

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA RIGO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOLÓGICA DE
LIPOPOLISSACARÍDEOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Salmonella enterica*
SOROTIPO ENTERITIDIS

CURITIBA

2016

FERNANDA RIGO

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E IMUNOLÓGICA DE
LIPOPOLISSACARÍDEOS DE DIFERENTES CEPAS DE *Salmonella enterica*
SOROTIPO ENTERITIDIS

Monografia apresentada à disciplina de Estágio Supervisionado em Biologia, como requisito parcial à conclusão do Bacharelado em Ciências Biológicas, setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki

Co-orientador: Dr. Max Ingberman

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que mesmo geograficamente distantes sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos. Obrigada pelo apoio incondicional ao longo de toda a graduação!

Ao meu querido Valentin, obrigada por estar ao meu lado todos os dias, pelo apoio e estímulos, que foram essenciais minha formação acadêmica e humana. Com você, eu sou uma pessoa melhor. Obrigada pela companhia agradável todos os dias. Te amo!

Ao Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sasaki, por aceitar me orientar neste projeto, mesmo conhecendo minhas dificuldades na bioquímica estrutural.

Ao Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata, pela confiança de me aceitar como aluna de iniciação científica, mesmo que em 2012 eu ainda tivesse tão pouca experiência. Obrigada também por aceitar ser parte da banca avaliadora do trabalho escrito.

Ao Max Ingberman, por toda a paciência de ter me ensinado diferentes técnicas e por ter contribuído imensamente com a minha formação. Agradeço também pelas correções de última hora, que foram essências para a conclusão desta monografia. Muito obrigada!

À Imunova Análises Biológicas, por todas as oportunidades e pelo estágio que hoje tornou-se um emprego. Sou uma pessoa muito privilegiada, pois a relação de aprendizado que construímos juntos nesses quase 5 anos foi (e é) essencial para minha formação acadêmica e pessoal. Obrigada pela confiança!

À Prof. Dr. Lia S. Nakao, pela oportunidade de trabalhar com uma técnica tão especial quanto o HPLC. Obrigada pela confiança de o deixar alguns meses comigo e por todos os ensinamentos!

À toda a equipe, atual e dos últimos tempos, da Imunova Análises Biológicas, Breno, Tobias, Max, Isabela, Daniella, Marina, Clarissa e Celso.

À toda equipe do Laboratório de Neurobiologia e Patologia Redox.

Agradeço a Ana (técnica do RMN) e Lauro, pela ajuda e compreensão na fase final deste trabalho.

Às minhas colegas de casa, Dani e Maysa, pela convivência e pela amizade.

A Priscila e Tiago Antônio, meus amigos, pelo apoio nesta jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica, pessoal e para a realização deste projeto. Obrigada!

A UFPR, ao FINEP, à CAPES e ao CNPq pelo financiamento de parte deste projeto e a Imunova Análises Biológicas pelos investimentos financeiros para desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

Salmonella Enteritidis (SE) é uma bactéria gram-negativa responsável por doenças infecciosas em humanos e outros animais. Lipopolissacarídeos (LPS) são componentes estruturais essenciais da membrana externa de bactérias gram-negativas. O LPS é formado por uma porção lipídica A (LipA) ancorada à membrana externa e um núcleo de polissacarídeos com número variado de unidades de repetição de antígeno-O (OAg) exposto na superfície da membrana externa da parede celular bacteriana. O LPS de SE corresponde a um componente essencial para infecção de tecidos do organismo hospedeiro. Para prevenção de infecções pela SE, as aves são vacinadas com *Salmonella* Enteritidis atenuada. Entretanto, a identidade entre as cepas utilizadas em vacinas e as encontradas em campo ainda é pouco estudada. Os objetivos deste trabalho foram a purificação, fracionamento e caracterização estrutural e imunológica dos LPS purificados de três cepas de SE, uma cepa vacinal atenuada, uma cepa ATCC (ATCC®- BAA-1587™) e uma cepa isolada de campo. Os imunoensaios demonstraram que os anticorpos IgY produzidos por aves vacinadas com a cepa 'Vacinal' não foram capazes de reconhecer o LPS ATCC, apenas reconheceu os LPS Campo e Vacinal, tanto sua fração LipA quanto a fração OAg. Os ensaios estruturais demonstraram a existência de variações importantes relacionadas com a composição de carboidratos da fração polissacarídica (OAg) e provavelmente ao tamanho de cadeia dos ácidos graxos do lipídeo A. Entretanto, as análises estruturais realizados não foram suficientes para uma completa análise das variações entre os LPS de diferentes cepas. Ainda são necessários outros estudos estruturais para melhor caracterizar as diferenças no reconhecimento do anticorpo policlonal.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeos – LPS – *Salmonella* – Enteritidis – IgY

