vacina comercial

A proteção conferida contra leptospirose por imunização de animais com vacinas comerciais é sempre referida como sorovar específica, indicando que a proteção é dependente do tipo de LPS presente na formulação. Entretanto verificamos que a imunização com LPS purificado conferiu apenas proteção parcial. O estabelecimento de ensaio do tipo western blot para detecção de anticorpos contra LPS teve por objetivo comparar a indução de anticorpos anti LPS no soro de animais imunizados com a vacina comercial ou com nossa preparação de LPS de leptosiras. Nossa estimativa é que quantidade semelhante de LPS de *L. interrogans* Copenhageni estaria presente nas duas formulações.

A figura 29 apresenta imagem de géis com LPS e com a proteína LigA corados com Comassie blue ou com prata e as imagens dos western blots.

Figura 29 - Reconhecimento de LigA e LPS por anticorpos dos soros de hamsters imunizados com a vacina comercial ou com preparações de LPS de leptospiros, por western blotting.



Amostra de LigA (1) e de LPS de *L. interrogans* Copenhageni 10A (2) foram separadas por ureia_SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose. Em A e B, imagens dos géis corados com Comassie blue ou prata respectivamente. Em C, D, E,F, G e H as membranas foram expostas a soros de animais C - controle (S2) (imunizados com Alhydrogel), D - imunizados com vacina comercial (S2), E - Imunizados com vacina comercial e infectados S3 e F - imunizados com LPS purificado de leptospiros S2. G - Imunizados com LigA + LPSle S2 , H - Imunizados com LigA + LPSle e infectados S3.

Nota-se que o LPS não foi corado pelo Comassie e foi bem corado pela prata. A coloração por Comassie indica a presença de proteínas em baixa concentração na preparação de LPS. Essas proteínas foram reconhecidas pelos soros de todos os animais, mesmo os que não foram imunizados (C).

As imagens de western blot com LPS não são nítidas e não permitem precisar intensidades de indução de anticorpos. Assim, não foi possível diferenciar quantidade de anticorpos anti-LPS nos soros S2 de animais imunizados com a vacina comercial (D) ou imunizados com LPS (F). Houve um aumento de intensidade das bandas quando usado o soro S3 dos animais imunizados com a vacina comercial (E), mas essa afirmação fica comprometida pelo perfil de bandas no western blot usando soro controle (C). Os soros dos animais imunizados com LigA e LPS (G e H) aparentemente aumentam a intensidade de ligação do anticorpo anti-LigA contra a proteína, quando comparado com a vacina comercial (D e E). Entretanto, os anticorpos anti-LPS parecem menos intensos do que no controle hidrato de alumínio (C) que não foi imunizado com LPS. O ensaio seguindo protocolo de Abeyrathne (ABEYRATHNE; LAM, 2007) precisa ser otimizado.

Também ensaiamos a dosagem de anti-LPS por ELISA que assim como no ensaio por western blot também apresentou interferências, com um reconhecimento espúrio do LPS na placa determinando altíssima intensidade de absorvância. As dosagens de anti-LPS permanecem por ser otimizadas.

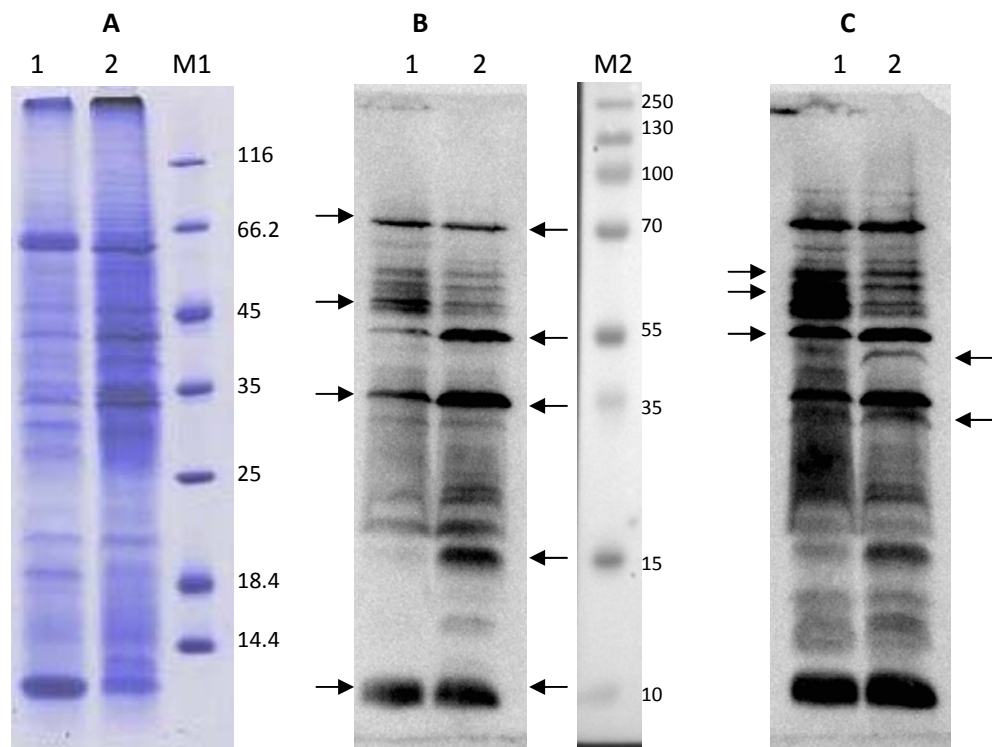
Novamente foi possível confirmar que a imunização com a vacina comercial não induz anticorpos anti-LigA (D), mas após a infecção houve indução desta proteína (E).

