

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO GAVINHO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNÓGENO BACTERIANO DE *PSEUDOMONAS*
AERUGINOSA CONJUGADO AO TOXÓIDE TETÂNICO

CURITIBA

2011

BRUNO GAVINHO

DESENVOLVIMENTO DE IMUNÓGENO BACTERIANO DE *Pseudomonas aeruginosa* CONJUGADO
AO TOXÓIDE TETÂNICO.

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia da Universidade
Federal do Paraná.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucy Ono.

CURITIBA
2011

“A Ciência se compõe de erros, que por sua vez
são os passos até a verdade.”

Júlio Verne

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amor incondicional, e por me permitir aprender.

A meu Pai Maria Sergio Gavinho, cujo sonho é que o sonho de seus filhos se concretize. Muito obrigado pelo amor e apoio.

A Ana Carolina, muito mais do que uma noiva, uma companheira na faculdade e no trabalho, pelo apoio incondicional, e por sempre apoiar meus sonhos. Obrigado por todos os momentos de alegria e companhia.

A minha orientadora Lucy Ono, que prezo pela amizade e por ter aceitado me orientar e ensinar muito do que sabe, na graduação e no mestrado. Seus valores sempre estarão comigo.

Ao meu co-orientador Luis Felipe Caron, pela amizade e por todos os conselhos, inúmeros, sobre a vida profissional. Obrigado pelo interesse e carinho.

A Rosangela Rodrigues, companheira de pesquisa, cuja ajuda e conhecimentos permitiram o progresso e a realização do trabalho.

Aos amigos do mestrado, em especial Breno e Fagner, pela amizade e companhia.

Aos estagiários e funcionários do laboratório de Biopolímeros, sempre dispostos em ensinar e trabalhar, que me auxiliaram em determinados momentos do meu mestrado.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa responsável por diversas doenças e manifestações clínicas. Sua virulência permite a infecção e colonização de indivíduos pertencentes a grupos de risco, como imunocomprometidos, queimados e portadores de fibrose cística. O presente estudo visa o desenvolvimento de uma vacina à base de Lipopolissacarídeo (LPS), antígeno consagrado em diversos protocolos de imunização. Este antígeno foi conjugado a proteína, constituindo uma vacina conjugada. Vacinas conjugadas são imunógenos não-protéicos que, ao serem ligados a uma proteína, adquirem uma nova propriedade: geração de memória imunológica. A proteína utilizada no estudo é o toxóide tetânico (toxina inativada do *Clostridium tetani*, TT). Ainda, capacita neonatos e crianças a interagirem com um antígeno contra o qual não responderiam normalmente. A técnica de conjugação utilizada foi a aaminação redutiva direta, avaliada como simples e de baixo custo. Através da adaptação do protocolo de Shen e colaboradores, foi possível conjugar o Lipopolissacarídeo ao toxóide tetânico (LPS-TT). Avaliou-se a resposta in vivo através de aplicações intraperitoneais do imunógenos em camundongos Swiss, através de dois protocolos: o primeiro avalia a formação de anticorpos anti-pseudomonas pela imunização com LPS, LPS e TT ou LPS-TT. O segundo avalia a formação de anticorpos utilizando LPS, LPS e TT, ou LPS-TT após aplicação intraperitoneal de bacterina (célula inativada de *P. aeruginosa*). Os grupos que foram imunizados com LPS e TT e LPS-TT (20 e 40 µg/ml) apresentaram resposta de anticorpos aglutinantes superior ao controle LPS.

Palavras-Chave: vacina conjugada, *Pseudomonas aeruginosa*, lipopolissacarídeo, toxóide tetânico

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a gram-negative bacteria, an agent responsible for many diseases and clinical manifestations. Its virulence makes possible infection and colonization of risk-groups, like immunocompromised, burned and patients with cystic fibrosis. The project's objective is to develop a Lipopolysaccharide(LPS) based vaccine, this antigen is wide known and utilized on other immunity protocols. The LPS will be conjugated with a protein, constituting an conjugated vaccine. Those vaccines are non-protein antigens that are bind to a protein, and because of this acquires a new property: immunologic memory generation. The protein utilized on the study was the tetanus toxoid (inactivated toxin from *Clostridium tetani*). Still, the conjugated vaccines permits neonates and children to interact to antigens that could not respond before. The conjugation technique utilized to make the immunogen was the direct reductive amination, know to be simple and low-costing. Through the adaption of SHEN et al protocol (2001), it was possible to conjugate the LPS with the tetanus toxoid(LPS-TT). To evaluate the in vivo response, intraperitoneal applications of the immunogen were made on swiss mice, through two protocols: the first study the anti-pseudomonas antibody elicited from LPS, LPS and TT or LPS-TT. The second evaluate the antibody formation utilizing LPS, LPS and TT or LPS-TT after an intraperitoneal application of bacterin (inactivated cell of *P. aeruginosa*). The groups immunized with LPS and TT, and LPS-TT produced a significantly higher antibody tittle than the LPS control.

Key-words: conjugated vaccine, *Pseudomonas aeruginosa*, lipopolysaccharide, tetanus toxoid

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 a) Estrutura química do Lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa*; b) Componentes do complexo TLR4-MD2-CD14. Diferentes regiões do TLR4 são mostradas: repetições ricas em leucina (LLR), região hipervariável (HYP), e o domínio intracelular (TIR) (Adaptado de: MILLER *et al.*, 2005).....7
- FIGURA 2 Formação de biofilme de *P. aeruginosa*, após desafio com Tobramicina, um aminoglicosídeo. (Adaptado de: O'TOOLE & STEWART, 2005).....11
- FIGURA 3 Processamento de conjugado polissacarídeo-proteína por célula dendrocítica (DC) e linfócito B, e interações destes com um linfócito T, após exposição do antígeno em MHC II.....13
- FIGURA 4 1 Cultivo de *P. aeruginosa* em ágar Cetrimida.Fonte: o autor15
- FIGURA 5 Provas bioquímicas identificando metabólitos formados por *P. aeruginosa*, como a formação de esculina. Fonte: o autor.....15
- FIGURA 6 Extração de LPS, e fases do produto final. A. Fração aquosa. B. Residual. C. Fenólica. Fonte: SANTOS et al (2009).....17
- FIGURA 7 Dosagens de açúcar, método de DUBOIS (1956). Fonte: o autor18
- FIGURA 8 Dosagens de proteínas, método de BRADFORD (1976). Fonte: o autor18
- FIGURA 9 Passagem de Blue Dextran para determinação de volume morto da coluna de gel-permeação. Fonte: o autor18
- FIGURA 10. Protocolo de vacinação em modelo animal.....20
- FIGURA 11 Rendimento de *P. aeruginosa* em diferentes meios de cultura.....22
- FIGURA 12 Concentrações de açúcar e proteínas totais dos imunógenos.....24

FIGURA 13 Titulação dos soros dos animais vacinados com imunógenos obtidos de *Pseudomonas Aeruginosa*. Cada grupo apresenta a maior e a menor titulação obtida, além da média.....25

FIGURA 14 Perfil de eluição da dextrana padrão 266 kDa e 150 kDa, após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose Cl-4B, h: 84 cm, Ø = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).....26

FIGURA 15 Perfil de eluição do Toxóide Tetânico após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose Cl-4B, h: 84 cm, Ø = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).....26

FIGURA 16 Perfil de eluição do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose Cl-4B, h: 84 cm, Ø = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).....27

FIGURA 17 Perfil de eluição do LPS-TT após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose Cl-4B, h: 84 cm, Ø = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).....28

FIGURA 18 Determinação dos títulos de souroneutralização de soros das amostras G2 (Controle LPS 20 µg/dose), G4 (Controle LPS 20 µg/dose + 29,4 µg/dose de TT) e G6 (Conjugado LPS-TT 20 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após a imunização.* = estatisticamente superior.....30

FIGURA 19 Determinação dos títulos de souroneutralização de soros das amostras G3 (Controle LPS 40 µg/dose), G5 (Controle LPS 40 µg/dose + 58,8 µg/dose de TT) e G7 (Conjugado LPS-TT 40 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após a imunização. * = estatisticamente superior.....30

FIGURA 20 Determinação dos títulos de souroneutralização de soros das amostras G8 (Controle Bacterina, seguida de LPS 20 µg/dose), G10 (Controle Bacterina, seguida de LPS 20 µg/dose + 29,4 µg/dose de TT) e G12 (Bacterina, seguida de Conjugado LPS-TT 20 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após a imunização. * = estatisticamente superior.....31

FIGURA 21 Determinação dos títulos de souroneutralização de soros das amostras G9 (Controle Bacterina, seguida de LPS 40 µg/dose), G11 (Controle Bacterina, seguida de LPS 40µg/dose + 58,8 µg/dose de TT) e G13 (Bacterina, seguida de Conjugado LPS-TT 40 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após a imunização. * = estatisticamente superior.....31

LISTA DE ABREVIATURAS

- AL(OH)₃** hidróxido de alumínio
- apud** Citado por
- AT** açúcar total
- ATCC** American Type Culture Collection
- BSA** soro albumina bovina
- CEEA** Comitê de Ética em Experimentação Animal
- g** grama
- Hib** *Haemophilus influenzae* tipo b
- HYP** região hipervariável
- LBP** LPS- binding protein
- LPS** lipopolissacarídeo
- LLP** regiões ricas em leucina
- mg** miligrama
- MHC** complexo principal de histocompatibilidade
- mL** mililitro
- mM** milimolar
- NaBH₄** borohidreto de sódio
- NaCl** cloreto de sódio
- NaCnBH₄** cianoborohidreto de sódio
- NaIO₄** meta- periodato de sódio
- nm** nanômetro
- P. aeruginosa*** *Pseudomonas aeruginosa*
- pH** potencial hidrogeniônico
- PT** proteína total
- rpm** rotações por minuto
- TLR4** toll-like receptor 4
- TT** toxóide tetânico
- UFC** unidades formadoras de colônia
- µg** micrograma
- µm** micrometro
- µl** microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 GERAIS	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
3 REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1 CARACTERIZAÇÃO.....	5
3.2 ESTRUTURA ANTIGÊNICA	6
3.3 PATOGÊNESE.....	8
3.4 VACINAS PARA <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	11
3.5 VACINAS CONJUGADAS	13
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	15
4.2 AVALIAÇÃO DE MASSA BACTERIANA E RENDIMENTO DE CULTURAS	15
4.3 INATIVAÇÃO QUÍMICA	15
4.4 EXTRAÇÃO DO LIPOPOLISSACARÍDEO.....	16
4.5 ANÁLISE DO LIPOPOLISSACARÍDEO	16
4.6 CROMATOGRAFIA DE GEL-PERMEAÇÃO DOS ANTÍGENOS	17
4.7 CONJUGAÇÃO DO LPS DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> COM TOXÓIDE TETÂNICO E ANÁLISE DO IMUNOCONJUGADO.....	18
4.8 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE IN VIVO POR MEIO DA IMUNIZAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS.....	19
4.9 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS	19
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	21
5 RESULTADOS	22
5.1 PRODUÇÃO E INATIVAÇÃO DE <i>P. AERUGINOSA</i>	22
5.2 EXTRAÇÃO DE LPS DE <i>P. AERUGINOSA</i>	23
5.3 REAÇÃO DE CONJUGAÇÃO DO LPS DE <i>P. AERUGINOSA</i> AO TOXÓIDE TETÂNICO	23
5.4 ANÁLISE DE AÇÚCARES E PROTEÍNA TOTAIS.....	24
5.5 CROMATOGRAFIA DE GEL-PERMEAÇÃO DE LPS, TT E LPS-TT	25

5.6 TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	
.....	27
6 CONCLUSÃO	33
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa ubíqua, encontrada em águas frescas e no solo (LANG *et al.*, 2004; CRIPSS *et al.*, 2006; DÖRING & PIER, 2008). A epidemiologia reflete sua predileção por um meio ambiente úmido, crescendo facilmente em plantas e animais (BRITO *et al.*, 2000; PALLERONE, 2009). Está apta a colonizar uma diversidade de nichos, como plantas, solo e ambientes aquáticos. Embora não seja considerada pertencente à microbiota humana, colonizações fecal, orofaríngea e da pele não são raras (KERR & SNELLING, 2009). É um clássico patógeno oportunista, que normalmente não representa ameaça ao indivíduo imunocompetente, sendo eliminando através de opsonização e fagocitose.

Existe risco, porém, para grupos específicos de indivíduos, como os portadores de fibrose cística, nos quais a presença de um gene mutado no cromossomo 7 (gene CFTR – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator,) que codifica uma proteína transmembrana ligada a canais de cloro alterada, prejudicando o transporte de sais e água das células da via respiratória (BOBADILLA *et al.*, 2002). Isto resulta no acúmulo de muco espesso, impedindo a eliminação de bactérias dos pulmões (DÖRING, 2003). Episódios recorrentes de infecção e inflamação levam à destruição do tecido pulmonar (JOHANSEN & GOTZSCHE, 2009). A fibrose cística é uma doença hereditária (JOHANSEN *et al.*, 1994).

Cepas de *P. aeruginosa* são as principais fontes de infecções nosocomiais (DRISCOLL *et al.*, 2007), juntamente com os estafilococos coagulase-negativos, como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus spp* (LANG *et al.*, 2004). Contaminações ocorrem a partir de fontes comuns como respiradores, umidificadores, reservatórios de água e alimentos, assim como transmissões por contato direto nas Unidades de Tratamento Intensivo (MARTINS *et al.*, 2004; KERR & SNELLING, 2009). Pacientes imunocomprometidos, como transplantados, estão constantemente sujeitos à infecção (BAUMANN *et al.*, 2003). Pacientes com queimaduras são um grupo altamente susceptível à infecção por *P. aeruginosa*. A bactéria é um dos patógenos mais isolados destes indivíduos, não somente pelo comprometimento da barreira mecânica, como também pela imunossupressão (LEE *et al.*, 2000). Na saúde animal, os problemas com multirrestência também ocorrem, principalmente em casos de otite externa, cistite

canina, úveo-conjuntivite, endometrite em eqüinos e mastite em ruminantes (QUIN *et al.*, 2005).