ABSTRACT

Salmonella Enteritidis (SE) is a gram-negative bacteria responsible for human and animal infectious diseases. Lipopolysaccharides (LPS) are essential components of gram-negative bacteria outer membrane. LPS consists of a lipid A (LipA) fraction anchored to the outer membrane and a core of polysaccharides with varying numbers of antigen-O (OAg) exposed on the surface of outer membrane of bacterial cell wall. LPS is essential for infection of host tissues. To prevent SE infection, chickens are vaccinated with live attenuated *Salmonella* Enteritidis. However, the identity between strains used as vaccines and strains found in field is not well established. The objectives of this study were structural and immunological characterization of LPS purified from three strains of SE; a strain from attenuated vaccine; an ATCC strain (ATCC®- BAA-1587[™]) and a field strain. The immunoassays showed that the antibodies produced by chickens immunized with vaccinal strain were unable to recognize the LPS from ATCC strain, only recognizing the LPS from vaccinal and field strain in both LipA and OAg fractions. Structural studies showed a variation related to the carbohydrate composition of the OAg fraction and the chain length of the fatty acids of lipid A. However, this structural analysis was not sufficient for a complete characterization of changes between the LPS from different strains. Other structural studies to better characterize the differences in the recognition of the polyclonal antibody and their relationships with LPS structure are still needed.

Keywords: Lipopolysaccharides – LPS – *Salmonella* – Enteritidis – IgY

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

API - Atmospheric pressure ionization

CD14 – Correceptor de LPS

DTA – Doenças transmitidas por alimentos

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

g – Unidade de força G

HRP – Horseradish peroxidase

IgY – Imunoglobulina Y, produzida por aves.

IL-1 β – Interleucina tipo 1 β

IL-6 – Interleucina tipo 6

Kdo – ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico, resíduo

LBP – Proteína de ligação ao LPS

LipA – lipídeo A

LPS – Lipopolissacarídeo (s)

O/N – do inglês, *overnight* (aproximadamente 16 horas)

OAg – Antígeno O

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PMNs – Macrófagos polimorfonucleares

Ppm – Partículas por milhão

RMN – Ressonância magnética nuclear

rpm – Unidade de rotações por minuto

SDS-PAGE - do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SE – Salmonella enterica Enteritidis

SN – Sobrenadante

TA – Temperatura ambiente

TLR – Receptores toll-like

TMB – 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

TMSP-D4 - 3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionic acid

UDP-GlcNAc – Uridina-difosfato-N-acetilglucosamina

UHPLC-EM - Cromatografia líquida ultra alta eficiência acoplada a espectrometria de massa.

WB – Western Blot

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE ENTEROBACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS..... | 13 |
| FIGURA 2. ESTRUTURA GERAL DO LIPOPOLISSACARÍDEO DE ENTEROBACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS..... | 15 |
| FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DO lipídeo A. | 16 |
| FIGURA 4. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA DOS EXTRATOS BACTERIANOS TOTAIS, LPS PURIFICADOS E FRAÇÕES DAS CEPAS VACINAL, CAMPO E ATCC. V: Vacinal. A: ATCC e C: Campo. MW: Marcador de peso molecular, em kDa. | 32 |
| FIGURA 5. WESTERN BLOT DOS EXTRATOS BACTERIANOS TOTAIS, LPS PURIFICADOS E FRAÇÕES DAS CEPAS VACINAL, CAMPO E ATCC. | 33 |
| FIGURA 6. ELISA INDIRETO DE DETECÇÃO DE LPS VACINAL E CAMPO POR ANTICORPOS POLICLONAIIS IgY. | 34 |
| FIGURA 7. ELISA INDIRETO DE DETECÇÃO DE LPS VACINAL E SUAS FRAÇÕES POR ANTICORPOS POLICLONAIIS IgY. | 35 |
| FIGURA 8. ELISA INDIRETO DE DETECÇÃO DE LPS CAMPO E SUAS FRAÇÕES POR ANTICORPOS POLICLONAIIS IgY..... | 35 |
| FIGURA 9. ESPECTRO DE UPLC-MS DAS FRAÇÕES ANTÍGENO O (OAg) DOS LPS DE <i>Salmonella enterica</i> ENTERITIDIS..... | 37 |
| FIGURA 10. ESPECTRO DE UPLC-MS DAS FRAÇÕES lipídeo A (LipA) DOS LPS DE <i>Salmonella enterica</i> ENTERITIDIS..... | 38 |
| FIGURA 11. DESVIOS QUÍMICOS TÍPICOS DE SINAIS DE INTERAÇÃO ENTRE CARBONOS E PRÓTONS EM UM ESPECTRO $^1\text{H};^{13}\text{C}$ -RMN- HSQC-DEPT..... | 39 |
| FIGURA 12. ESPECTRO ^1H - ^{13}C -RMN- HSQC-DEPT DO LPS ATCC. | 40 |
| FIGURA 13. ESPECTRO ^1H - ^{13}C -RMN - HSQC-DEPT DO LPS VACINAL..... | 40 |
| FIGURA 14. ESPECTRO ^1H - ^{13}C -RMN - HSQC-DEPT DO LPS CAMPO. | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1. RENDIMENTO DAS PURIFICAÇÕES DE LPS DE <i>Salmonella enterica</i> ENTERITIDIS. | 31 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 10 |
| 2.1. <i>SALMONELLA ENTERICA</i> ENTERITIDIS | 10 |
| 2.2. AVICULTURA E SALMONELOSES | 10 |
| 2.3. ENDOTOXINAS E LIPOPOLISSACARÍDEOS | 12 |
| 2.4. ESTRUTURA DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS | 14 |
| 2.4.1. <i>Domínio lipídeo A</i> | 15 |
| 2.4.2. <i>Domínio Polissacarídeo</i> | 16 |
| 2.4.2.1. Núcleo (<i>core</i>) polissacarídeo | 16 |
| 2.4.2.2. Cadeia específica O ou Antígeno-O | 17 |
| 2.5. BIOSÍNTESE DOS LIPOPOLISSACARÍDEOS | 17 |
| 2.6. LPS DE <i>SALMONELLA</i> | 18 |
| 2.7. LPS E SISTEMA IMUNOLÓGICO | 19 |
| 3. OBJETIVOS | 21 |
| 3.1. OBJETIVOS GERAIS | 21 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 21 |
| 4. METODOLOGIAS | 22 |
| 4.1. CEPAS DE <i>S. ENTERITIDIS</i> | 22 |
| 4.2. ANTICORPO IGY ANTI- <i>SALMONELLA ENTERICA</i> ENTERITIDIS | 22 |
| 4.3. PURIFICAÇÃO DE LIPOPOLISSACARÍDEOS | 23 |
| 4.4. EXTRATO BACTERIANO TOTAL | 24 |
| 4.5. HIDRÓLISE PARCIAL DO LPS | 24 |
| 4.6. SDS-PAGE E COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA | 25 |
| 4.7. WESTERN BLOT | 26 |
| 4.8. ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY - ELISA | 27 |
| 4.9. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA | 28 |
| 4.10. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR | 29 |
| 4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS RESULTADOS | 30 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 31 |
| 5.1. PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DE LPS | 31 |
| 5.2. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA | 31 |
| 5.3. IMUNOENSAIOS | 32 |
| 5.3.1. <i>Western Blot (WB)</i> | 33 |
| 5.3.2. <i>ELISA</i> | 33 |
| 5.4. ENSAIOS ESTRUTURAIS | 36 |
| 5.4.1. <i>Espectrometria de massas</i> | 36 |
| 5.4.2. <i>Espectrometria de RMN</i> | 39 |
| 6. CONCLUSÃO | 42 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 43 |