4.9 Reconhecimento dos anticorpos induzidos pela imunização com a vacina comercial por proteínas de extratos de leptospira

Uma vez que a imunização por vacina comercial confere proteção contra a leptospirose aos animais, e verificando que não houve indução de anticorpos anti-LigA, procuramos verificar quais proteínas da vacina estariam induzindo anticorpos, considerando a possibilidade de que esses seriam os antígenos mais imunogênicos e imunoprotetores. Também temos que considerar que os antígenos mais imunogênicos podem não ser os mais protetores. De qualquer maneira, este ensaio

de western blot foi realizado para conhecer o perfil da resposta imune humoral da vacina.

Figura 30 - Perfil de reconhecimento de proteínas do extrato de leptospira por anticorpos dos soros de animais imunizados com vacina comercial



Extratos proteicos de leptospiras *L. interrogans* Copenhageni 10A foram lisados por sonicação e separadas as proteínas solúveis no sobrenadante (1) e insolúveis no sedimento (2). Amostras das preparações proteicas foram aplicadas para SDS-PAGE e os géis corados com coomassie blue (A) ou transferidos para membranas de nitrocelulose para teste com soro de animais imunizados com vacina comercial S2 (B) ou soro de animais imunizados com vacina comercial e infectados S3.(C). Os soros foram usados em diluição 1:500.

Usando o soro dos animais imunizados com vacina comercial S2 (Figura 31.B) observamos o perfil de reconhecimento das proteínas da fração solúvel ou insolúvel do extrato. Quatro bandas do sobrenadante e cinco bandas de proteínas do sedimento foram mais fortemente detectadas, indicadas pelas setas (Figura 31 B). (bandas de aproximadamente 70, 60, 35 e 10 kDa no sobrenadante e 70, 55, 35, 15 e 10 kDa das proteínas insolúveis do extrato).

Usando o soro de terceira sangria todas as bandas determinadas pelo reconhecimento da segunda sangria foram intensificadas, além da detecção mais intensa de outras bandas provavelmente determinadas pela infecção.

5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível extrair LPS de leptospiras e preparar MPLA por hidrólise branda. Também extraímos LPS de salmonelas, porém não obtivemos MPLA por hidrólise branda, mas apenas lipídeo A. Por isso propusemos a estratégia de gerar clones de salmonela expressando a proteína LpxE, a qual faz a defosforilação do lipídeo A da bactéria em cultivo, para gerar um LPS monofosforilado (KONG et al., 2011) e facilitar a obtenção do MPLA de salmonelas. Esses clones também podem ser interessantes para diminuir a endotoxidade na utilização como vacinas vivas atenuadas. Entretanto, pelos testes efetuados por espectrometria de massa ainda não obtivemos sucesso na expressão de LpxE e defosforilação do LPS.

Com relação aos antígenos estudados OmpA e LigA podemos considerar: a proteína OmpA está relacionada à virulência da leptospira durante a infecção (NALLY et al., 2007) e é reconhecida por soro de pacientes com leptospirose (GAMBERINI et al., 2005). Entretanto, em nossos resultados a imunização com a proteína OmpA não protegeu os hamsters contra leptospirose. Por k-ELISA verificamos que este antígeno foi fracamente imunogênico. Ao contrário de LigA, que é estudado como um bom potencial vacinal (KOIZUMI; WATANABE, 2004), pois nitidamente induz imunoproteção em hamsters contra leptospiras virulentas aumentando a sobrevivência (SILVA et al., 2007). Entretanto, a proteção foi parcial e não esterilizante, ou seja, os animais estavam infectados com rins colonizados. Em desafios com maior número de bactérias, alguns animais imunizados com LigA apresentaram sintomas de leptospirose nos 21 dias de observação.

Estudamos o potencial dos agentes MPLA e LPS em adjuvar a resposta imunológica dos antígenos OmpA e LigA para verificar possível indução de imunoproteção esterilizante, entretanto isso não foi verificado com qualquer dos adjuvantes testados.