P. aeruginosa possui resistência intrínseca a diversas classes de antibióticos, limitando opções terapêuticas. Resistência a uma mesma classe de antibióticos pode ser mediada por vários mecanismos (KERR & SNELLING, 2009). Embora antibióticos estejam disponíveis, a capacidade da bactéria em desenvolver multirresistência a compostos químicos compromete o tratamento de pacientes, principalmente dos que apresentam fibrose cística (CACHIA *et al.*, 2003). Independentemente do tratamento com antibióticos adequados, a mortalidade continua superior a 40% dos casos de infecção aguda. Casos de multirresistência a drogas são cada vez mais relatados (ENGELS & BALACHANDRAN, 2009), indicando a importância do desenvolvimento de vacinas eficazes (GOTO *et al.*, 2010).

Vários métodos foram estudados para prevenção de infecções por *P. aeruginosa*, incluindo imunização passiva, com anticorpos policlonais e monoclonais, e imunização ativa, através de vacinas. Reconhecida como uma excelente alternativa à antibioticoterapia, pesquisas envolvendo vacinas são desenvolvidas para prevenção das infecções. Vacinas para *P. aeruginosa* são estudadas há mais de 30 anos, embora o progresso seja lento. Alguns modelos consistem em vacinações de dose mínima, com lipopolissacarídeos purificados (CRYZ *et al.*, 1984). No entanto, a especificidade dos sorotipos dificulta o desenvolvimento de uma vacina baseada nesta estrutura, e problemas em potencial através do uso de lipopolissacarídeo em concentrações inadequadas podem resultar em reações adversas (HOLDER, 2004).

De acordo com DÖRING (2010), diversas razões justificam a falta de progresso no desenvolvimento de uma vacina adequada para a espécie: 1) dificuldade em testar um produto em pacientes que utilizam um pesado protocolo de antibioticoterapia, 2) mecanismos defectivos e incapazes na imunidade de portadores de fibrose cística e 3) pequena população de portadores de fibrose cística, tornando estudos de difícil realização.

A maioria das vacinas recentes é composta por toxinas de fatores de virulência conhecidos de *Pseudomonas*, por exemplo: proteases, elastases e exotoxina-A (DÖRING & PIER, 2008). Estudos já foram feitos em camundongos íntegros, (GOLDBERG & PIER, 1996), e mais recentemente, mostrando-se efetivas em modelos animais com infecções crônicas pulmonares. Um estudo clínico revelou resultados

promissores, com altos títulos de anticorpos associados a uma baixa incidência de infecção em pacientes com fibrose cística (HOLDER, 2004).

Algumas pesquisas, por exemplo, consideram a criação de vacinas conjugadas, incorporadas de proteínas e carboidratos, ou até mesmo vacinas recombinantes (HEURTAULT *et al.*, 2008; STACZEK *et al.*, 2000; SAHA *et al.*, 2006). As vacinas conjugadas são desenvolvidas complexando um antígeno a uma proteína carreadora, capaz de estimular a resposta de linfócitos T e memória.

Baseando-se nas pesquisas com vacinas conjugadas, este trabalho testa uma técnica de conjugação envolvendo o LPS de *Pseudomonas aeruginosa* com toxóide tetânico. O toxóide tetânico, composto derivado da neurotoxina quimicamente inativada de *Clostridium tetani*, comporta-se como proteína carreadora, sem comprometer a resposta imune ou causar efeitos adversos (PLOTKIN & ORENSTEIN, 2004). O hidróxido de alumínio é um imunopotenciador muito utilizado para produção de vacinas, sendo responsável pela liberação lenta do antígeno, tornando mais eficiente a captação do antígeno por células apresentadoras; inflamação no local de aplicação, atraindo células apresentadoras de antígenos; conversão de um antígeno solúvel em particulado, auxiliando a captação deste pelas células fagocíticas (VOGEL & HEM, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. GERAIS

Desenvolver um imunógeno contra *Pseudomonas aeruginosa* , utilizando seu lipopolissacarídeo. Este imunógeno será conjugado ao toxóide tetânico. Avaliar sua ação de produção de anticorpos específicos *in vivo*.

2.2. ESPECÍFICOS

- Conjugar o lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa* ao toxóide tetânico, por aaminação redutiva direta.
- Analisar e confirmar a formação do imunocombinado utilizando técnicas de dosagem de açúcar e de proteína, associadas à cromatografia de gel-permeação;
- Avaliar a resposta *in vivo* por meio da imunização experimental em camundongos, com determinação do título de anticorpos aglutinantes induzidos nos soros dos camundongos vacinados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CARACTERIZAÇÃO

Descrita pela primeira vez por Schroeter em 1872, *Pseudomonas aeruginosa* pertence à Ordem *Pseudomonadales*, Família *Pseudomonadaceae*, e ao Gênero *Pseudomonas*. É uma espécie quimioorganotrófica, com metabolismo aeróbico estrito (não-fermentador de açúcares), em que o oxigênio é o aceptor terminal da cadeia de elétrons. No entanto, está perfeitamente apta a crescer e sobreviver em condições anaeróbicas (SCHOBERT & JAHN, 2010). São catalase positivos, oxidase positivos ou negativos. Sua morfologia compreende um bastonete simples ou curvo Gram negativo, mas não helicoidal (1,5 – 5,0 µm de comprimento). A maioria são móveis, através de único flagelo polar (GARRITY *et al.*, 2009). Apresenta fímbrias polares (6 nm), menores que as de bactérias entéricas. A espécie possui a fímbria de tipo 4, identificada em espécies patogênicas, capaz de adesão em células epiteliais. A maior parte dos sorotipos não cresce em meios ácidos (pH inferior a 4,5). Dois tipos de colônias podem ser observados em meios sólidos. O primeiro tipo é grande, cremoso, com bordas estreitas e centro elevado (aparência de “ovo frito”). O segundo tipo é pequeno, seco e convexo (PALLERONI, 2009). Nas colônias grandes, colorações prata-acinzentadas podem ser observadas, e estas são mais comumente obtidas de amostras clínicas, enquanto colônias pequenas são mais isoladas de fontes ambientais (PALLERONI apud VERÓN & BERCHE, 1976). Um terceiro tipo de colônia (mucóide) é freqüentemente isolado de secreções respiratórias e urinárias, como observado por Sonnenshein em 1927 (PALLERONI, 2009). Os morfotipos mucóides podem ser divididas entre produtores de muco (alginato) em meios quimicamente definidos, e não-produtores. A temperatura ótima de crescimento de 37°C, permitindo a *P. aeruginosa* ser a bactéria mais difundida no ambiente. Está adaptada a crescer a 41°C, mas não a 4°C. Pertencente ao grupo de pseudomonáceas fluorescentes, a espécie é capaz de produzir pioverdina e piocianina, pigmentos que inibem a proliferação da epiderme, de linfócitos e de outras bactérias. A pioverdina também se comporta como um sideróforo. A espécie também é capaz de produzir melanina (PALLERONI, 2009).

3.2. ESTRUTURA ANTIGÊNICA

A aglutinação de *P. aeruginosa* pode ser demonstrada por anticorpos produzidos em animais para componentes específicos do lipopolissacarídeo (LPS), estrutura característica de bactérias Gram negativas. O LPS é uma molécula complexa que consiste em três regiões: uma região polissacarídica O-específica (Antígeno O), uma região polissacarídica conservada (*core*) e um componente lipídico chamado Lipídeo A (Fig. 1). Esta região do Lipídeo A contém duas moléculas de glicosamina, cada uma com três ácidos graxos complexados a um fosfato ou pirofosfato e está fixa na membrana externa. A região conservada (*core*) está ligada ao Lipídeo A, sendo responsável pela sustentação do Polissacarídeo O (PRESCOTT *et al.*, 2005). Uma família de proteínas transmembrana de mamíferos, chamada de receptores semelhantes a Toll (TLR), reconhece estruturas conservadas de bactérias, fungos e vírus. Dentre elas, a TLR4 junto com os co-receptores MD2 e CD14, é responsável pelo reconhecimento do LPS (Fig. 1). O Complexo TLR4-MD2-CD14 está presente em vários tipos de células, como macrófagos e células dendríticas. O reconhecimento do lipídeo A também requer uma proteína acessória, a LPS-binding protein (LBP), responsável pela conversão de micelas oligoméricas de LPS em monômeros, para complexá-los ao CD14 (MILLER *et al.*, 2005). O TLR4 de humanos e camundongos exibe discriminação diferencial para o Lipídeo A de *P. aeruginosa*. O receptor transmembrana de humanos responde ao Lipídeo A de isolados clínicos de pacientes com fibrose cística, constituídos por estrutura hexa-acetilada. Porém, não responde a isolados clínicos e ambientais de estrutura penta-acetiladas. No entanto, o TLR4 de camundongos apresenta resposta robusta para os dois tipos de estrutura.

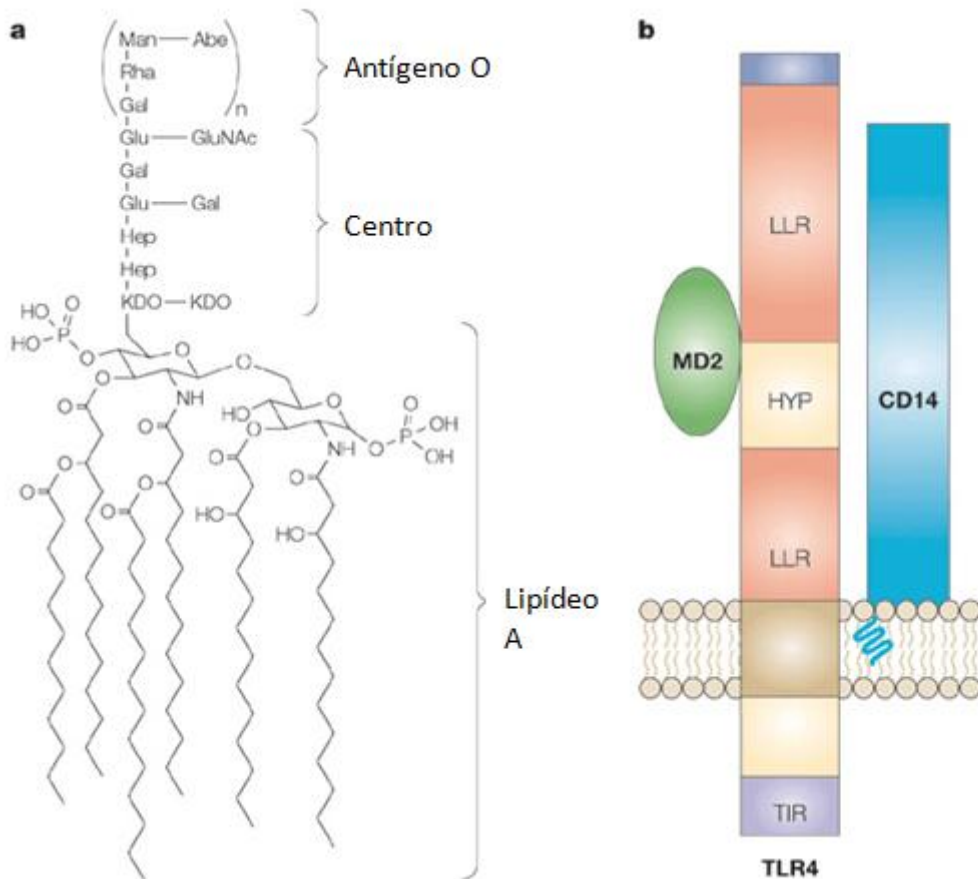


Figura 1 - a) Estrutura química do Lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa*; b) Componentes do complexo TLR4-MD2-CD14. Diferentes regiões do TRL4 são mostradas: repetições ricas em leucina (LLR), região hipervariável (HYP), e o domínio intracelular (TIR) (Adaptado de: MILLER *et al.*, 2005).

O Antígeno O é considerado o marcador mais estável para *P. aeruginosa* (PALLERONI, 2009). A especificidade do Polissacarídeo O está relacionada à composição das cadeias de polissacarídeos projetadas para o exterior da célula. Existem pelo menos 17 tipos de Antígeno O, todos termoestáveis. O LPS possui cadeias específicas de açúcares e oligossacarídeos isolados, incluindo amino-açúcares não-acetilados (AL-ZEER & MASOUD apud WILKINSON, 1983)). O LPS é o maior antígeno de superfície da bactéria, e estimula produção de anticorpos nos animais (AL-ZEER & MASOUD, 2007; KIM *et al.*, 2001).

P. aeruginosa é capaz de expressar simultaneamente dois tipos de lipopolissacarídeos, que determinam diferentes bandas eletroforéticas, chamadas de banda A e B. Enquanto a banda B corresponde ao componente que confere à célula o tipo específico de Antígeno O, a banda A representa a parte antigênica comum. Destes dois tipos de LPS, um confere à célula maior hidrofobicidade, e o outro hidrofobicidade. Por sua vez, a quantidade destes antígenos presentes na célula influencia na adesão e

sobrevivência da bactéria (MAKIN & BEVERIDGE, 1996). A caracterização sorológica de *P. aeruginosa* baseada no Antígeno O parece ser mais específica do que por outros métodos (PALLERONI, 2009).

P. aeruginosa possui vários fatores de virulência além do lipopolissacarídeo, como fímbrias, adesinas, flagelos (DÖRING *et al.*, 2007; DÖRING & PIER, 2008), exotoxinas A que inibem a síntese de proteínas, elastases, exoenzimas S e V que inibem a fagocitose (WOLF & ELSÄSSER-BEILE, 2009), exo U, uma citocina responsável por necrose celular (ENGEL & BALACHANDRAN, 2009), exo Y e exo T, fosfolipases C, que hidrolisam lipídeos de membrana, ramnolipídeos que solubilizam lipídeos e inibem a função ciliar do epitélio respiratório superior, pigmentos como a piocianina e pioverdina, e alginato. A neutralização de qualquer fator de virulência supracitado pode não ter sucesso em prevenir, eliminar ou diminuir morbidade ou mortalidade em infecções por *P. aeruginosa* em todas as formas que ela se apresenta nos pacientes (HOLDER, 2004). Ainda, existem evidências de que a bactéria apresenta variabilidade fenotípica ao ser submetida a diferentes ambientes, como pulmões de pacientes com fibrose cística (DÖRING *et al.*, 2003, DÖRING & PIER, 2008).