1. INTRODUÇÃO

Nas células de bactérias gram-negativas, a parede celular é formada por uma fina camada de peptídeoglicanos e uma membrana lipídica externa, decorada por lipopolissacarídeos em sua face externa, que contribui para a integridade das células bacterianas, além de ser essencial para função de barreira protetora da membrana externa da parede celular, principalmente contra agentes nocivos (REECE et al., 2014; ZARIRI e VAN DER LEY, 2015).

As principais formas de LPS conhecidas podem ser subdivididas em três partes: o lipídeo A, o núcleo polissacarídeo e o antígeno O. O lipídeo fA representa o componente hidrofóbico do LPS, e está ancorado na camada externa da membrana externa da parede celular, enquanto o núcleo polissacarídeo e as repetições de antígeno O estão dispostos na superfície da parede celular bacteriana (ALEXANDER e RIETSCHHEL, 2001; WANG e QUINN, 2010).

Salmonella é um gênero de bactérias gram-negativas da família Enterobacteriaceae, com duas espécies *S. bongori* e *S. enterica*. *Salmonella enterica* é uma espécie anaeróbica intracelular facultativa, responsável por mais de 1,3 bilhões de casos de internação por salmoneloses. Mais de 2500 cepas já foram identificadas nas seis subespécies de *S. enterica*: *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* e *enterica* (COBURN et al., 2007; DUNKLEY et al., 2009).

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis, ou, de forma simplificada, *Salmonella* Enteritidis (SE) é o segundo sorotipo mais isolado em amostras de humanos contaminados, sendo responsável por cerca de 14,5% dos casos de gastroenterites geradas por *Salmonella* (CDC, 2015). A principal fonte de contaminação por *S. Enteritidis* ocorre através de carne bovina crua, produtos lácteos contaminados e principalmente ovos e carne de aves crus (DUNKLEY et al., 2009; FOLEY et al., 2011).

Infecções por *Salmonella* em aves com menos de 14 dias de idade, podem causar surtos agudos com sinais clínicos característicos, incluindo diarreia e altos níveis de mortalidade. Entretanto, em aves com mais de duas semanas de idade, a infecção intestinal é assintomática (SUZUKI, 1994), tornando a ave um meio de difusão vertical e horizontal da bactéria. Além disso, quando a infecção ocorre após

14 dias de idade, a *Salmonella* é capaz de invadir os tecidos da ave e colonizar os ovos. *S. Enteritidis*, em particular, apresenta alta habilidade de colonizar o epitélio vaginal de aves poedeiras, em comparação com outros sorotipos (DUNKLEY et al., 2009; MIZUMOTO et al., 2005).