A imunoproteção de animais por vacinas comerciais é sorovar específica, indicando que depende do LPS presente na formulação. Assim, seria esperado que a imunização com LPS de *L. interrogans* sv Copenhageni protegesse os animais contra o desafio com leptospiras do mesmo sorovar. De fato, imunizações com

MPLA ou LPS de leptospira afetaram a resposta imune, conferindo proteção contra a bactéria virulenta, sendo que o grupo controle, animais que receberam apenas MPLA ou LPS sem o antígeno, apresentaram 30% de sobrevivência (segundo ensaio em animais). Entretanto, a proteção foi parcial e indica que outros fatores da vacina também são importantes.

Observamos que o uso de MPLA de salmonela nas imunizações resultou em aumento de anticorpos específicos contra os antígenos, quando comparado com imunizações com somente Alhydrogel como adjuvante, entretanto esta resposta não refletiu na proteção renal contra a infecção. A atividade adjuvante de MPLA de salmonelas foi confirmada em outros estudos, em formulações de vacinas contra hepatite B, tétano e influenza (BALDRIDGE et al., 2000).

Estudos de outros pesquisadores mostraram que imunização com doses entre 2,5 e 100 µg de LPS ou PS induziram alta proteção aos animais contra leptospirose (Jost, Adler e Faine, 1989) e também conferiram proteção cruzada, quando hamsters foram imunizados com LPS de *L. biflexa* sorovar Patoc e foram desafiados com *L. interrogans* sorovar Manilae (MATSUO; ISOGAI; ARAKI, 2000).

As dosagens de anticorpos nos soros dos animais imunizados com LigA com os adjuvantes MPLA de salmonela, de leptospira ou de bordetela ou LigA com LPS de leptospira mostraram grande variação na quantidade de anticorpos anti-LigA por animal dentro do mesmo grupo, em comparação com os soros dos animais imunizados com LigA com adjuvante hidrato de alumínio.

Apesar da variação biológica entre os animais, nossos resultados indicam que o MPLA e o LPS podem interferir positivamente ou negativamente na resposta imune. Um dos fatores que podem contribuir para esta dispersão na resposta são alterações na estrutura da molécula de MPLA, como número e comprimento das cadeias lipídicas, variações no número de insaturações ou presença de grupos fosfatos, interagindo de diferentes formas com os receptores Toll like e modulando as diversas respostas (AYBAY; IMIR, 1998).

Outro fator que pode influenciar a interação com os receptores e a resposta imunológica são as formas de apresentação das moléculas adjuvantes, como a formação de micelas ou lipossomos. As formulações preparadas no laboratório foram homogeneizadas vigorosamente no momento da aplicação no hamster,

entretanto alguns adjuvantes usados na produção de vacina comercial passam por uma etapa conhecida como microfluidização. Este processo é feito principalmente em emulsões de água e óleo submetidas a alta pressão, formando arranjos moleculares com tamanhos mais homogêneos. Essas partículas podem interagir de maneiras diferentes com os receptores e induzir diferentes respostas imunológicas (O'HAGAN et al., 2013).

Os animais que foram imunizados com a vacina comercial não apresentaram sintomas da doença, mesmo no desafio com maior número de bactérias virulentas. Além disso, os resultados dos cultivos dos macerados dos rins dos animais sobreviventes em meio Fletcher semi-sólido indicaram que a vacina comercial foi capaz de induzir proteção esterilizante, impedindo a colonização dos rins pela bactéria. O mesmo resultado foi obtido por Rinehart que imunizou novilhos com a vacina comercial pentavalente. Após o desafio, os animais sobreviveram e a análise histológica dos rins indicou que não houve colonização pela leptospira (RINEHART et al., 2012).

A vacina comercial é baseada em bacterina e a proteína LigA é apresentada na porção externa das leptospiras, mas interessante, os animais que receberam a vacina comercial não apresentaram anticorpos anti-LigA, como verificado por western blot e por k-ELISA. Nesse grupo experimental, os anticorpos anti-LigA foram induzidos apenas após o desafio com leptospira, mostrando que a proteção conferida pela vacina não foi mediada por LigA. Outra observação importante foi que neste grupo a indução de anticorpos anti-LigA foi muito menor que nos grupos onde a infecção se estabeleceu, mostrando que anti-LigA pode ser um marcador de infecção. Diferentemente, o antígeno OmpA é apresentado na vacina comercial, embora seja uma proteína pouco imunogênica.

O grupo de animais imunizados com o antígeno LigA apresentada pela salmonela viva atenuada e expressando a proteína in vivo sob controle do promotor nir indicou proteção contra a infecção por leptospira, com sobrevivência de 83%.

De forma semelhante, Lourdault e colaboradores realizaram imunização por via oral com vacina viva de *E. coli* expressando a proteína LigA. Nesse estudo, também foi observada alta proteção dos animais, mas estes pesquisadores também observaram colonização e alteração histológica dos rins (LOURDAULT et al., 2014).