A proteína de membrana externa OpF já foi submetida a mapeamento de epítomos, provando ser uma boa candidata para uma vacina, e também como alvo de anticorpos monoclonais de aplicação terapêutica (PALLERONI *apud* RAWLING *et al.*, 1995). Também já foi identificado um epítomo da lipoproteína H2 da membrana externa em 17 sorotipos de *P. aeruginosa*, e, tanto OpF como H2 demonstraram potente indução de anticorpos, além de representarem estruturas conservadas de *P. aeruginosa* (YOKOTA, 1995). O exopolissacarídeo mucóide da espécie (alginato) também demonstrou imunogenicidade para desenvolvimento de vacina.

Além da aglutinação, a tipificação da bactéria também foi realizada por RAPL (*Random Amplification of Polimorphic DNA*), e eletroforese de gel em campo pulsado (PALLERONI, 2009).

3.3. PATOGÊNESE

Um impressionante arsenal de fatores de virulência pode ser empregado por *P. aeruginosa* e isto explica porque o espectro de hospedeiros infectados é tão grande (KERR & SNELLING, 2009).

A competição de *P. aeruginosa* por ferro nos tecidos do hospedeiro, pela produção de um forte quelante como a pioquelina pode ser reproduzida em meios de cultura artificiais. A pioquelina também age como catalisador para a formação de radicais hidroxilas, e contribui para dano endotelial, através de oxidação por O₂ e H₂O₂. A pioverdina, o principal pigmento responsável pela absorção de ferro, permite crescimento de mutantes pioverdina-negativos em meios contendo transferrina humana, e assim justifica a consideração desta na virulência da espécie (PALLERONI, 2009).

P. aeruginosa controla múltiplos genes para a expressão de sua virulência através de LasR, um ativador transcricional que age com a participação de um autoindutor e uma lactona *N*-acyl homoserina. A produção de fatores de virulência (exotoxina A, elastase, protease alcalina, alginato, fosfolipases e ramnolipídeos, que agem como surfactantes extracelulares) podem ser estimulados em mutantes por transferência de genes, ou por adição de lactonas *N*-acyl homoserina.

Quatro proteínas efetoras foram identificadas: ExoS e ExoT, que são enzimas bifuncionais com atividade GTPase e ADP ribosilase (causam desorganização do citoesqueleto da célula hospedeira), ExoU (uma citotoxina com atividade de fosfolipase) e ExoY (uma adenilato ciclase). Diferentes combinações destas proteínas resultam em profundos e danosos efeitos na função da barreira epitelial e na cicatrização. Também acredita-se que as proteínas interfiram na função de macrófagos e neutrófilos (KERR & SNELLING, 2009; ENGELS & BALACHANDRAN, 2009). O Exo U e Exo T conferem capacidade anti-fagocítica, e a Exo S e Exo U previnem a produção de interleucina por macrófagos alveolares (BLEVES *et al.*, 2010). Estes fatores de virulência solúveis necessitam de sistemas especializados de transporte, e em *P. aeruginosa* existem os tipos I, II, III, IV e V. O mais importante sistema de excreção, o tipo III (T3SS), é responsável pela patogênese de infecções agudas por *P. aeruginosa*. O T3SS contribui para dano de células epiteliais e macrófagos *in vitro*, em modelos animais e infecções humanas. Este sistema necessita de um cofator eucariótico, por isto sua função torna-se estrita em um hospedeiro (BLEVES *et al.*, 2010).

A exotoxina A é a substância mais tóxica de *P. aeruginosa* e pertence a uma família de enzimas chamadas de mono-ADP-ribosiltransferases, sendo mais especificamente uma NAD⁺ diftamida-ADP-ribosiltransferase. A exotoxina A é um fator de virulência que mimetiza o modo de ação da toxina diftérica: é capaz de transferir um

grupo ADP ribosil a um fator de alongação tipo 2, resultando em terminação abrupta de tradução, inibição de síntese protéica e morte celular. A toxina é excretada quando a célula cresce em condições limitantes de ferro, e sua produção é reprimida quando o mineral não está em baixas concentrações (WOLF & ELSÄSSER-BEILE, 2009).

Alginato é um exopolissacarídeo composto de diversas espécies de *Pseudomonas* sp. Está envolvido na aderência de células bacterianas ao tecido hospedeiro. O alginato, contribuindo para formação do biofilme, é constituído de unidades alternadas de ácido manurônico e L-gulurônico, unidos por ligações β (1 \rightarrow 4), em que parte dos grupos carboxilas do ácido manurônico são acetilados. O polímero não mostra a repetição de um tipo de unidade, mas existem regiões em que um ou outro ácido urônico predomina (PALLERONI, 2009). A habilidade de *P. aeruginosa* na formação do biofilme é importante para a persistência da bactéria nos nichos ambientais (Fig. 2). Quando é formada uma massa complexa de células, fixas a uma superfície, *P. aeruginosa* torna-se significativamente mais resistente a biocidas do que no estado livre. Isto tem conseqüências diretas nos regimes de limpeza em hospitais. Da população de células induzidas a formar biofilme, uma subpopulação de bactérias desenvolve tolerância ao antibiótico. O gene *arr* é necessário para as baixas respostas à tobramicina, enquanto *ndvB* contribui para a proteção da célula (Adaptado de: O'TOOLE & STEWART, 2005).

Os biofilmes também ocorrem no hospedeiro, associados com infecções pulmonares crônicas de pacientes com fibrose cística e bronquiectasia (KERR & SNELLING, 2009). No caso de fibrose cística, a colonização crônica por *P. aeruginosa* sofre alteração fenotípica, resultando em perda do Antígeno O do LPS. Isto faz com que não se possa tipificar a bactéria, ou esta exhibe aglutinação, além da grande produção de alginato. Como a bactéria é encontrada em abundância no ambiente, acreditava-se que a sua mera presença é a causa primária de fibrose cística. A principal complicação da infecção crônica é a perda progressiva da função pulmonar (LOGAN *et al.*, 2010). Finalmente, as alterações provocadas pelas colônias mucóides mutantes contribuem para a destruição dos pulmões (CRIPPS *et al.*, 2006).

Plasmídeos são importantes componentes da constituição genética de *P. aeruginosa*. Alguns atuam como fatores de fertilidade, outros conferem resistência a vários agentes (plasmídeos R), e existem ainda aqueles que permitem à bactéria degradar fontes incomuns de carbono, permitindo a versatilidade tão conhecida do gênero. Exemplos de propriedades de *P. aeruginosa* ao adquirirem plasmídeos:

resistência a antibióticos (carbenicilinas, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, tetraciclina, tobramicina, sulfonamidas), a borato, cromato, íons metálicos, organomercúricos, telurito, radiação ultravioleta, além de resistência à propagação de bacteriófagos e à lisogenização por fagos (PALLERONI, 2009). A multirresistência a antibióticos é a principal fator de virulência da espécie. LEPELLEITIER *et al.* (2010) estudaram o impacto do uso prolongado de imipenen (β -lactâmico) em pacientes hospitalizados, com colonização no trato gastrointestinal por *P. aeruginosa*. Os autores detectaram um aumento na resistência: dos 150 pacientes colonizados pela espécie, 38 apresentaram cepas resistentes ao antibiótico. SUÀREZ *et al.* (2010) avaliaram a epidemiologia de pacientes colonizados com cepas de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, e embora não houvesse diferenças em índices de mortalidade entre portadores de cepas resistentes ou sensíveis, o primeiro grupo possui maior número de fatores de risco, devido ao metabolismo das cepas. A resistência a carbapenêmicos é considerada mais séria do que as demais, devido à produção de metalo- β -lactamases, enzimas capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (YOUSEF *et al.*, 2010).

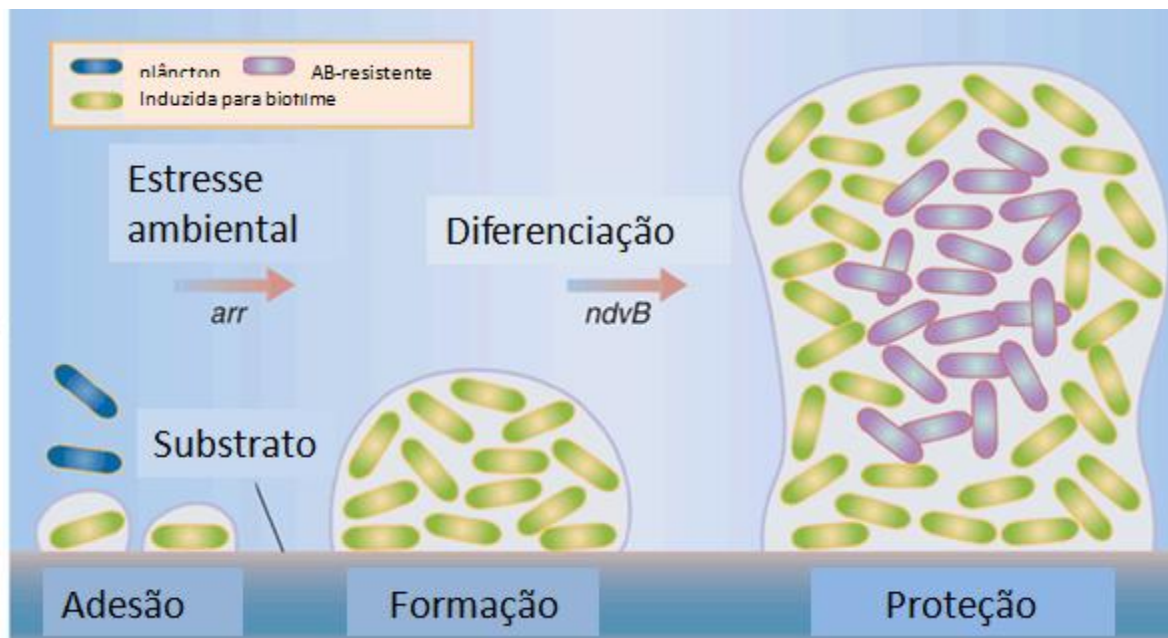


Figura 2 - Formação de biofilme de *P. aeruginosa*, após desafio com Tobramicina, um aminoglicosídeo. Arr e ndvB são genes que participam do processo de constituição do biofilme. (Adaptado de: O'TOOLE & STEWART, 2005).

3.4. VACINAS PARA *Pseudomonas aeruginosa*

Desde 1960, várias vacinas experimentais foram desenvolvidas e testadas para prevenção de *P. aeruginosa* em pacientes queimados. Os produtos testados mais

promissores foram duas vacinas baseadas nas propriedades antigênicas do LPS: PseudogenTM, um preparado heptavalente, e PEV-01, uma vacina contendo 16 sorotipos. Ambas estimulavam a produção de anticorpos contra todos os sorotipos O contidos nas vacinas, e houve redução na mortalidade em pacientes com queimaduras. Estudos com PseudogenTM também foram realizados em pacientes com fibrose cística e falência respiratória. No entanto, as duas vacinas não atenderam aos requisitos de aprovação clínica, devido à toxicidade associada à fração do Lipídeo A do LPS (BAUMANN *et al.*, 2004). No caso da PseudogenTM, os pacientes tiveram uma piora clínica, se comparados com grupos controle (DÖRING & PIER, 2008). Em relação à PEV-01, não houve alteração no progresso da doença entre os grupos vacinados e não-vacinados. Provavelmente a vacina não conferia proteção para um espectro suficiente de sorotipos de *P. aeruginosa* (DÖRING & PIER, 2008).

Anos depois, vacinas de subunidade baseadas em oligossacarídeos purificados do LPS, conjugadas à exotoxina A, exopolissacarídeo mucóide ou flagelo mostraram menor toxicidade e induziram produção de anticorpos em voluntários e grupos de pacientes (1987). No entanto, atualmente não existem vacinas contra *P. aeruginosa* aprovadas para uso humano, não tendo havido comprovação de eficácia e segurança para utilização nos grupos de risco (BAUMANN *et al.*, 2004).

Uma vacina recombinante das proteínas de membrana OpF e Opl, foi desenvolvida por BAUMANN *et al.* (2004), e testada em grupos de risco. A vacinação foi bem tolerada, e aplicações intranasais em voluntários induziram produção de IgA. A vacina está em testes clínicos, na fase 2. Nos últimos anos, vários produtos estão sendo testados: vacinas que utilizam fímbrias (1995-2006), bactéria conjugada a toxóide tetânico (CRYZ *et al.*, 1989), vacinas de DNA de OprF (CRIPPS *et al.*, 2006) e células inativadas (CRIPPS *et al.*, 2006). Estes protótipos estão em testes pré-clínicos e clínicos fase 1 ou 2 (DÖRING & PIER, 2008). Na fase 1 determina-se dose, via de administração e efeitos colaterais; na fase 2 avalia-se a eficácia e segurança quanto à toxicidade e na fase 3 é quando se compara o novo medicamento com o já existente (SANTOS *et al.*, 2009).

TARANEJOO *et al.* (2011) utilizaram micropartículas de quitosana para carregar exotoxina A, como tentativa de criar um antígeno para imunização intranasal. A eficiência no carregamento de antígenos foi satisfatória (59%). A quitosana é utilizada para aplicações farmacêuticas e biomédicas, capaz de abrir junções epiteliais, transportando determinado antígeno para seu local de interação.

3.5. VACINAS CONJUGADAS

A indução de anticorpos contra estruturas de membrana da *P. aeruginosa* é T-independente, pelo fato dos antígenos induzirem a produção de anticorpos por uma via independente de linfócitos T-auxiliares, não ativando células B para geração de memória. Antígenos T-independentes são geralmente moléculas grandes, com múltiplas repetições de subunidades, como os lipídeos e carboidratos da membrana externa de bactérias Gram negativas.

A geração de memória imunológica pode ser induzida quando antígenos são transformados em T-dependentes, pela sua conjugação com uma proteína. Esta resposta imune, que envolve o conjugado polissacarídeo-proteína, tem início fora do sistema linfático, no momento da captura deste complexo por células dendríticas. Estas células, ao dirigirem-se para os tecidos linfóides secundários, internalizam o conjugado, degradando-os em peptídeos, e expondo-os ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), para interação com células T específicas (PLOTKIN & ORENSTEIN, 2004).