A elucidação da estrutura do LPS de *S. Enteritidis* e da sua relação com a resposta imunológica produzida por aves infectadas por diferentes cepas é um passo importante na pesquisa e desenvolvimento de novas abordagens que garantam segurança alimentar e melhor qualidade de frangos de corte, um dos principais alimentos consumidos pelos brasileiros e o quinto produto mais relevante para exportações na balança comercial do país.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Salmonella enterica* Enteritidis

As diferentes subespécies de *S. enterica* podem ser adquiridas de forma oral, através de alimentos ou água contaminados e podem causar uma das seguintes síndromes: febre tifoide, gastroenterite (diarreia), bacteremia e síndrome assintomática crônica. A febre tifoide e gastroenterite (diarreia) são as síndromes mais comuns associadas a infecções com *S. enterica* e envolvem processos patogênicos relacionados a inflamação. A manifestação das diferentes síndromes depende da susceptibilidade do hospedeiro e da virulência da cepa de *S. enterica*. A habilidade de várias cepas de *S. enterica* causarem doenças intestinais está correlacionado com a habilidade de atrair macrófagos polimorfonucleares (PMNs) através da monocamada de células do cólon T84, sem necessariamente requerer invasão epitelial (COBURN et al., 2007).

Salmonella enterica subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis, ou, de forma simplificada, *Salmonella* Enteritidis (SE) é o segundo sorotipo mais isolado em amostras de humanos contaminados, sendo responsável por cerca de 14,5% dos casos de gastroenterites geradas por *Salmonella* (CDC, 2011; COBURN et al., 2007). A principal fonte de contaminação por *S. Enteritidis* ocorre através de carne bovina crua, produtos lácteos contaminados e principalmente ovos e carne de aves crus (DUNKLEY et al., 2009; FOLEY et al., 2011).

2.2. Avicultura e Salmoneloses.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil, nas últimas três décadas, a avicultura tem expandido seus horizontes a passos largos, tornando o Brasil o terceiro maior produtor de frangos em todo o mundo e sua produção alcança 142 países em todos os continentes (MAPA, 2016).

No Brasil, em 2015, foram produzidos 5,3 milhões de frangos de corte, dos quais 32,05% foram produzidos pelo Estado do Paraná, sendo este o maior produtor e exportador de frangos no Brasil, e que, em 2015 abateu 3000 aves por minuto e

faturou US\$ 2,3 bilhões com exportações e mercado interno (AVICULTURA PARANÁ, 2016; PORTAL DO AGRONEGÓCIO, 2016).

Infecções por *Salmonella* em aves com menos de 14 dias de idade, podem causar surtos agudos com sinais clínicos característicos, incluindo diarreia e altos níveis de mortalidade. Entretanto, em aves com mais de duas semanas de idade, a infecção intestinal é assintomática (SUZUKI, 1994), tornando a ave um meio de difusão vertical e horizontal da bactéria. Além disso, quando a infecção ocorre após 14 dias de idade, a *Salmonella* é capaz de invadir os tecidos da ave e colonizar os ovos. *S. Enteritidis*, em particular, apresenta alta habilidade de colonizar o epitélio vaginal de aves poedeiras, em comparação com outros sorotipos (DUNKLEY et al., 2009; MIZUMOTO et al., 2005).

Devido a susceptibilidade das aves de corte a infecções por *Salmonella Enteritidis*, usualmente as aves entram em um programa de vacinação. Vacinas específicas para sorotipos mais comuns no campo tem sido mais utilizada, com resultados promissores no que se refere a redução da transmissão vertical (matriz para pintinho). As vacinas mais comuns são produzidas com bactérias inativadas (por agentes químicos) ou utilizando cepas atenuadas e tem o objetivo de induzir a resposta humoral no animal vacinado, sem induzir a imunidade celular, prevenindo a colonização da *Salmonella* na mucosa intestinal. A imunidade humoral é capaz de reduzir consideravelmente a colonização de órgãos internos e aparelho reprodutivo, controlando a transferência vertical, via ovo. Aves vacinadas produzem anticorpos circulantes que podem ser secretados no lúmen do intestino e anticorpos específicos presentes nos ovos, o IgY (SONCINI, 2000).

Salmoneloses representam problemas de saúde animal e também um assunto de saúde pública, uma vez que diversas cepas de *Salmonella*, incluindo *S. Enteritidis* são patógenos humanos, representando um risco a saúde. Os sintomas de salmonelose em humanos são similares aos sintomas de intoxicação alimentar, incluindo diarreia e gastroenterites (LUTFUL-KABIR, 2010).

Entre 1999 e 2014, foram notificados ao Ministério da Saúde 450 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), dos quais 42,5% tiveram como agente etiológico bactérias do gênero *Salmonella*, frequência muito provavelmente subestimada (PORTAL BRASIL, 2015).

2.3. Endotoxinas e Lipopolissacarídeos

Endotoxinas são, de forma genérica, macromoléculas que compõem integralmente a membrana externa de bactérias gram-negativas que, na forma de antígeno de superfície ou circulante, desempenham papel importante na modulação do sistema imunológico do organismo hospedeiro, podendo contribuir para a manifestação tóxica ou choque séptico em infecções severas (ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001).

Em função da relação das endotoxinas com a saúde humana e animal, estas macromoléculas são alvo de estudos científicos há mais de um século. No início dos estudos, dois pesquisadores, Robert Koch e Richard Pfeiffer, destacaram-se pelos seus esforços para caracterização bioquímica e imunológica das endotoxinas (RIETSCHEL e CAVAILLON, 2003).