A apresentação de antígenos por microrganismos vivos é investigada considerando à capacidade imunomoduladora devido à atuação como adjuvantes. Neste contexto, estamos avaliando as modificações no LPS recuperado de salmonelas SL3261 expressando a proteína LpxE para confirmar a obtenção do clone com mais baixa endotoxicidade.

Nossos ensaios confirmam que as moléculas de MPLA e LPS têm atividade sobre o sistema imune e que podem atuar como adjuvantes, porém isto requer mais estudos, em especial da maneira de formular os imunógenos, para maior compreensão e controle de parâmetros que podem interferir negativamente na resposta imune.

REFERÊNCIAS*

ABEYRATHNE, P. D.; LAM, J. S. Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. **Can. J. Microbiol.**, v. 53, n. 4, p. 526-532, Apr 2007.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, Jan 2010.

ATHANAZIO, D. A. et al. Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans. **Acta Trop.**, v. 105, n. 2, p. 176-180, Feb 2008.

AYBAY, C.; IMIR, T. Comparison of the effects of Salmonella minnesota Re595 lipopolysaccharide, lipid A and monophosphoryl lipid A on nitric oxide, TNF-alpha, and IL-6 induction from RAW 264.7 macrophages. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 22, n. 3, p. 263-273, Nov 1998.

BALDRIDGE, J. R. et al. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. **Vaccine**, v. 18, n. 22, p. 2416-2425, May 2000.

BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by Leptospira interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, Dec 2002.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v. 40, n. 12, p. 845-859, Feb 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 8, p. 911-917, Aug 1959.

BROWN, P. D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 110-114, Aug 1995.

BULACH, D. M. et al. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 2, n. 4, p. 375-380, Oct 2000.

CHAGAS-JUNIOR, A. D. et al. An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, n. Pt 12, p. 1632-1637, Dec 2009. ISSN 1473-5644.

CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. **Microdetermination of phosphorus** 1956.

CHEVILLE, N. F.; HUHN, R.; CUTLIP, R. C. Ultrastructure of renal lesions in pigs with acute leptospirosis caused by *Leptospira pomona*. **Vet. Pathol.**, v. 17, n. 3, p. 338-351, May 1980.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, May 2007.

COATS, S. R. et al. The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 1, p. 203-210, Jan 2011.

DE GREGORIO, E.; TRITTO, E.; RAPPUOLI, R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 8, p. 2068-2071, Aug 2008.

DIDIERLAURENT, A. M. et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. **J. Immunol.**, v. 183, n. 10, p. 6186-6197, Nov 2009.

EL HAMIDI, A. et al. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. **J. Lipid. Res.**, v. 46, n. 8, p. 1773-8, Aug 2005.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd. Melbourne, Vic. Australia: MediSci, 1999.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 1999. 272.

FINDLAY, H. E.; MCCLAFFERTY, H.; ASHLEY, R. H. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* Major Outer Membrane Protein. **BMC Microbiol.**, v. 5, p. 5, 2005.

FITZGERALD, K. A.; ROWE, D. C.; GOLENBOCK, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. **Microbes. Infect.**, v. 6, n. 15, p. 1361-1367, Dec 2004.

GALANOS, C. et al. Immunogenic properties of lipid A. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 4, p. 546-552, 1984 Jul-Aug 1984.

GALANOS, C. et al. Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. **Eur. J. Biochem.**, v. 140, n. 2, p. 221-227, Apr 1984.

GALANOS, C.; LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. **Eur. J. Biochem.**, v. 9, n. 2, p. 245-249, Jun 1969.

GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, n. 2, p. 305-13, Mar 2005.

GANOZA, C. A. et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. **PLoS Med.**, v. 3, n. 8, p. e308, Aug 2006.

GORIS, M. G. et al. Potent innate immune response to pathogenic leptospira in human whole blood. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18279, 2011.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 4, p. 494-501, Apr 2011.

HEINRICHS, D. E.; YETHON, J. A.; WHITFIELD, C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Mol. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 221-32, Oct 1998.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 31-32, p. 5787-99, Jul 2006.

INOUYE, S.; INOUYE, M. Up-promoter mutations in the *lpp* gene of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 13, n. 9, p. 3101-3110, May 1985.

JACKSON, R. J. et al. Oral vaccine models: multiple delivery systems employing tetanus toxoid. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 730, p. 217-234, Aug 1994.

JOST, B. H.; ADLER, B.; FAINE, S. Experimental immunisation of hamsters with lipopolysaccharide antigens of *Leptospira interrogans*. **J. Med. Microbiol.**, v. 29, n. 2, p. 115-120, Jun 1989.

KARIBIAN, D.; DEPRUN, C.; CAROFF, M. Comparison of lipids A of several Salmonella and Escherichia strains by ²⁵²Cf plasma desorption mass spectrometry. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 10, p. 2988-2993, May 1993.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, May 2011.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, Sep 1999.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, v. 22, n. 11-12, p. 1545-1552, Mar 2004.