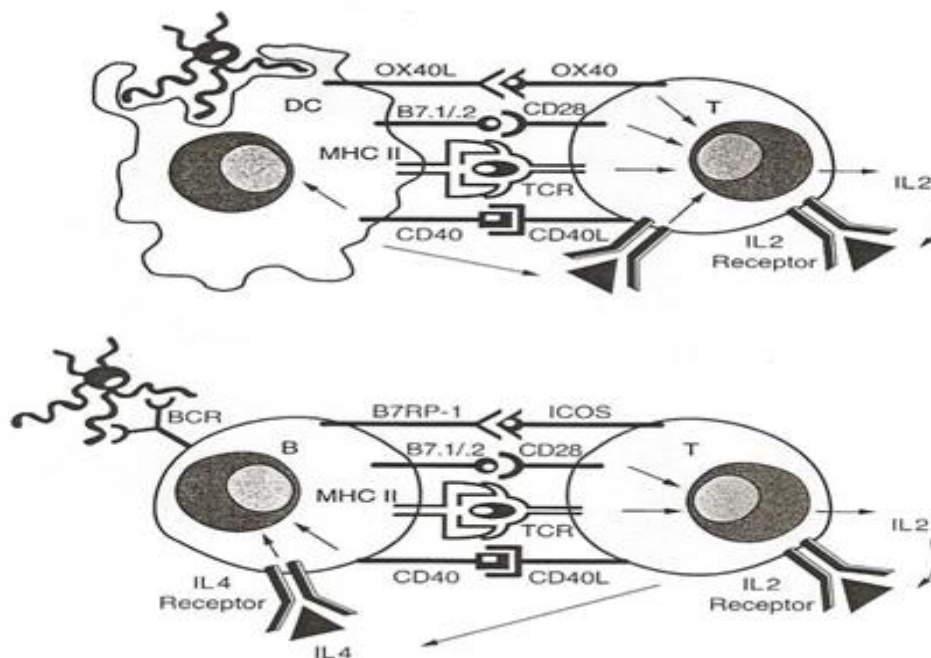


Figura 3 - Processamento de conjugado polissacarídeo-proteína por célula dendrítica (DC) e linfócito B, e interações destes com um linfócito T, após exposição do antígeno em MHC II (Adaptado de: PLOTKIN & ORENSTEIN, 2004).

A ligação covalente de antígenos carboidratos a antígenos protéicos, descrita pela primeira vez por Avery e Goebel em 1929 (MIDWINTER *et al.*, 1994; PLOTKIN & ORENSTEIN, 2004) confere propriedades celulares T-dependentes a vários antígenos polissacarídicos. Estes pesquisadores afirmaram que a imunogenicidade de

carboidratos, considerados fracos imunógenos, poderia ser aprimorada se fossem covalentemente ligados a uma proteína carreadora. Nos últimos anos, desenvolveram-se várias vacinas conjugadas em fase de aprovação, como contra estreptococcoses, febre tifóide e estafilococcoses (ESLOKA *et al.*, 2004).

Existem atualmente vacinas conjugadas de alta eficácia contra várias doenças bacterianas invasivas para crianças, incluindo aquelas causadas por *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), pneumococos e meningococos. O resultado da conjugação é uma resposta alta de IgG e geração de células de memória, mimetizando uma resposta imunológica a uma proteína (FRASCH, 2009).

Pesquisas envolvendo o uso de vacinas conjugadas já foram realizadas para *P. aeruginosa*, embora nenhum produto encontre-se disponível para uso. Cryz *et al.* (1986) conjugaram o antígeno alginato da espécie com exotoxina A. Este conjugado induziu alta resposta de anticorpos contra alginato e exotoxina A em coelhos. As imunoglobulinas promoveram opsonização e neutralização de cepas mucóides de *P. aeruginosa*, com resposta de neutrófilos. Kashef *et al.* (2006) conjugaram alginato ao toxóide tetânico, conferindo proteção em camundongos contra uma dose letal de *P. aeruginosa*. Cryz *et al.* (1989) desenvolveram um conjugado octavalente do Antígeno O (envolvendo os oito sorotipos mais freqüentes) à exotoxina A. Esta vacina, chamada AerugenTM, conferiu proteção significativa após aplicação intramuscular em animais. Após a aplicação, estes foram desafiados com cepas de *P. aeruginosa* contidas na vacina. Também houve desafio intranasal com o conjugado, porém não se admitiu maior proteção por esta via. A vacina entrou em testes clínicos (fase 2), mas em 2006 os testes duplo-cegos foram finalizados, porque AerugenTM não demonstrou diferença significativa entre o grupo imunizado e um grupo controle (DÖRING & PIER, 2008).

Em 2009, SANTOS *et al.* produziram um imunógeno da bactéria levando em consideração seu LPS, conjugado à albumina bovina. Seguindo um protocolo de hiperimunização, o estudo não observou maior titulação do grupo conjugado em relação ao controle.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O estudo utilizou a cepa 27853(Newprov©) de *P. aeruginosa* . Os meios utilizados foram Sangue (Newprov©), Ceftriaxona (Newprov©), Pseudomonas (Himedia©), Müller-Hinton (Himedia©), ágar Asparagina (Himedia©), ágar Sangue (Newprov©), caldo Asparagina (Himedia©). Provas bioquímicas para identificação de bactérias gram- negativas não-fermentadoras BacTray III® (Laborclin©).

Para a realização de cromatografia de gel-permeação utilizou-se uma coluna de gel-permeação com Sepharose CL-4B (Sigma©), de 84 cm de altura com 1 cm de diâmetro, e eluída com solução salina (NaCl 0,85%).

4.2. CULTURA E IDENTIFICAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (PALLERONI apud SCHROETER, 1872), cepa 27853 (Newprov©) foi cultivada em ágar Sangue (Newprov©), a 37°C, por 24 horas. Para a confirmação da espécie, colônias foram semeadas em ágar Ceftriaxona (Newprov©), conforme a Figura 4, e nas provas bioquímicas para identificação de bactérias gram- negativas não-fermentadoras BacTray III® (Laborclin©), conforme a Figura 5.

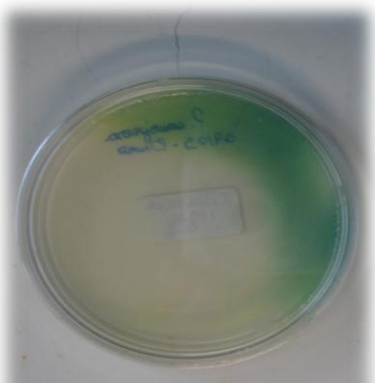


Figura 4 - Cultivo de *P. aeruginosa* em ágar Ceftriaxona. Fonte: o autor.



Figura 5 - Provas bioquímicas identificando metabólitos formados por *P. aeruginosa*, como a formação de esculina. Fonte: o autor.

4.3. AVALIAÇÃO DE MASSA BACTERIANA E RENDIMENTO DAS CULTURAS

Para avaliar qual meio de cultura seria mais eficiente para a produção da bactéria, utilizaram-se 4 meios de cultura diferentes (20 placas cada) para a produção de *Pseudomonas aeruginosa*: ágar Pseudomonas (Himedia©), ágar Müller-Hinton (Himedia©), ágar Asparagina (Himedia©), ágar Sangue (Newprov©), além de 400 ml de caldo Asparagina (Himedia©). Cada placa de ágar utilizada para produção da bactéria recebeu um inóculo de 1 ml do tubo 0,5 da escala de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia). Após o crescimento, foram realizadas suspensões (solução salina 0,85%) de cada meio, centrifugadas a 3220g, por 20 minutos, a 8°C (centrífuga Cientek©, modelo T-6000R). Após o procedimento, o conteúdo centrifugado passou por duas lavagens com água destilada, e foi novamente centrifugado. As massas foram então submetidas a 37°C, para secagem. Cada massa foi pesada em balança analítica (Bioprecisa©, modelo FA2104 N) para confirmação do meio de cultura com o maior rendimento em relação à produção de *P. aeruginosa*.

4.4. INATIVAÇÃO QUÍMICA

Uma suspensão das colônias em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada foi preparada e inativada com formaldeído 37%, 1:5000 (0,2 ml de formol para 400 ml de meio de cultura), por 24 horas a 8°C. A confirmação da inativação foi observada pela ausência de crescimento quando uma amostra da suspensão foi semeada e incubada a 37°C por 24h. Esta metodologia foi aplicada para inativar a suspensão de bactérias utilizadas para a extração de LPS e da conjugação por aminação redutiva direta.

4.5. EXTRAÇÃO DO LIPOPOLISSACARÍDEO

O protocolo utilizado para extração de Lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa* foi padronizado segundo a técnica de WESTPHAL & JANN (1965). Neste procedimento, uma suspensão bactéria é solubilizada em água destilada, a 65-68°C; adiciona-se o mesmo volume de solução de fenol a 90% à suspensão bacteriana, sob agitação, por 15 minutos. Em seguida foi centrifuga-se a suspensão a 2630 g, a 10°C, durante 40 minutos. Sobrenadante é coletado, repetindo o processo mais duas vezes. Os sobrenadantes coletados misturados foram então dialisados contra água destilada por 4 dias, em temperatura ambiente. A fração aquosa assim obtida foi denominada de LPS.(Figura 6). O produto final da extração foi de 180 ml, e a solução dividiu-se em 3

fases: uma fase sobrenadante, a qual possuía o LPS extraído e frações de ácidos nucléicos, uma fase aquosa, uma fração intermediária que sofreu nova centrifugação, para obtenção de LPS residual, e uma outra fase, a fração fenólica, de aspecto escuro, que continha precipitado celular desnaturado e fenol.

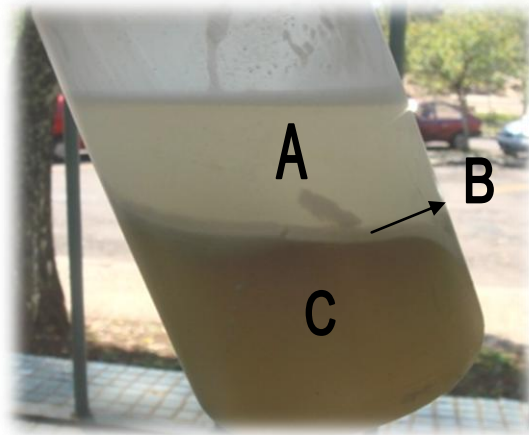


Figura 6 – Extração de LPS, e fases do produto final. A. Fração aquosa. B. Residual. C. Fenólica. Fonte: SANTOS et al (2009).

4.6. ANÁLISE DO LIPOPOLISSACARÍDEO

Para realização das dosagens de açúcar e proteína, utilizou-se uma alíquota da fase aquosa. A dosagem de açúcar total (AT) foi realizada pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) com leitura em 490 nm. O princípio da técnica é reduzir compostos derivados de açúcar presentes na solução, através da adição de fenol. O produto tem uma coloração amarelo-laranja (Fig. 6).

A dosagem de proteína total (PT) foi realizado pelo método de BRADFORD (1976) com leitura em 595 nm: sob condições alcalinas ocorre a formação de complexos de proteínas pela reação com o tartarato de cobre e o reagente de azul de Comassie. O resultado são tons de azul, conforme a concentração de proteínas da solução (Fig. 7). A reação ocorre sem a interferência de carboidratos ou cátions (BRADFORD, 1976). Cada dosagem foi realizada após curva-padrão de açúcares e proteínas.

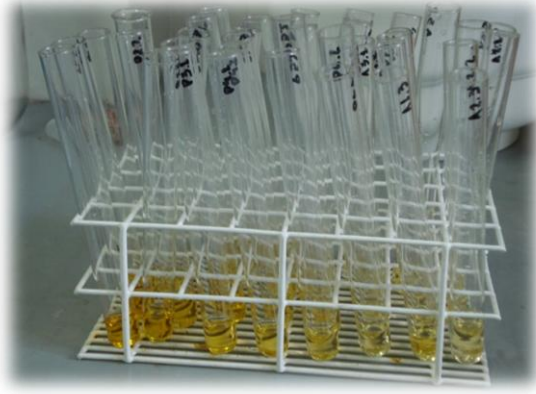


Figura 7 - Dosagens de açúcar, método de DUBOIS (1956). Fonte: o autor.

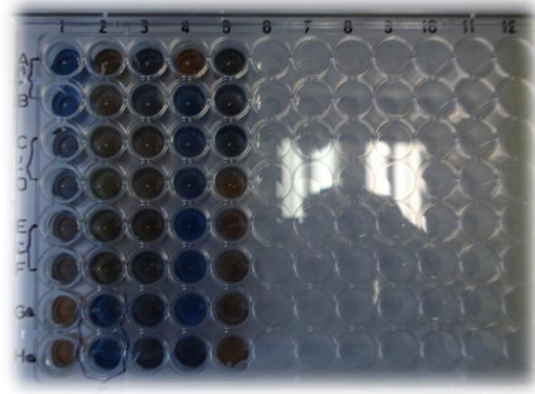


Figura 8 - Dosagens de proteínas, método de BRADFORD (1976). Fonte: o autor.

4.7. CROMATOGRAFIA DE GEL-PERMEAÇÃO DOS ANTÍGENOS

As amostras foram aplicadas em uma coluna de gel-permeação com Sepharose CL-4B (Sigma©), de 84 cm de altura com 1 cm de diâmetro, e eluída com solução salina (NaCl 0,85%). A sefarose é uma matriz utilizada para produtos de massa molar de 60 – 20.000 kDa para proteína, e 30 – 5.000 kDa para açúcares. Utilizou-se o corante blue dextran para determinação de volume morto (Fig. 8). Como controle, eluíram-se cinco soluções dextroses-padrão de 10 mg, variando a massa molar de 71,6 - 2.000 kDa. Uma amostra do LPS foi eluída, e alíquotas foram coletadas para dosagens de AT e PT. O mesmo foi realizado para o LPS conjugado. Também foi aplicada uma solução de toxóide tetânico, utilizado-a para conjugação com o LPS de *P. aeruginosa*, coletando-se alíquotas para a dosagem de PT.



Figura 9- Passagem de Blue Dextran para determinação de volume morto da coluna de gel-permeação. Fonte: o autor.