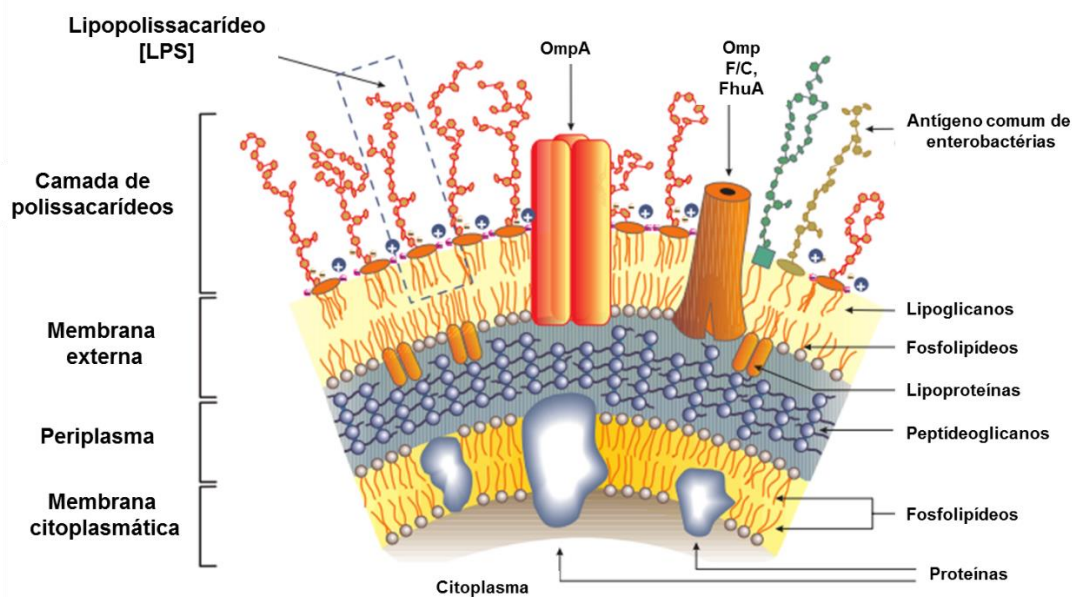
Richard Pfeiffer (1858 – 1945) foi o primeiro a descrever e caracterizar endotoxinas. Em colaboração e orientação de Robert Koch (1843 – 1910), no Instituto de Doenças Infecciosas de Berlin, Pfeiffer estudou os efeitos de *Vibrio cholerae* lisada por calor, e identificou moléculas resistentes ao calor capazes de induzir reações associadas a choque tóxico em cobaias. Com estes resultados, Pfeiffer postulou que este agente tóxico se localizava dentro da célula bacteriana e o identificou como endotoxina (ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001; PFEIFFER, 1892). Pfeiffer, entretanto, não foi perspicaz na descrição da orientação das endotoxinas na estrutura celular bacteriana, uma vez que hoje sabemos que estão ancoradas a membrana externa da parede celular, em bactérias gram-negativas. As respostas biológicas que Pfeiffer estudou em cobaias, também foram observadas em outros animais de experimentação (RIETSCHEL et al., 1996) e em humanos, nos tratamentos experimentais procedidos por Willian Coley (1862–1936), que utilizava injeções contendo misturas de bactérias gram-negativas e gram-positivas (“toxinas de Coley”) para tratamento de sarcoma inoperável. Esta forma de vacinação induzia regressão dos tumores, mas também desencadeava febres altas e reações de choque tóxico (COLEY, 1910).

Os principais efeitos observados e correlacionados às endotoxinas são, de fato, relacionados diretamente a moléculas presentes na parede celular bacteriana,

que recebem o nome de lipopolissacarídeos (LPS), devido a sua composição. Em muitas referências, endotoxinas e LPS são consideradas como sinônimos, muito embora o termo *endotoxina* se refira preferencialmente ao LPS que induz ativação da resposta imunológica inata em espécies de mamíferos. Alguns autores, ainda, identificam como endotoxina uma região específica da molécula de LPS, o lipídeo A (ALEXANDER e RIETSCHER, 2001; RAETZ e WHITFIELD, 2002).

Nas bactérias gram-negativas, a parede celular é formada por uma fina camada de peptídeoglicanos e uma membrana lipídica externa, decorada por lipopolissacarídeos (LPS) em sua face externa (FIGURA 01) (REECE et al., 2014).

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PAREDE CELULAR DE ENTEROBACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.



FONTE: Adaptado de Alexander e Rietschel (2001).

As moléculas de LPS contribuem para a integridade das células bacterianas, além de ser essencial para função de barreira protetora da membrana externa da parede celular, principalmente contra agentes nocivos à própria bactéria (ZARIRI e Van der LEY, 2015). O LPS está presente em quase todas as bactérias gram-negativas, incluindo bactérias comensais e patógenos humanos como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella*