KONG, Q. et al. Salmonella synthesizing 1-dephosphorylated [corrected] lipopolysaccharide exhibits low endotoxic activity while retaining its immunogenicity. **J. Immunol.**, v. 187, n. 1, p. 412-423, Jul 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970.

LEE, C. H.; TSAI, C. M. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. **Anal. Biochem.**, v. 267, n. 1, p. 161-168, Feb 1999.

LOURDAULT, K. et al. Oral immunization with Escherichia coli expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with Leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 2, p. 893-902, Feb 2014.

MANIATIS, T. **Molecular cloning - A laboratory manual**. Fritsch, E. F.: 438 p. 1982.

MATA-HARO, V. et al. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1628-1632, Jun 2007.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929-945, Aug 2003.

MATSUO, K.; ISOGAI, E.; ARAKI, Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, n. 11, p. 887-890, 2000.

MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 411-416, Jun 2010.

MCALREER, J. P.; VELLA, A. T. Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. **Trends Immunol.**, v. 31, n. 11, p. 429-435, Nov 2010.

MUROI, M.; OHNISHI, T.; Tanamoto, K. MD-2, a novel accessory molecule, is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 7, p. 3546-3550, Jul 2002.

NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 6022-6031, Nov 2005.

NALLY, J. E. et al. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 766-773, Feb 2007.

NASCIMENTO, A. L. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 4, p. 459-477, Apr 2004.

O'CALLAGHAN, D.; CHARBIT, A. High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 223, n. 1, p. 156-158, Aug 1990.

O'HAGAN, D. T.; DE GREGORIO, E. The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 11-12, p. 541-551, Jun 2009.

O'HAGAN, D. T. ET AL. The history of MF59(®) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. **Expert Rev. Vaccines**, v. 12, n. 1, p. 13-30, Jan 2013.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, Apr 2009.

QUE-GEWIRTH, N. L. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *Leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 24, p. 25420-25429, Jun 2004.

QUINTILIO, W. et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4219-4224, Jun 2009.

RAETZ, C. R. et al. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. **J. Lipid. Res.**, v. 50 Suppl, p. S103-108, Apr 2009.

RAETZ, C. R. et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 295-329, 2007.

RIAZI, M. et al. A low molecular weight lipopolysaccharide antigen preparation reactive to acute leptospirosis heterologous sera. **Trop. Biomed.**, v. 27, n. 2, p. 241-253, Aug 2010.

RINEHART, C. L. et al. Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira bacterin* against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 73, n. 5, p. 735-740, May 2012.

ROBINS, L. I.; WILLIAMS, A. H.; RAETZ, C. R. Structural basis for the sugar nucleotide and acyl-chain selectivity of *Leptospira interrogans* LpxA. **Biochemistry**, v. 48, n. 26, p. 6191-6201, Jul 2009.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, I. et al. [Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents]. **Med. Mal. Infect.**, v. 34, n. 5, p. 196-200, May 2004.

ROMERO, C. D. et al. The Toll-like receptor 4 agonist monophosphoryl lipid a augments innate host resistance to systemic bacterial infection. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 9, p. 3576-3587, Sep 2011.

ROUSER, G.; FKEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, v. 5, n. 5, p. 494-496, May 1970.

SILVA, E. F. et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 25, n. 33, p. 6277-6286, Aug 2007.

SLACK, A. Leptospirosis. **Aust. Fam. Physician**, v. 39, n. 7, p. 495-498, Jul 2010.

SOLLY, F. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd. Melbourne, Vic. Australia: MediSci, 1999.

STALHEIM, O. H. Biological effects of leptospiral lipids. **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 2, p. 465-468, Feb 1968.

TAGLIABUE, A.; RAPPUOLI, R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. **Hum. Vaccin.**, v. 4, n. 5, p. 347-349, 2008 Sep-Oct 2008.

TENG, C. H. et al. Effects of ompA deletion on expression of type 1 fimbriae in Escherichia coli K1 strain RS218 and on the association of E. coli with human brain microvascular endothelial cells. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 10, p. 5609-5616, Oct 2006.

TORRES, A. G. et al. Outer membrane protein A of Escherichia coli O157:H7 stimulates dendritic cell activation. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2676-2685, May 2006.

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 5, p. 1457-1463, Nov 1998.

TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 119, n. 1, p. 115-119, Jan 1982.

TSANG, V. C.; WILSON, B. C.; PERALTA, J. M. Quantitative, single-tube, kinetic-dependent enzyme-linked immunosorbent assay (k-ELISA). **Methods Enzymol.**, v. 92, p. 391-403, 1983.

VIHN, T.; ADLER, B. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni.. **J. Gen. Microbiol.**, p.103-109, 1985.