4.8. CONJUGAÇÃO DO LPS DE *Pseudomonas aeruginosa* COM TOXÓIDE TETÂNICO E ANÁLISE DO IMUNOCONJUGADO

Para a conjugação do LPS de *P. aeruginosa* com o toxóide tetânico, foi utilizada a técnica de aminação redutiva direta, adaptado de SHEN *et al.* (2001), em que o meta-periodato de sódio produz grupamentos aldeídos. Dissolveram-se 10 mg de LPS em 20 ml de água destilada, adicionado de 4 mM de meta-Periodato de Sódio (NaIO_4) sob agitação, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 1,5 h. Em seguida, foi adicionado etileno-glicol mantendo a solução por mais 30 minutos nas mesmas condições. O material foi então dialisado contra água destilada por 3 dias, em temperatura ambiente.

Após diálise foi adicionado bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,1 M e o pH ajustado para 8,5; em seguida solubilizaram-se 3,9 mg de toxóide tetânico (TT), e finalmente adicionaram-se 20 mg/mL de cianoborohidreto de Sódio (NaCNBH_4) sob agitação leve, ao abrigo da luz, a temperatura de 37°C, por 5 dias. Após o tempo de incubação, 10 mg/mL de borohidreto de sódio (NaBH_4) foram solubilizados e deixou-se a solução em temperatura ambiente por 18 h. Por final a solução foi dialisada contra água destilada por 4 dias, com duas trocas diárias de água.

. A reação de conjugação foi feita com a colaboração com a Profa. Dra. Maria Rita Sierakowski - Departamento de Química - UFPR.

Para a análise do imunocombinado, foi realizada gel-permeação e foram realizadas dosagens de açúcar e proteínas totais nas alíquotas coletadas para a determinação da alteração do perfil de eluição em comparação com os perfis de LPS e TT, isoladamente.

4.9. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE *IN VIVO* POR MEIO DA IMUNIZAÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, com idade entre 3 e 5 semanas. A autorização para utilização desses animais foi concedida pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEAA, certificado 416, de 01/12/2009). Os animais foram tratados com ração própria para camundongos e água filtrada *ad libitum*. Eram levados do

biotério ao Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi para os procedimentos de exame clínico, marcação, vacinação e colheita de sangue.

Todo procedimento de eutanásia realizado, quando necessário, foi realizado sob protocolo de anestesia com Cloridrato de Xilazina 2% via intraperitoneal seguido de exossanguese ou injeção de Cloreto de Potássio 10%, via intracardiaca.

Os animais foram divididos em 13 grupos, com 6 camudongos cada. O protocolo foi dividido em 2 experimentos: um primeiro, que considera o LPS como controle, e avalia a resposta de LPS e TT administrados isoladamente, além da próprio imunógeno conjugado. O segundo experimento considera os mesmos grupos, porém, os animais recebem uma dose prévia de bacterina (células da bactéria inativadas). SANTOS et al (2009) obtiveram maior resposta de anticorpos ao administrar LPS nas concentrações 20 µg e 40 µg, em camundongos.

1° Experimento (sem dose prévia de bacterina)	
Grupo 1	Controle solução NaCl 0,85% (m/v)
Grupo 2	Controle LPS 20 µg/dose
Grupo 3	Controle LPS 40 µg/dose
Grupo 4	LPS 20 µg/dose + TT(29,4 µg/dose)
Grupo 5	LPS 40 µg/dose + TT(58,8µg/dose)
Grupo 6	LPS-TT 20 µg/dose
Grupo 7	LPS-TT 40 µg/dose
2° Experimento (dose prévia de bacterina 3×10^8 UFC)	
Grupo 8	Controle LPS 20 µg/dose
Grupo 9	Controle LPS 40 µg/dose
Grupo 10	LPS 20 µg/dose + TT(29,4 µg/dose)
Grupo 11	LPS 40 µg/dose + TT(58,8µg/dose)
Grupo 12	LPS-TT 20 µg/dose
Grupo 13	LPS-TT 40 µg/dose

Figura 10...Protocolo de vacinação em modelo animal. Fonte:o autor.

O protocolo de vacinação foi realizado da seguinte forma: aplicações com intervalo de duas semanas, totalizando quatro doses/animal, e quatro semanas após a

última aplicação foram realizadas 3 coletas de sangue(via retro-orbital), em intervalo de 4 semanas.Duas semanas após a soroaglutinação de todos os grupos ficarem negativas, houve uma última aplicação, em todos os grupos, com uma dose de bacterina 3×10^8 UFC(dose reforço). Realizou-se nova soroaglutinação 2 semanas após.

4.10. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS

O teste de Soroaglutinação Microscópica (SAM) possui a vantagem de ser sorovar-específico (ROSA, 1970; TIZARD, 1992). É realizado colocando-se frente a frente microorganismos vivos, juntamente com o soro teste. Caso haja anticorpos no soro, ocorre a aglutinação que poderá ser visualizada pelo aglomerado de células bacterianas. A SAM utilizada no trabalho é a soroaglutinação em lâmina adaptada de LABORDE & FAJARDO (1969). O antígeno foi preparado com a suspensão de uma cultura de *P. aeruginosa* (cepa ATCC 27853 Newprov) em solução salina (NaCl 0,85%) até atingir opacidade equivalente ao tubo 1 da escala de McFarland(OTTO-BIER, 1970).

Volumes iguais do soro-teste e da suspensão bacteriana foram misturados em lâmina de vidro, em temperatura ambiente, e a leitura da aglutinação se dava no tempo máximo de 10 minutos. Foram realizadas diluições seriadas do soro com fator de diluição de 2 vezes para a determinação do título de aglutinação, que é definido como sendo a maior diluição da amostra onde ocorre reação positiva.

4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a diferença significativa entre os títulos de anticorpos dos grupos teste e controle, foi aplicado o teste t de Student, com um nível de significância de 0,01 para comparação das médias dos títulos de anticorpos entre os grupos vacinados.

5.RESULTADOS

5.1. PRODUÇÃO E INATIVAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa*

Os rendimentos obtidos pós o cultivo da *Pseudomonas aeruginosa* em 4 diferentes meios de cultura são apresentados na tabela 2. O caldo à base de asparagina foi o meio com o maior rendimento, pois nos meios de cultura sólidos foram utilizadas 20 placas de Petri, correspondendo a um volume total de 400 ml para cada meio sólido, enquanto no caldo, a massa bacteriana era produzida no mesmo volume representando melhor relação custo: produção (Tabela. 1).

No entanto, os primeiros cultivos provenientes deste meio de cultura líquido provaram que este seria inapropriado para o trabalho: o caldo, ao ser incubado a 37°C, necessitava de constante aeração, e a massa bacteriana proveniente apresentava aspecto mucóide e de difícil centrifugação. A homogenização com solução salina 0,85% gerava um produto de 2 fases: precipitado e líquido, o que sugere que o caldo selecione cepas mucóides, descritas por PALLERONI (2009).

Assim, o meio escolhido para a produção da bactéria foi o ágar Sangue. Para a extração de LPS, a bactéria foi cultivada em 90 placas, com posterior inativação por formaldeído 37%. O cultivo em placas produziu 336×10^{13} células bacterianas, em 280 ml de solução salina 0,85%.

CULTURA	VOLUME(ml)	MASSA (mg)
SANGUE	400	190
MUELLER - HINTON	400	180
PSEUDOMONAS	400	10
ASPARAGINA	400	60
ASPARAGINA CALDO	400	180

Figura 11 – Rendimento de *P. aeruginosa* em diferentes meios de cultura

5.2. EXTRAÇÃO DE LPS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Para extração do LPS foram utilizados 0,3521 g de *Pseudomonas aeruginosa* (336×10^{13} UFC). O princípio da extração de LPS de bactérias com o protocolo fenol-água quente utiliza a capacidade do fenol em desnaturar as proteínas das células, e assim, romper a ligação do lipopolissacarídeo com a membrana externa (dissociação do antígeno somático O). O LPS e os ácidos nucleicos preservados foram colhidos no sobrenadante. Isto significa que houve dissociação do complexo antígeno somático (polissacarídeo O) da parede bacteriana. Foi feito um tratamento subsequente com água para a extração do polissacarídeo antigênico não degradado da solução (WESTPHAL & JANN, 1965).

O produto final da extração foi de 180 ml, e a solução dividiu-se em 3 fases: uma fase sobrenadante, a qual possuía o LPS extraído e frações de ácidos nucleicos, uma fase aquosa, uma fração intermediária que sofreu nova centrifugação, para obtenção de LPS residual, e uma outra fase, a fração fenólica, de aspecto escuro, que continha precipitado celular desnaturado e fenol.

Considerando a massa bacteriana presente no volume inicial da extração (0,352g em 180 ml), a execução do protocolo de WESTPHAL & JANN (1965) apresentou rendimento de 2,8%. SANTOS *et al* (2009) obtiveram rendimento de 1,5%. CRYZ *et al*. (1986) conjugaram LPS a toxóide tetânico, mas não citaram valores de rendimento.

5.3. REAÇÃO DE CONJUGAÇÃO DO LPS DE *Pseudomonas aeruginosa* AO TOXÓIDE TETÂNICO

A conjugação do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* ao toxóide tetânico (LPS-TT) foi produzida pelo método de SHEN *et al*. (2001). A técnica é uma reação de aminação redutiva direta, em que a molécula a ser conjugada, no caso, o LPS, tem seus grupos hidroxila oxidados, resultando em grupos aldeído. Os aldeídos recém-formados têm alta capacidade de interação com proteínas, e através de ligação amina, o protocolo permite a obtenção de um conjugado com uma proteína de escolha, como o toxóide tetânico.

Como resultado pós-conjugação, obtiveram-se 33 ml de LPS-TT, este conjugado apresentou coloração esbranquiçada e turva. Metodologias de conjugação como a

aminação redutiva direta, a técnica utilizada para a criação dos imunógenos em estudo são as de maior interesse, devido à simplicidade e ao baixo custo. O trabalho seguiu a reação redutiva de Borch, que utiliza o cianoborohidreto de sódio como molécula redutora. Um benefício prático da aaminação redutiva é a baixa criação de compostos prejudiciais à imunogenicidade das moléculas (BASU *et al.*, 2002).

O trabalho de CRYZ *et al.* (1986) leva em consideração a conjugação do LPS de *P. aeruginosa* a toxóide tetânico. Os autores deslipidificaram o LPS por centrifugação, tornando a molécula menos tóxica. Como resultado, o trabalho conseguiu títulos de IgG anti-LPS significativamente elevados. Os autores constataram que o conjugado provou ser um bom imunógeno para humanos (o trabalho contou com grupos de voluntários). No entanto, a técnica de conjugação utilizada no trabalho é pouco prática: a reação utilizou carbodiimida, e foi necessária a adição de dihidrazida como espaçador, resultando em mais etapas e reações. O presente trabalho conta com uma técnica mais rápida e simples, prática para estudos iniciais e reprodução em larga escala.

5.4. ANÁLISE DE AÇÚCAR E PROTEÍNA TOTAIS

Nas análises de açúcar total e de proteína total dos imunógenos, as concentrações obtidas estão listadas na figura 12.

Imunógeno	Açúcar total ($\mu\text{g/ml}$)	Proteína total ($\mu\text{g/ml}$)
LPS	549,5	40,5
LPS-TT	125,8	184,8
Bacterina	141,2	514,4

Figura 12 – Concentrações de açúcar e proteínas totais dos imunógenos.

SANTOS *et al.* (2009) ao criarem uma vacina com LPS conjugado à albumina bovina, obtiveram 517,5 $\mu\text{g/ml}$ de LPS (açúcar total), e 373 $\mu\text{g/ml}$ e 463 $\mu\text{g/ml}$ do conjugado (açúcar e proteínas totais, respectivamente).

5.5 CROMATOGRAFIAS DE GEL-PERMEAÇÃO DE LPS, TT e LPS-TT

As eluições de açúcares-padrões e das amostras tiveram o volume morto da coluna desconsiderado (22 ml). Tanto os açúcares-padrões quanto o toxóide tetânico purificado apresentaram distribuição regular, com pico definido, sugerindo que as soluções encontravam-se homogêneas. O Gráficos 1 mostra os perfis de eluição de algumas das soluções padrões utilizadas para controle de qualidade da coluna empregada.

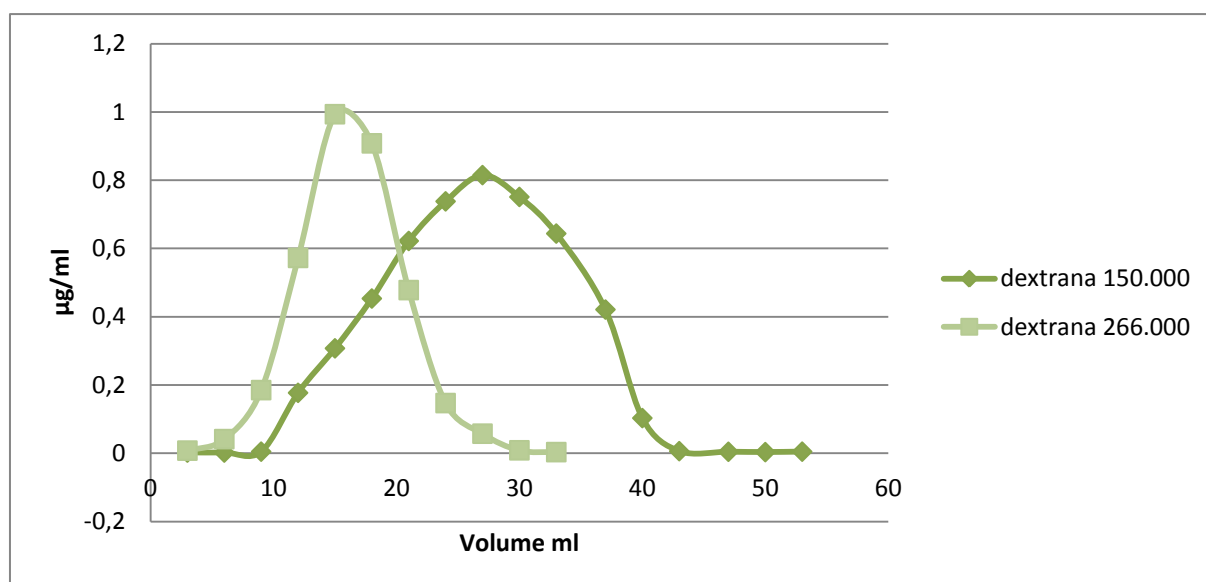


Figura 13 - Perfil de eluição da dextrana padrão 266 kDa e 150 kDa, após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose Cl-4B, h: 84 cm, \varnothing = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).