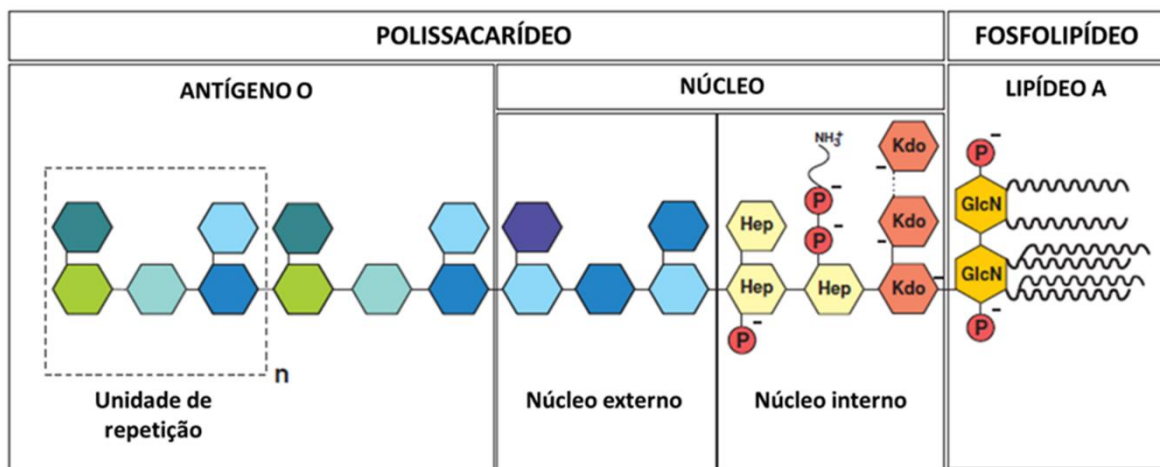
pertussis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila* e *Chlamydia trachomatis* (ALEXANDER e RIETSCHEL, 2001). O único grupo reportado de bactérias gram-negativas que não produzem LPS são as bactérias do gênero *Sphingomonas*, que produz glicosíngolipídios (KAWAHARA et al., 1991).

O LPS é um componente estrutural da parede celular bacteriana, portanto, é sintetizado constitutivamente pela bactéria, mas geralmente não é secretado. Entretanto, durante o processo de divisão celular, pequenas quantidades de LPS podem ser liberadas e no processo de morte celular, enormes quantidades de LPS são liberadas, principalmente quando a morte bacteriana é induzida por antibióticos, fagocitose ou pela ação do sistema complemento. O LPS liberado pode agir de forma protetora, ao estimular o sistema imunológico, desde que liberado em baixas quantidades. Em altas quantidades, entretanto, podem causar febre alta, aumento do débito cardíaco, e choque séptico, falha renal e hepática, coagulação intravascular, e reações inflamatórias sistêmicas, levando o indivíduo a morte (CAROFF e KARIBIAN, 2003).

2.4. Estrutura dos lipopolissacarídeos

Os estudos estruturais do LPS tiveram início nas décadas de 1940 e 1950, após o desenvolvimento de técnicas eficientes de purificação, como a metodologia desenvolvida por Otto Westphal, Otto Luderitz e Fritz Bister, que ainda é utilizada atualmente. Os primeiros LPS que tiveram suas estruturas elucidadas foram purificados de *E. coli* e *S. enterica*, devido a sua relevância na medicina veterinária e saúde humana (CAROFF e KARIBIAN, 2003). Apesar de apresentarem uma estrutura comum (ou genérica), a estrutura molecular do LPS de diferentes bactérias apresenta enorme variedade, principalmente quanto ao tamanho e composição da cadeia polissacarídica, e esta variabilidade está associada a virulência bacteriana, que difere muito entre espécies de um mesmo gênero e até mesmo entre cepas da mesma espécie (CAROFF e KARIBIAN, 2003; WANG e QUINN, 2010).

FIGURA 2. ESTRUTURA GERAL DO LIPOPOLISSACARÍDEO DE ENTEROBACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.



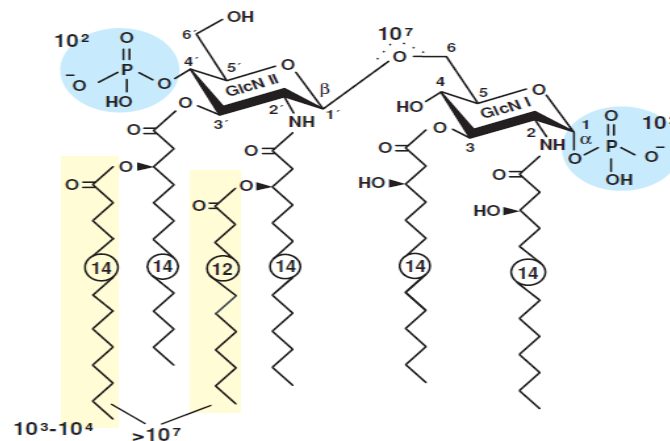
FONTE: Adaptado de Alexander e Rietschel (2001)

A molécula genérica do LPS tem estrutura assimétrica que pode ser dividida em dois domínios, o lipídeo A e o polissacarídeo, sendo este dividido em região nuclear e cadeia específica O, também conhecida como antígeno O (OAg). O lipídeo A representa o componente hidrofóbico do LPS, que o ancora na camada externa da membrana externa da parede celular, enquanto o polissacarídeo está exposto na superfície da parede celular bacteriana (FIGURA 02) (ALEXANDER e RIETSCHER, 2001; HOLST et al., 1996; WANG e QUINN (2010).