VINH, T. U. et al. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, n. 10, p. 2663-2673, Oct 1989.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb. Cell Fact.**, v. 6, p. 39, 2007.

WERTS, C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. **Chang Gung Med. J.**, v. 33, n. 6, p. 591-601, 2010 Nov-Dec 2010.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 346-352, Apr 2001.

WILKINSON, S. G. Bacterial lipopolysaccharides--themes and variations. **Prog. Lipid Res.**, v. 35, n. 3, p. 283-343, Sep 1996.

WU, C. J.; CHEN, L. C.; KUO, M. L. Attenuated *Salmonella typhimurium* reduces ovalbumin-induced airway inflammation and T-helper type 2 responses in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, n. 1, p. 116-122, Jul 2006.

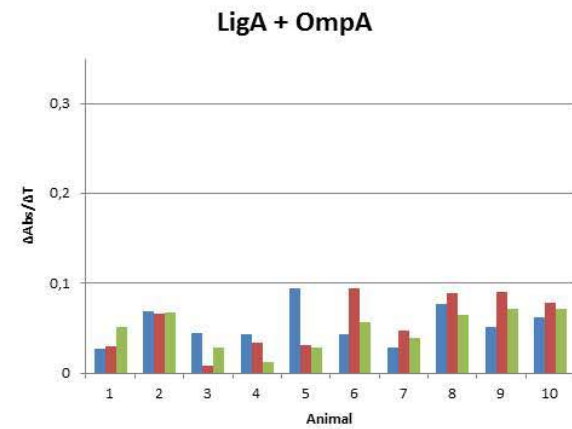
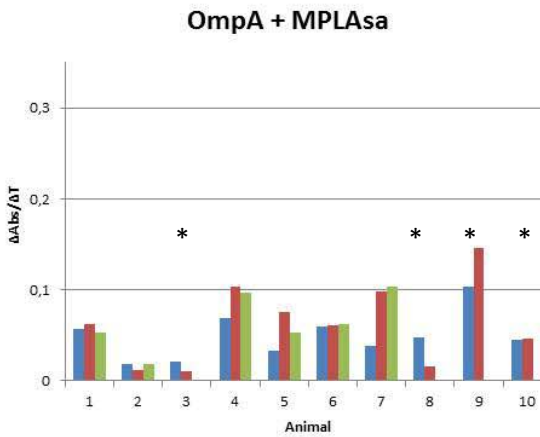
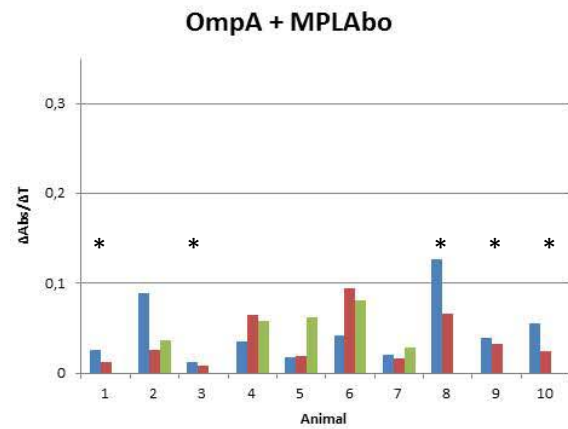
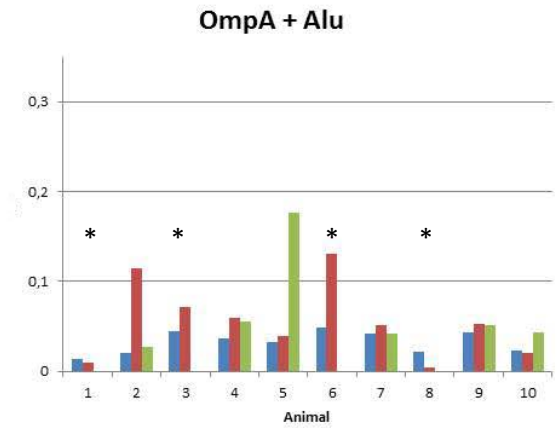
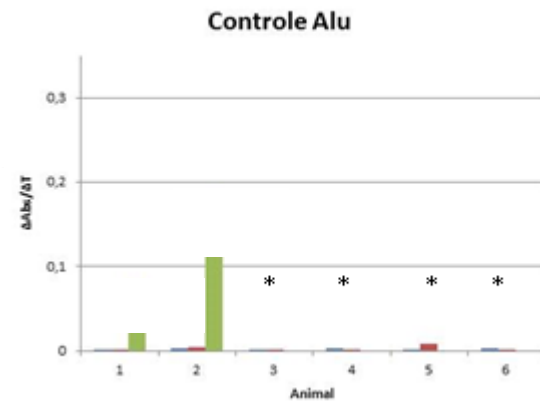
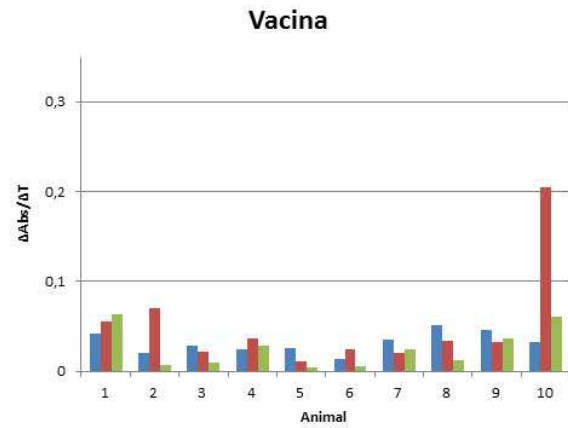
WU, L. H.; TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A method for purification of bacterial R-type lipopolysaccharides (lipooligosaccharides). **Anal. Biochem.**, v. 160, n. 2, p. 281-289, Feb 1987.