O Gráfico 2 indica o perfil gerado pela eluição do toxóide tetânico, com detecção de proteína entre 0 a 120 ml, em amostras eluídas a cada 3 ml. Como esperado, a dosagem de açúcar total foi nula. Observa-se que a maior concentração de proteína foi eluída aos 40 ml.

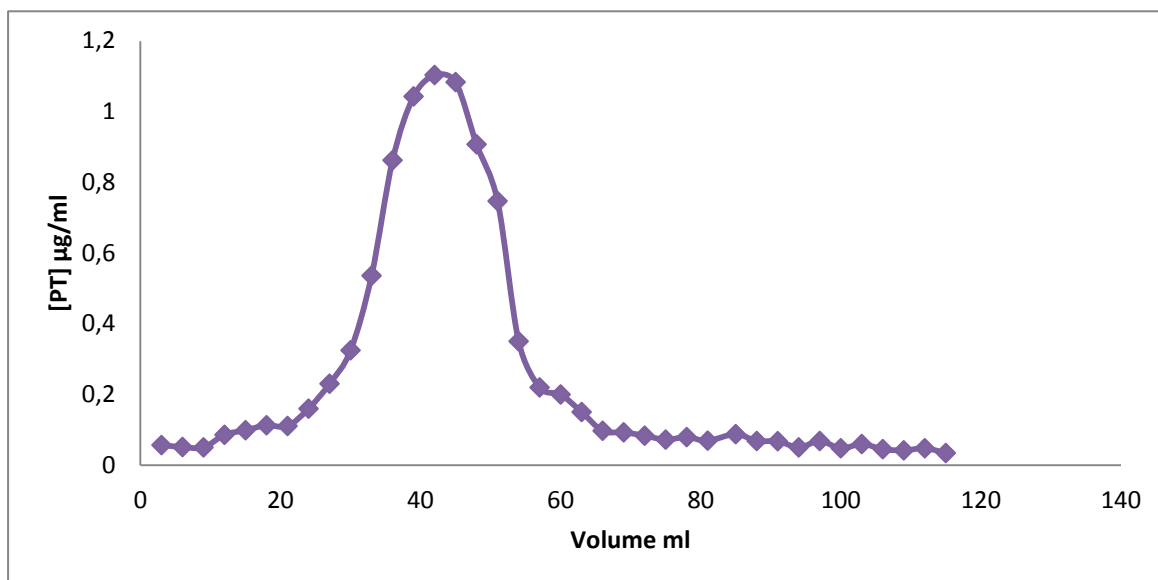


Figura 14 - Perfil de eluição do Toxóide Tetânico após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose CI-4B, h: 84 cm, \varnothing = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).

A eluição do Lipopolissacarídeo, demonstrada no Gráfico 3, permite identificar um pico de detecção maior, seguido de vários menores, sugerindo que a maior parte do LPS tenha sido eluída em 10 ml, e aos 50 ml (segundo maior pico). Sabe-se que o LPS de *Pseudomonas aeruginosa* pode apresentar diferentes massas moleculares, dependendo do número de porções sacarídeas no polissacarídeo O (Ag-O) (GOLDBERG E PIER, 1996). Portanto, é possível que os outros picos sejam resultado da eluição de frações de LPS que sofreram hidrólise durante a extração, ou seja, porções de LPS com número reduzido de resíduos de açúcar, em comparação com as frações eluídas em volumes menores.

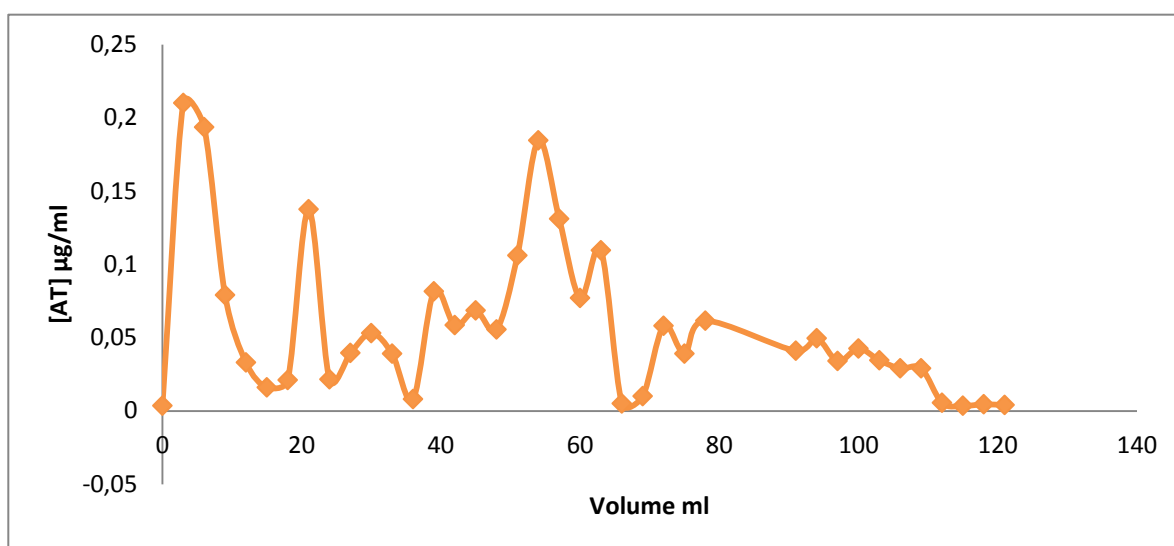


Figura 15 - Perfil de eluição do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose CI-4B, h: 84 cm, \varnothing = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).

O Gráfico 4 mostra a eluição do açúcar e proteína totais do LPS conjugado a Toxóide Tetânico (LPS-TT). A sobreposição dos 2 perfis de eluição sugere que o primeiro pico do açúcar total e da proteína total, ambos em torno de 10 ml, representam a maior quantidade de LPS conjugado. Esta hipótese se baseia na diferença de volumes de eluição: o LPS-TT possui massa molar maior que o do TT e LPS separados, logo, acaba sendo eluídos antes destes (o TT foi eluído aos 40 ml). Os demais picos de detecção de cada curva sugerem a eluição do TT ou do LPS. Também é possível que estes demais picos apresentem LPS conjugado, mas é provável que as moléculas (LPS ou TT) estejam parcialmente degradadas. Estas hipóteses em poderão ser avaliadas em uma etapa posterior, ao fornecermos doses booster aos modelos animais: a presença de resposta anamnésica (resposta imune maior e mais rápida) sugeriria que as moléculas foram aderidas ao MHC-II, para reagirem com linfócitos T. Provavelmente, isto só seria possível se o LPS estivesse covalentemente ligado a um carreador proteico.

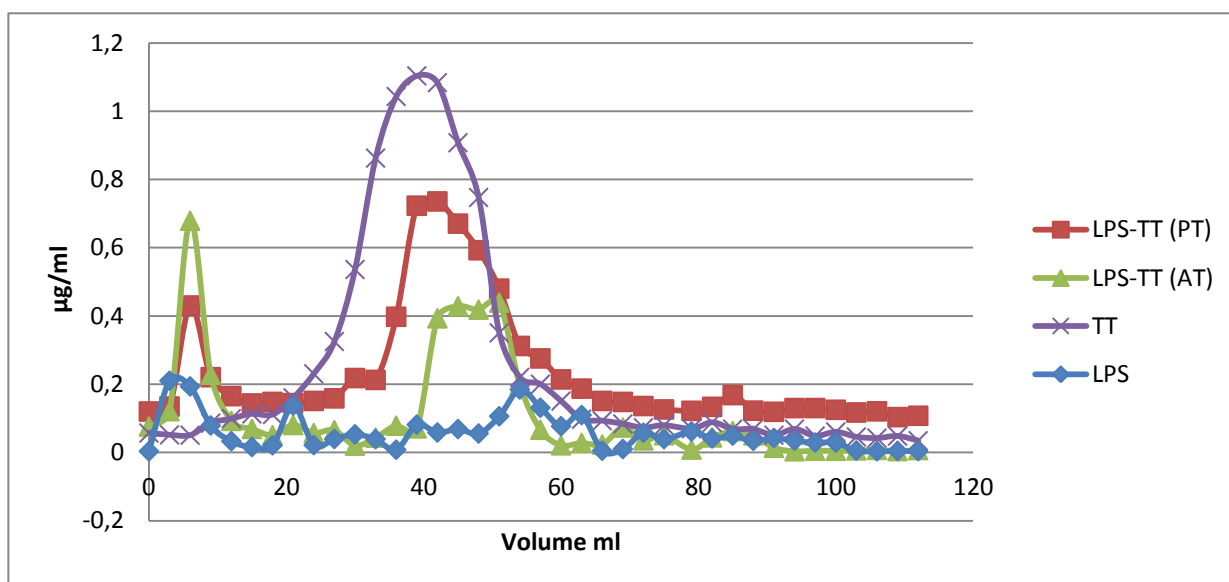


Figura 16 - Perfil de eluição do LPS-TT após aplicação em coluna de gel-permeação (Sepharose Cl-4B, h: 84 cm, Ø = 1 cm, eluente: NaCl 0,85%).

5.6. TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI - *Pseudomonas aeruginosa*

A Tabela 3 apresenta o resultado da titulação dos 13 grupos que receberam doses do imunógeno. Todos os animais, com exceção do Grupo 1, apresentaram sinais de hipertermia e prostração dois dias após a aplicação dos imunógenos. As coletas de sangue, realizadas pela via retro-orbital, foram feitas a cada 30 dias. No período do

experimento, observou-se óbito de 2 animais, sem sinais de infecção. Após a coleta de sangue via retro-orbital, quatro animais desenvolveram uveíte e/ou conjuntivite, os quais foram tratados por sete dias com sulfato de gentamicina 0,1%.

GRUPOS	1ª titulação	2ª titulação	3ª titulação
1	zero	zero	zero
2	1/2048 - 1/128 (1/1024)	1/64 - 1/32 (1/64)	1/8 - 1/2 (1/4)
3	1/1024 - 1/512 (1/512)	1/64 (1/64)	1/16 - 1/8 (1/8)
4	1/1024 - 1/256 (1/1024)	1/256 - 1/32 (1/64)	1/16 - 1/8 (1/16)
5	1/2048 - 1/512 (1/1024)	1/256 - 1/64 (1/64)	1/64 - 1/32 (1/32)
6	1/2048 - 1/128 (1/512)	1/64 - 1/32 (1/64)	1/32 - 1/16 (1/16)
7	1/1024 (1/1024)	1/128 - 1/32 (1/64)	1/64 - 1/16 (1/32)
8	1/512 - 1/128 (1/256)	1/64 - 1/32 (1/64)	1/16 (1/16)
9	1/128 (1/128)	1/64 - 1/8 (1/8)	1/16 - 1/4 (1/16)
10	1/512 - 1/256 (1/256)	1/32 - 1/16 (1/16)	1/16 - 1/8 (1/8)
11	1/512 - 1/256 (1/512)	1/64 - 1/32 (1/64)	1/32 - 1/8 (1/16)
12	1/512 - 1/256 (1/256)	1/128 - 1/8 (1/64)	1/32 - 1/8 (1/32)
13	1/512 - 1/256 (1/256)	1/64 - 1/32 (1/32)	1/16 (1/16)

Figura 17 - Titulação dos soros dos animais vacinados com imunógenos obtidos de *Pseudomonas Aeruginosa*. Cada grupo apresenta a maior e a menor titulação obtida, além da média.

Nos Gráficos 5, 6, 7 e 8 são feitas comparações entre os títulos de soroneutralização obtidos das amostras colhidas 4, 8 e 16 semanas após o término da imunização em camundongos.

Houve diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0,01$) entre o Grupo 2 (Controle LPS 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$) e o Grupo 4 (Controle LPS 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$ + 29,4 $\mu\text{g}/\text{dose}$ de TT), com o Grupo 4 apresentando título de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa* 177% superior ao do controle, bem como entre o Grupo 2 e o Grupo 6 (Conjugado LPS-TT 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$), com o Grupo 6 apresentando título 362% superior ao do controle, na 16ª semana após a imunização (Gráf. 5). Observam-se altos desvios-padrão, e sugerimos que determinadas doses contivessem moléculas de LPS aglomeradas, expondo o animal à um maior desafio antigênico e, portanto, à uma maior produção de anticorpos.

Houve diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0,01$) entre o Grupo 3 (Controle LPS 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$) e o Grupo 7 (Conjugado LPS-TT 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$) com o Grupo 7 apresentando título de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa* 71% superior ao do controle, 4 semanas após a imunização, bem como entre o Grupo 3 e o Grupo 5 (Controle LPS 40 mg/dose), com o Grupo 5 apresentando título 24% superior ao controle, 16 semanas após a imunização (Gráf. 6).

Houve diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0,01$) entre o Grupo 8 (Controle Bacterina seguido de LPS 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$) e o Grupo 10 (Controle Bacterina seguido de LPS 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$ + TT 29,4 $\mu\text{g}/\text{dose}$), com o Grupo 10 apresentando título de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa* 65% menor que o do controle, 8 semanas após a imunização (Gráf. 7). Na 8ª semana após a imunização, detectou-se resposta de anticorpos do grupo G8 maior do que a do grupo G10. Para confirmar esta resposta, é necessário utilizar um número superior de animais.

Houve diferença estatisticamente significativa ($\alpha=0,01$) entre o Grupo 9 (Controle Bacterina seguido de LPS 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$) e o Grupo 13 (Controle Bacterina seguido de LPS 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$ + TT 58,8 $\mu\text{g}/\text{dose}$), com o Grupo 13 apresentando título de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa* 267% maior que o do controle, bem como entre o Grupo 9 e Grupo 14 (Bacterina seguido de Conjugado LPS-TT 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$), apresentando título 200% superior, 4 semanas após a imunização (Gráf. 8).