2.4.1. Domínio lipídeo A

O lipídeo A (LipA) é a porção que mantém o LPS ancorado na membrana externa da parede celular bacteriana e corresponde à região mais conservada da molécula total de LPS. É geralmente composto por um arcabouço formado por um dissacarídeo de 1,6- β -D-Glucosamina com um grupo fosfato ligado à posição 1 e 1', onde estão ligados quatro resíduos de β -3-hidroximiristato, nas posições 2, 3, 2' e 3'. Os resíduos podem ser esterificados com outros grupos acil, com 12 ou 14 carbonos, que podem ser resíduos de laureato e/ou miristato. Na molécula completa, a região polissacarídica está ligada a hidroxila primária, na posição C6' da glucosamina distal (FIGURA 3) (CAROFF e KARIBIAN,2003; RAETZ e WHITFIELD, 2002; WANG e QUINN, 2010).

FIGURA 3. ESTRUTURA QUÍMICA GERAL DO lipídeo A.



FONTE: Adaptado de ALEXANDER e RIETSCHER, 2001 e BRADE et al., 1999.

Apesar do seu grau de conservação, diversos estudos apontam que o lipídeo A pode sofrer mudanças adaptativas e dinâmicas na sua estrutura química, em resposta ao crescimento em condições não ideais. Como por exemplo, a deficiência de Magnésio leva a um aumento na modificação nos fosfatos do esqueleto do lipídeo A. Modificações, estas dependentes do sistema regulatório de virulência denominado PhoP/PhoQ, relacionado a resistência fagolisossomal (GUO et al., 1997). Alterações dinâmicas na posição dos grupos fosfato e acetilação do lipídeo A já foram descritas para bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de pacientes com fibrose cística (ERNST et al., 1999). O potencial endotóxico do LPS é dependente da conformação específica do lipídeo A (OSTRO e SILVERMAN, 1988). Estudos clássicos costumam associar ao LipA os efeitos gerados pelo LPS (GALANOS et al., 1985).

2.4.2. Domínio Polissacarídeo

O domínio polissacarídeo é formado pela cadeia O-específica, ou antígeno O (OAg) na região terminal e pelo núcleo (*core*) polissacarídeo, em posição mais proximal ao lipídeo A (FIGURA 02).

2.4.2.1. Núcleo (*core*) polissacarídeo

As estruturas do núcleo (*core*) polissacarídeo variam entre bactérias entéricas e não entéricas, e são divididas em núcleo interno e externo. O *core* interno de enterobactérias tipicamente é constituído por 8 a 12 unidades de monossacarídeos, usualmente ramificadas. O açúcar localizado na posição redutora é sempre ao menos um resíduo de ácido 3-deoxi-D-mano-octulosónico (Kdo), que se liga (2→6) ao resíduo de glucosamina II do lipídeo A. Ainda, três resíduos de heptose ou grupamentos fosfato, pirofosfato ou fosforiletanolamina (ou outros açúcares), estão ligados (1→5) ao primeiro Kdo da cadeia (FIGURA 02) (CAROFF e KARIBIAN, 2003; IZQUIERDO - LÁZARO, 2003). O *core* externo, por sua vez, é formado por um oligossacarídeo, com pelo menos 6 resíduos, ligado (1→3) aos resíduos de heptose, que pode ser ou não ramificado com galactose, glucose ou seus derivados (CAROFF e KARIBIAN, 2003).

O *core* polissacarídico apresenta variabilidade, principalmente com relação à estequiometria dos seus componentes. Esta variação pode ocorrer em resposta ao ambiente (meio de cultivo, por exemplo), de forma similar ao observado para LipA (CAROFF e KARIBIAN, 2003).

A estrutura mínima do núcleo (*core*) polissacarídeo consiste precisamente do Kdo ligado ao lipídeo A (HELANDER et al., 1988).

2.4.2.2. Cadeia específica O ou Antígeno-O

A cadeia específica O, também citada como Antígeno O (OAg) do LPS é formada por mais de 50 repetições de oligossacarídeos formados por 2 a 8 monossacarídeos, com alta variabilidade entre espécies. Os OAg podem ser homopoliméricos ou heteropoliméricos. Alguns sorotipos de *E. coli* e *Klebsiella*, por exemplo, apresentam repetições homopoliméricas, que representam adjuvantes eficientes na produção da resposta imune humoral, principalmente quando a antígeno O é formado por manoses (polímero de mananas). Além disso, as repetições podem variar com relação a forma como são ligadas, que pode ser linear ou ramificada. Nas unidades monoméricas, existe diversidade quanto a posição e estereoquímica das ligações glicosídicas tipo O (ALEXANDER e RIETSCHER, 2001; WANG e QUINN, 2010).

2.5. Biossíntese dos Lipopolissacarídeos

A biossíntese de LPS envolve diferentes processos coordenados, mas individuais, que incluem:

- i. Síntese de precursores ativadas no citoplasma;
- ii. Polimerização das unidades de repetição do OAg;
- iii. Formação dos domínios do LPS
- iv. Translocação e transporte através da membrana citoplasmática;

A síntese de LPS tem início a partir de monossacarídeos ativados ligados a nucleotídeos, que são, geralmente, metabólitos intermediários do metabolismo central bacteriano. Um dos precursores do LPS é a Uridina-difosfato-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), que é convertido em LPS por reações enzimáticas sequencias que convertem sequencialmente a UDP-GlcNAc em dissacarídeo-1-P, Kdo2-LipA, core-LipA e por fim, LPS (IZQUIERDO-LÁZARO, 2003 ; WANG e QUINN, 2010). O processo de biossíntese ocorre na face citoplasmática da membrana interna e pode ser subdividido em duas partes: a formação do lipídeo A e o núcleo do LPS e a formação do antígeno O.