YI, E. C.; HACKETT, M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. **Analyst**, v. 125, n. 4, p. 651-656, Apr 2000.

ZUERNER, R. L.; ALT, D.; BOLIN, C. A. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans sensu lato* serovars. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3284-3289, Dec 1995.

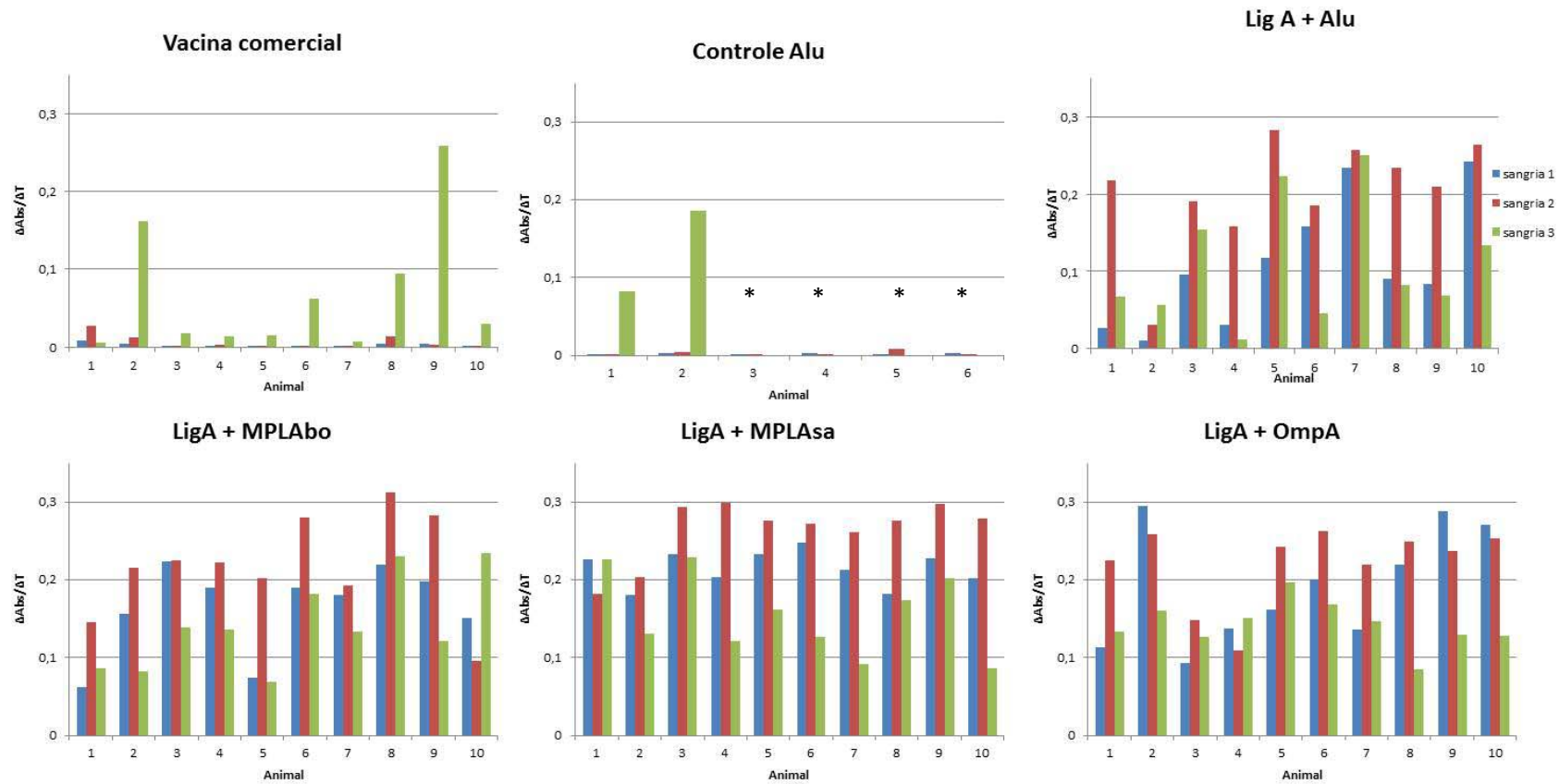
ANEXOS

Anexo A -- Dosagem de anticorpos anti-OmpA nos soros de cada animal por grupo de imunização, sangrias 1, 2 e 3, no primeiro ensaio em hamsters.