A análise dos Gráficos 5 a 8 indica que os maiores títulos de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa* foram obtidos no 1º protocolo, após a administração intraperitoneal de LPS 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$, LPS 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$ + TT 29,4 $\mu\text{g}/\text{dose}$, Conjugado LPS-TT 20 $\mu\text{g}/\text{dose}$, LPS 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$, LPS 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$ + TT 58,8 $\mu\text{g}/\text{dose}$ e Conjugado LPS-TT 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$, enquanto que o 2º protocolo, envolvendo a administração prévia de uma dose de Bacterina, seguida das mesmas doses de LPS, LPS+TT ou de Conjugado LPS-TT, resultaram em títulos menores. Porém, houve maior diferença estatisticamente significativa no 2º protocolo, quando comparamos os grupos controles e o grupo de Conjugado LPS-TT 40 $\mu\text{g}/\text{dose}$ (título 200% superior), sugerindo que a administração prévia de bacterina poderia influenciar em uma resposta de indução de anticorpos mais significativa. Não foi possível observar diferença no decaimento do título de anticorpos dos grupos ao longo das 16 semanas de observação e serão necessários estudos posteriores para o desenvolvimento de memória imunológica após a administração do Conjugado LPS-TT.

Vários estudos antigênicos apontam o LPS como a molécula mais eficiente (MIDWINTER et al., 1990; DÖRING apud VON SPECHT et al., 1996; DÖRING & PIER, 2007). Embora possua vantagens, a utilização de LPS em humanos deve ser cautelosa. Vacinas contendo LPS sem testes clínicos aprofundados podem ser tóxicas para humanos (DÖRING & PIER, 2007). PENNINGTON (1974) descreveu respostas febris em 20-40% em portadores de fibrose cística que receberam a Pseudogen®, uma vacina com LPS para *P. aeruginosa*. Convenientemente, os riscos do uso do LPS

podem ser revertidos: a toxicidade está diretamente relacionada com a porção do lipídeo A, e a extração desta região proporciona uma molécula com menores efeitos adversos. Outra estratégia, além da deslipidificação, seria a introdução da molécula em carreadores lipossomais, como descrevem BENNETH-GUERRERO (2000). Outro protótipo vacinal que considera o uso do LPS da *P. aeruginosa* é o PEV-01, que não atingiu níveis satisfatórios de proteção porque não protegeu contra todos os sorotipos LPS da espécie.

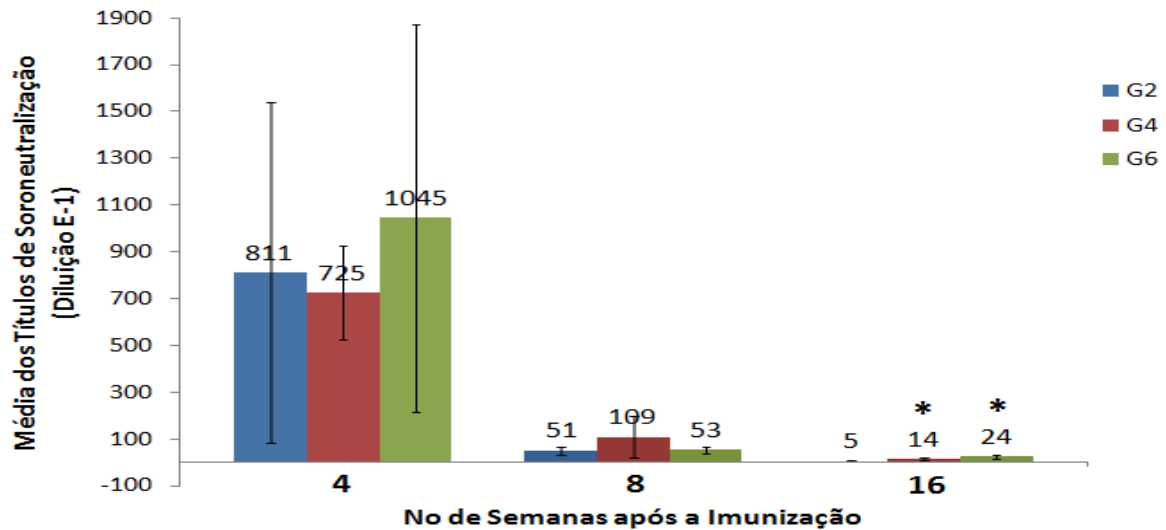


Figura 18 – Determinação dos títulos de soroneutralização de soros das amostras G2 (Controle LPS 20 µg/dose), G4 (Controle LPS 20 µg/dose + 29,4 µg/dose de TT) e G6 (Conjugado LPS-TT 20 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após imunização. * = estatisticamente diferente, em que $p=0,01$.

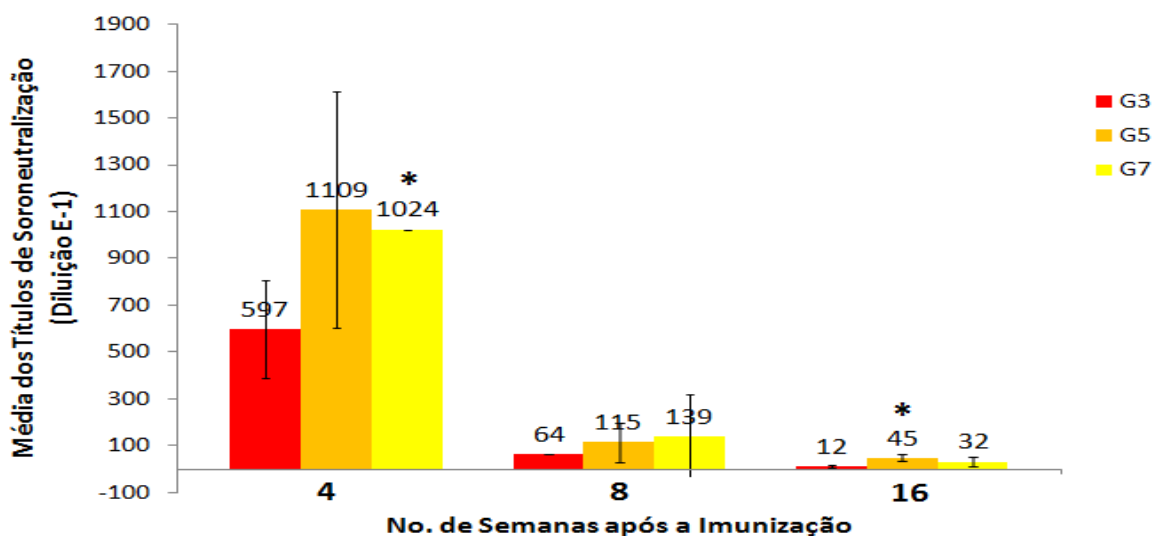


Figura 19 – Determinação dos títulos de soroneutralização de soros das amostras G3 (Controle LPS 40 µg/dose), G5 (Controle LPS 40 µg/dose + 58,8 µg/dose de TT) e G7 (Conjugado LPS-TT 40 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após a imunização. * = estatisticamente diferente, em que $p=0,01$.

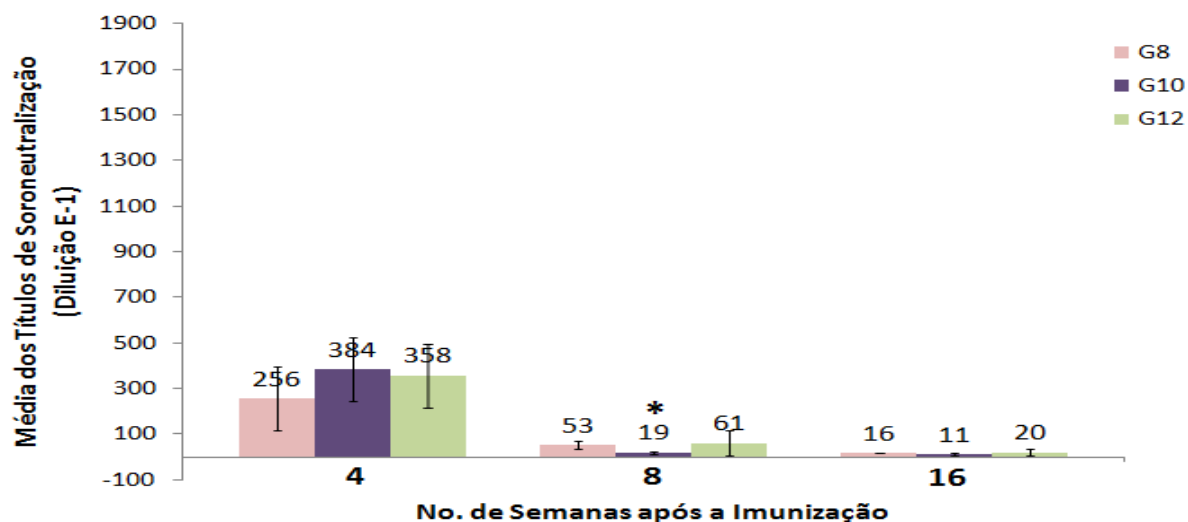


Figura 20 – Determinação dos títulos de soroneutralização de soros das amostras G8 (Controle Bacterina, seguida de LPS 20 µg/dose), G10 (Controle Bacterina, seguida de LPS 20 µg/dose + 29,4 µg/dose de TT) e G12 (Bacterina, seguida de Conjugado LPS-TT 20 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após a imunização. * = estatisticamente

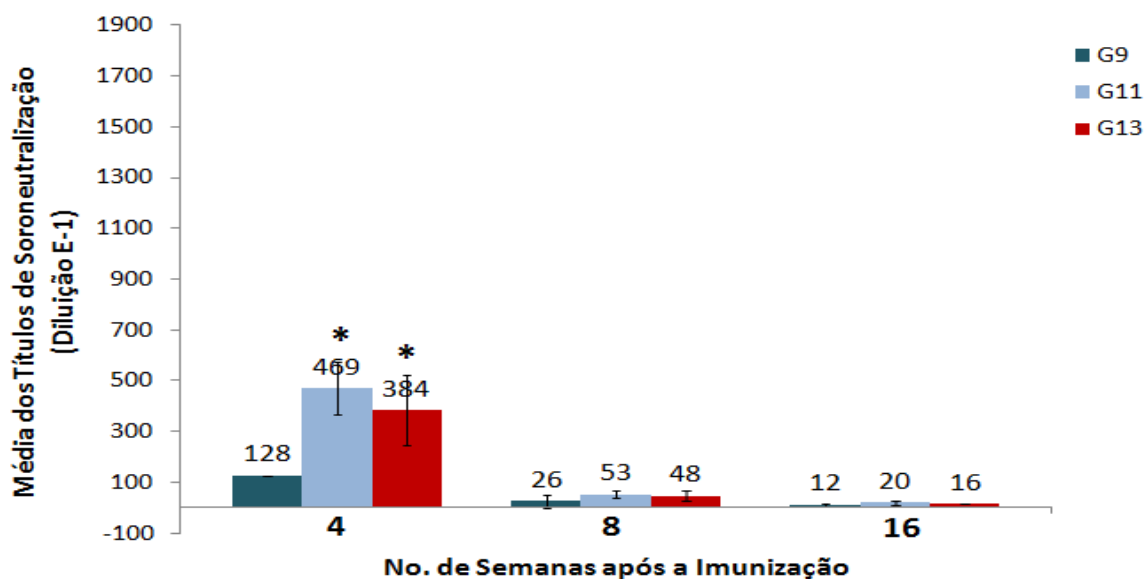


Figura 21 – Determinação dos títulos de soroneutralização de soros das amostras G9 (Controle Bacterina, seguida de LPS 40 µg/dose), G11 (Controle Bacterina, seguida de LPS 40 µg/dose + 58,8 µg/dose de TT) e G13 (Bacterina, seguida de Conjugado LPS-TT 40 µg/dose), todos adjuvados com Gel de Hidróxido de Alumínio, colhidos 4, 8 e 16 semanas após a imunização. * = estatisticamente diferente, em que $p=0,01$.

Embora estudos mais recentes considerem o uso de antígenos purificados de *P. aeruginosa*, como as proteínas OpR, Exotoxina A e alginato, a utilização de LPS ainda é interessante: a extração da molécula envolve baixo custo e pouco tempo. É uma das moléculas com maior estudo, possui imunogenicidade comprovada. O presente trabalho baseou-se em um trabalho anterior, que levou em consideração a utilização de LPS de *P. aeruginosa* conjugado à albumina bovina (BSA) (SANTOS, 2009). Os projetos apresentaram diferenças no protocolo de imunização, assim como na resposta

vacinal. O primeiro estudo, envolvendo BSA como proteína carreadora, seguiu um protocolo de hiperimunização, atingindo níveis de anticorpos abaixo do esperado. O protocolo de hiperimunização consiste em 3 vacinações por semana, por 3 semanas, e vacinações diárias na quarta semana. É possível que o contato excessivo com o antígeno tenha provocado efeito similar à tolerância imunológica (existem linfócitos específicos para combater o antígeno, mas o organismo não os recruta, ignorando o antígeno). Provavelmente o uso de albumina como carreadora contribuiu para o resultado: esta proteína possui regiões assinatura comuns a várias espécies de mamíferos. É possível que esta molécula tenha sido reconhecida como própria pelos modelos animais.

O Toxóide Tetânico, proteína utilizada neste trabalho, é uma proteína favorável para uso em vacinas conjugadas, devido às propriedades inflamatórias e imunogênicas. CRYZ *et al.* (1986) afirmam que a conjugação com toxóide tetânico torna uma vacina ainda mais eficiente, por conter dois antígenos protetores, ao invés de um.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo conjugar Toxóide Tetânico com o LPS de *Pseudomonas aeruginosa*, um dos antígenos de maior interesse no desenvolvimento de vacinas contra essa bactéria. Vários estudos consagram o LPS como antígeno mais eficiente de *P. aeruginosa*, e de fato, neste trabalho, produzimos um imunógeno capaz de eliciar resposta imune. Além disso, o processo de conjugação foi simples, rápido e barato. Estratégias de vacinação antipseudomonas são necessárias, devido ao número de pacientes com fibrose cística infectados com a bactéria.