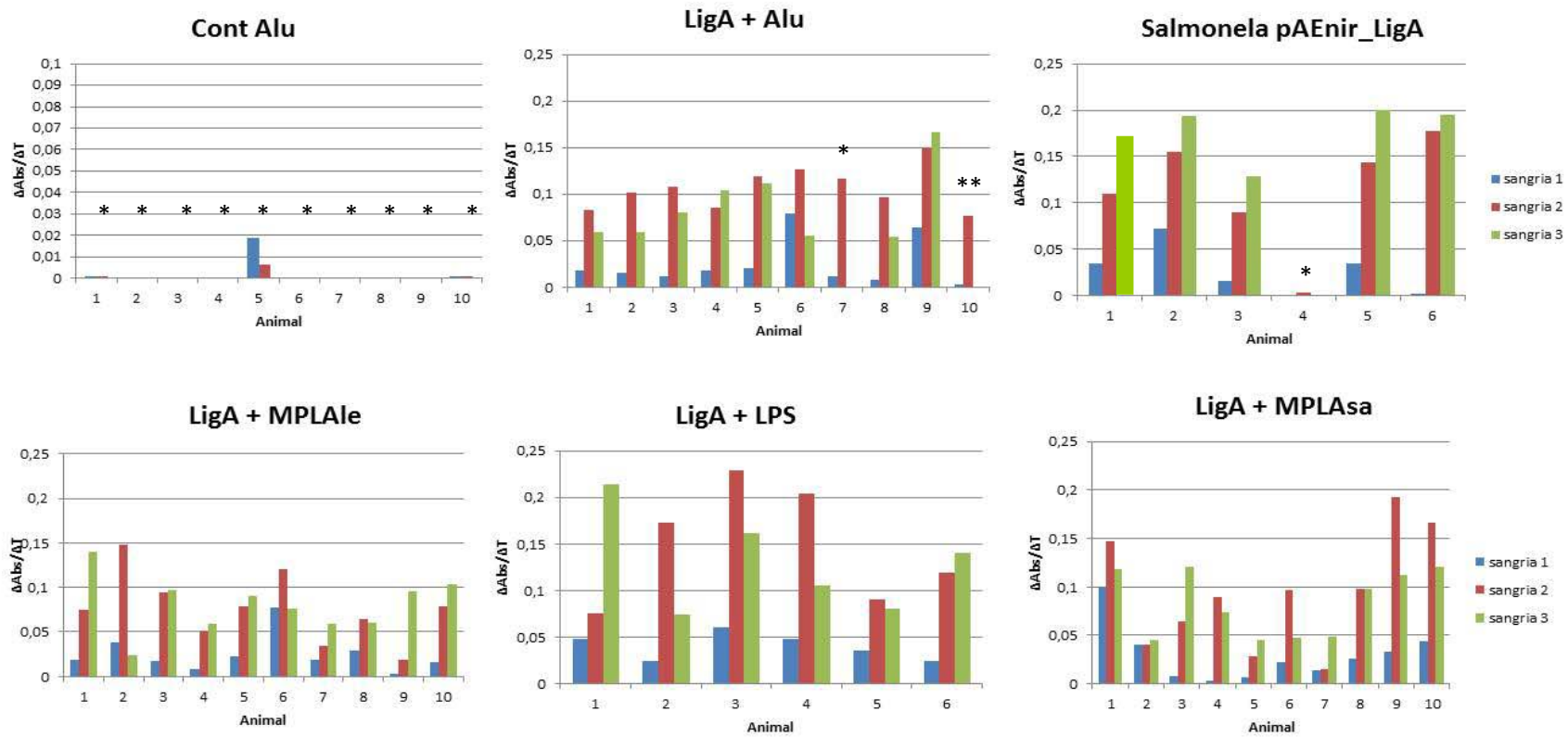
*animais que morreram após o desafio

Anexo B – Dosagem de anticorpos anti-LigA nos soros de cada animal por grupo de imunização, sangrias 1, 2 e 3, no primeiro ensaio em hamsters.



*animais que morreram após o desafio

Anexo C – Dosagem de anticorpos anti-LigA nos soros de cada animal por grupo de imunização, sangrias 1, 2 e 3, no segundo ensaio em hamsters.



*animais que morreram após o desafio.

**animais que morreram de causas naturais, anterior ao desafio.