- Houve 2,8% de rendimento no protocolo de extração de LPS. Este valor foi superior ao descrito por SANTOS (2009).

- A cromatografia de gel-permeação permitiu avaliar a formação de um imunoconjugado.

- Os imunoconjugados demonstraram valor imunogênico, e determinados grupos (como LPS-TT 40 µg/dose) demonstraram superioridade estatística, comparado ao controle.

Referências bibliográficas

AL-ZEER, M.; MASOUD, H.; LPS - based conjugate vaccines composed of O-polysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IATS 6 and 11 bound to a carrier protein. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 23, p.1541-1549, 2007.

BASU, B.; JHA, S.; MOSHAREF, H.; DAS, P. A simple protocol for direct reductive amination of aldehydes and ketones using potassium formate and catalytic palladium acetate. **Indian Association for the cultivation of science**, letter, 2002.

BAUMANN, U.; MANSOURI, E.; VON SPECHT, B.U. Recombinant OprF- OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Vaccine**, v. 22, p.840-847, 2004.

BENNETT-GUERRERO, E.; MCINTOSH, T.; BARCLAY, G.B.; SNYDER, D.S.; GIBBS, R.J.; MYTHEN, M.G.; POXTON, I.R. Preparation and preclinical evaluation of a liposomal complete-core lipopolisaccharide vaccine. **Infection and Immunity**, v.68, n.11, p.6202-6208, 2000.

BLEVES, S.; VIARRE, V.; SALACHA, R.; MICHEL, G.P.F.; FILLOUX. A protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.534-543, 2010.

BOBADILLA, J.L.; MACEK, M.J.; FINE, J.P.; FARREL, P.M. Cystic Fibrosis: a worldwide analysis of the CFTR mutations- correlation with the incidence data and application to screening. **Human Mutation**, v.19, p.575-606, 2002.

BRADFORD, M.M. A. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRITO, A.; LANDAETA, J.; ROLDÁN, Y. *et al.* Resistência da *Pseudomonas aeruginosa* a la gentamicina, tobramicina amikacina em Venezuela. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v.20, p.42-45, 2000.

CABRERA, O.; CUELLO, M.; SOTO, C.R. *et al.* New method for obtaining conjugated vaccines. **Vaccine**, v.24S2, p.76-78, 2006.

CACHIA, P.J.; HODGES, R.S. Synthetic peptide vaccine and antibody therapeutic development: prevention and treatment of *Pseudomonas aeruginosa*. **Biopolymers**, v.71, p.141-168, 2003.

CRIPPS, A.W.; PEEK, K.; DUNKLEY, M.; VENTO, K.; MARJASON, J.K.; MCINTYRE, M.E.; SIZER, P.; CROFT, D.; SEDLAK-WEINSTEIN, L. Safety and Immunogenicity of

an Oral Inactivated Whole-Cell *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine administered to Healthy Human Subjects. **Infection and Immunity**, v. 74, n.2, p.968-974, 2006.

CRYZ, JR.S.J.; SADOFF, J.C.; CROSS, A.S.; FURER, E. Safety and immunogenicity of a polyvalent *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 50 polysaccharide-toxin A conjugate vaccine effect of a booster dose on antibody levels in humans. **Infection Immunology**, v.56, p.1829-1830, 1989.

CRYZ, S.J.; SADOFF, J.C.; FÜRER, E. *Pseudomonas aeruginosa* Polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine: safety and immunogenicity in humans. **The journal of infectious diseases**, V.154, N.4, p.682-688, 1986.

CRYZ, J.R.S.J.; SADOFF, J.C.; FÜRER, E. Octavalent *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide - toxin A conjugate vaccine. **Microbiologic Pathology**, v.6, p.75-80, 1987.

CRYZ, JR.S.J.; LANG, A.; WEDGWOOD, J.; QUE, J.U.; FURER, E.; SCHAAD, U. Immunization of cystic fibrosis patients with a *Pseudomonas aeruginosa* O – polysaccharide - toxin A conjugate vaccine. **Behring Institute Mitt**, n. 98, p.345-349, 1997.

DÖRING, G. Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. **International Journal of Medical Microbiology**, V.300, p. 573-577, 2010.

DÖRING, G. Relevant issues in bacterial vaccine development for patients with cystic fibrosis. **Pediatric Pulmonology**, 2003.

DÖRING, G.; PIER, G.B. Vaccines and Immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v.26, p. 1011-1024, 2007. DÖRING, G.; PIER, G.B. Vaccines and Immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v.26, p.1011-1024, 2008.

DRISCOLL, J.A.; BRODY, S.L.; KOLLEF, M.H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, v.67, p.351-268, 2007.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A E SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n. 3, p. 350-356, 1956.

ENGEL, J.; BALACHANDRAN, P.; Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, p.61-66, 2009.

ESLOKA, J.; BLACK, S.; SHINEFIELD, H. Pneumococcal Conjugate Vaccines. In: Plotkin & Orenstein (Eds.). **Vaccines**, 4^a ed., p.589, 2004.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.; PSEUDOMONADALES. **In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v.2, p.323, 2009.

GOLDBERG, J.B. E PIER, G.B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. **Trends in Microbiology**, v.4, n.12, p.490-494, 1996.

GOTO, M.; SHIMADA, K.; SATO AYAKO; TAKAHASHI, E.; FUKASAWA, T.; TAKAHASHI, T.; OHKA, S.; TANIGUSHI, T.; HONDA, E.; NOMOTO, A.; OGURA. A rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse feces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification. **Journal of Microbiology Methods**, v.81, p.247-252, 2010.

FRASCH, C.E. Preparation of bacterial polysaccharide–protein conjugates: Analytical and manufacturing challenges. **Vaccines**, v. 46, p.6468-6470, 2009.

HERTAULT, B.; GENTINE, P.; THOMANN, J.S.; BAEHR, C.; FRISCH, B.; PONS, F. Design of a Liposomal Candidate Vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* and its evaluation in triggering systemic and lung mucosal immunity. **Pharmaceutical Research**, v.10, 2008.

HOLDER, I.A. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. **Vaccine**, n. 22, p.831-839, 2004.

JOHANSEN, H.K.; GOTZSHE, P.C.; Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. **The Cochrane library**, v.1,2009.

JOHANSEN, H.K.; ESPERSEN, F.; CRYZ, S.J. *et al.* Immunization with *Pseudomonas aeruginosa* vaccines and adjuvant can modulate the type of inflammatory response subsequent to infection. **Infection immunology**, v.62, p.3155,1994.

KASHEF,N.; BEHZADIAN-NEJAD, Q.; NAJAR-PEERAYEH, S.; MOUSAVI-HOSSEINI, K.; MOAZZENI, M.; DJAVID, G.E. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p.1441-1446, 2006.

KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, V.73, p.338-344, 2009.

KIM, D.K.; KIM, J.J.; KIM, J.H.; WOO, Y.M.; KIM, S.; YOON, D.W.; CHOI, C.S.; KIM, I.; PARK, W.J.; LEE, N.; JUNG, S.B.; AHN, B.Y.; NAM, S.W.; YOON, S.M.; CHOI, W.J. Comparison of two immunization schedules for a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane proteins vaccine in burn patients. **Vaccine**, v. 19, p. 1274-1283, 2001.

KNIREL, Y. Polysaccharide antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista de Microbiologia**, n. 17, p. 273-304, 1990.

LABORDE, H.F. E FAJARDO, C.L. Obtention and assay of rabbit anti-*Pseudomonas* serum. **Journal of Bacteriology**, v.98, n.3, p.992-995, 1969.

LANG, B. ALOIS; HORN, M.P.; IMBODEN, M.A.; ZUERCHER, A.W. Prophylaxis and therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and immunocompromised patients. **Vaccines**, v.22, p.44-48, 2004.

LEE, N.; JUNG, S.B.; AHN, B.Y.; KIM, Y.H.; KIM, J.J.; KIM, D.K.; KIM, I.S.; YOON, S.M.; NAM, S.W.; KIM, H.S.; PARK, W.J. Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. **Vaccines**, v.18, p.1952-1961, 2000.

LEPELLETIER, D.; CADY, A.; CAROFF, A.; MARRAILLAC, J.; REYNAUD, A.; LUCET, J.; CORVEC, S. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* gastrointestinal carriage among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.66, p.1-6, 2010.

LOGAN, C.; HABBINGTON, A.; LENNON, G.; CRONIN, F.; O'SULLIVAN, N. Evaluation of the efficacy of real-time polymerase chain reaction for the routine early detection of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis sputum and throat swab specimens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, p. 358-365, 2010.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. Imunofluorescência direta. In: *Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária*, **EMBRAPA Gado de corte**, p. 221-227, 2001.

MAKIN, S.A ; BEVERIDGE, T.G. ; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ceases to express serotype-specific lipopolisaccharide at 45°C. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.3350-3352, 1996.

MARTINS, S.T. ; MOREIRA, M. ; FURTADO, G.H.C. *et al.* Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.331-334, 2004.

MIDWINTER, A.; FAINE, S.; ADLER, B. Vaccination of mice with lipopolisaccharide(LPS) and LPS-derived immunoconjugates from *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology**, v.33, p. 199-204, 1990.

MIDWINTER, A.; VINH, T.; FAINE, S.; ADLER, B. Characterization of an antigenic oligosaccharide from *Leptospira interrogans* Serovar *pomona* and its role in immunity. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 5477-5482, 1994.

MILLER, S.I.; ERNST, R.K.; BADER, M.W. LPS, TLR4 and Infectious disease diversity. **Nature reviews microbiology**, v. 3, p. 36-46, 2005.

O'TOOLE, G.A.; STEWART, P.S. Biofilm strikes back. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 1378-1379, 2005.

OTTO-BIER. Bacteriologia e Imunologia, 11ª edição. **Editora Melhoramentos**, 1970.

PALLERONI, N.J. *Pseudomonas*. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2, p. 324, 2009.

PIER, G.B. Promises and pitfalls of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide as a vaccine antigen. **Carbohydrate Research**, v.338, p.2549-2556, 2003.

PENNINGTON, J.E. Preliminary investigation of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine with leukemia and cystic fibrosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v.130, p.159-162, 1974.

PRESCOTT, L.M.; HARLEY, J.P.; KLEIN, D.A. Introduction to Microbiology. In: **Prescott's Microbiology**, 5th Ed., p.58, 2005.

PLOTKIN & ORENSTEIN, Vaccines, **Saunders**, 4^a edição, 2004.

QUIN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Burkholderia*. In: **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**, Porto Alegre: Artmed, p. 131-134, 2005.

ROSA, S. Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. **Revista de Microbiologia**, v.1, p.97-109, 1970.

SAHA, S. ; TAKESHITA, F. ; SASAKI, S. ; MATSUDA, T. ; TANAKA, T. ; TOZUKA, M. ; TAKASE, K. ; MATSUMOTO, T. ; OKUDA, K. ; ISHII, N. Multivalent DNA vaccine protects mice against pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v.24, p.6240-6249, 2006.

SANTOS, R.R. Desenvolvimento e estudo in vivo de uma vacina conjugada contra *Pseudomonas aeruginosa*, 2009.

SCHOBERT, M. ; JAHN, D. ; Anaerobic physiology of *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.549-556, 2010.

STACZEK, J. ; BENDAHMANE, M. ; GILLELAND, L.B. ; BEACHY, R.N. ; GILLELAND, H.E.J. Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa*. **Vaccine**, v.18, p.2266-2274, 2000.

SHEN, X.; LAGERGARD, T.; YANG, Y. *et al.* Preparation and preclinical evaluation of experimental group B streptococcus type III polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine for intranasal immunization. **Vaccine**, v.19, p.850-861, 2001.

SUÀREZ, C. ; PEÑA, C. ; GAVALDA, L. ; TUBAU, F. ; MANZUR, A. ; DOMINGUEZ, M.A. ; PUJOL, M. ; GUDIOL, F. ; ARIZA, J. **INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES**, v. 14, P. 73-78, 2010.

TARANEJOO, S. ; JANMALEKI, M. ; RAFIENIA, M. ; KAMALI, M. ; MANSOURI, M. Chitosan microparticles loaded with exotoxin A subunit for intranasal vaccination

against *Pseudomonas aeruginosa*: an in vitro study. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1854-1861, 2010.

TIZARD, I.R. *Veterinary Immunology: an Introduction*, 4th ed., p.498, 1992.

VOGEL, F.R.; HEM, S. Immunologic Adjuvants. In: Plotkin & Orenstein (Eds.). **Vaccines**, 4th ed., p.69-90, 2004.

WESTPHAL, O.; JANN, K. Bacterial Lipopolysaccharides – Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. **Methods in Carbohydrate Chemistry**, v.5, p.83-91, 1965.

WOLF, P.; ELSÄSSER-BEILE, U. Pseudomonas exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. **International Journal of Medical Microbiology**, v.299, p.161-176, 2009.

YOKOTA, S. Identification of outer membrane proteins as target antigens of *Pseudomonas aeruginosa* Homma serotype M. **Clinical Diagnostic & Laboratory Immunology**, v.2, p.747-752, 1995.

YOUSEFI, S.; FARAJNIA, S.; NAHAEI, M.R.; AKHI, M.T.; GHOTASLOU, R.; SOROUSH, M.H.; NAGHILI, B.; JAZANI, N.H. Detection of metallo- β -lactamase-encoding genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in northwest of Iran. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, p. 322-325, 2010.

ZUERCHER, A.W.; HORN, M.P.; WU, H. *et al.* Colocar todos os autores Intranasal immunisation with conjugate vaccine protects mice from systemic and respiratory tract infection with *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v.24, p.4333-4342, 2006.

ANEXO 1 – Certificado de aprovação do CEEA-UFPR



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEA)



Nº 416

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.103208/2009-58

APROVADO: 01/12/2009 – R.O. 11/2009

TÍTULO: Desenvolvimento de vacina bacteriana conjugada contra *Pseudomonas aeruginosa*

AUTORES: Lucy Ono, Bruno Gavinho, Adriana Simões Bravos, Rosangela Rodrigues dos Santos, Luiz Felipe Caron, Maria Rita Sierakowski

DEPARTAMENTO: Patologia Básica


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador do CEEA