A biossíntese do LipA associado a Kdo é a primeira etapa da biossíntese de LPS e envolve nove enzimas diferentes que atuam modificando o UDP-GlcNAc em lipídeo A e associando este aos resíduos de Kdo, na posição 6' do lipídeos A, usando o açúcar CMP-Kdo como doador (WANG e QUINN, 2010).

As vias de biossíntese do LPS em diferentes bactérias gram-negativas conservam princípios comuns, apesar do alto polimorfismo dos genes envolvidos e capacidade de adaptação às diferentes condições do ambiente.

2.6. LPS de *Salmonella*

O LPS em *Salmonella*, especialmente *S. enterica*, é conhecido por desenvolver papéis importantes nos processos de colonização do hospedeiro e sobrevivência das bactérias em condições hostis, como no albúmen dos ovos contaminados. Em *S. Enteritidis* (SE), a síntese de antígeno O precisa necessariamente, ser completa, produzindo uma cadeia longa de unidades de repetição, ou a bactéria perde a habilidade de colonizar tecidos, contaminar ovos e sobreviver no albume. (COWARD et al., 2013).

A estrutura do LPS de *Salmonella* se assemelha muito a estrutura genérica descrita anteriormente. Entretanto, algumas características parecem ser comuns ao gênero *Salmonella* como a presença de um ácido graxo C16 em ligação secundária, formando um lipídeo A hepta-acil é uma característica comum, mas não exclusiva, do gênero *Salmonella*. Em *Salmonella*, os resíduos ligados (1→5) ao Kdo são grupos fosfato ou fosforiletanolamina, ou ainda por outro monossacarídeo ao invés de resíduos de heptose, comuns em outras gram-negativas não entéricas (CAROFF e KARIBIAN, 2003).

2.7. LPS e sistema imunológico

O reconhecimento de possíveis infecções por patógenos pelo sistema imune inato é mediado pelos receptores celulares específicos conhecidos como receptores de reconhecimento padrão, principalmente os receptores toll-like (TLRs). O sistema imunológico apresenta receptores de superfície capazes de reconhecer padrões moleculares conservados, associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*). O principal ligante destes receptores, em bactérias gram-negativas, é o LPS. A presença de LPS na corrente sanguínea ou nas mucosas é identificada e leva a fagocitose do patógeno, induzindo vias de sinalização intracelular que ativam mecanismos de eliminação de patógenos, produção e secreção de citocinas e moléculas coestimulatórias, necessárias para apresentação de antígenos à resposta adaptativa do sistema imune (FEARON e LOCKSLEY, 1996; KOGUT et al., 2005). O sistema de detecção de LPS em mamíferos consiste em: a) proteína de Ligação a LPS (LBP), uma glicoproteína que aumenta a ligação de LPS ao b) CD14, correceptor de LPS e c) TLR4, que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1 β e IL-6. Este mecanismo é capaz de amplificar a resposta imune quando existem baixas concentrações de LPS circulante. Quando em altas concentrações, a detecção ocorre diretamente por ligação ao CD14. Em aves, o sistema de detecção de LPS é similar ao descrito para mamíferos (KOGUT et al., 2005).

Como descrito anteriormente e também válido para LPS de SE, a ativação de TLR4 é essencial para a indução da resposta imune no hospedeiro. LPS de *Salmonella* atua como um potente indutor de resposta inflamatória em macrófagos,

indicando sua atuação importante na geração de sepse durante uma infecção sistêmica (COBURN et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Os objetivos gerais deste projeto de monografia foram:

- i. Purificar e fracionar o LPS de três cepas de *Salmonella Enterica* sorotipo Enteritidis;
- ii. Identificar perfil de resposta imunológica de aves vacinadas com S. Enteritidis atenuada frente aos diferentes LPS purificados.
- iii. Caracterizar estruturalmente os LPS, e suas frações, previamente purificados;

3.2. Objetivos específicos

Para alcançar os objetivos gerais acima, delineamos os seguintes objetivos específicos:

- i. Purificar de Lipopolissacarídeos (LPS) de *Salmonella enterica* Enteritidis de três cepas: vacinal (vacina atenuada), isolada de campo e cepa ATCC;
- ii. Fracionar os LPS purificados em Antígeno O e lipídeo A através de hidrólise parcial;
- iii. Avaliar o perfil eletroforético do LPS e suas frações por SDS-PAGE seguido de coloração com nitrato de prata.
- iv. Avaliar o perfil de resposta imunológica dos LPS das cepas vacinal, isolada de campo e ATCC, e suas frações, a anticorpos policlonais (IgY) anti *Salmonella* Enteritidis vacinal através de imunoensaios, como *Western Blot* e ELISA;
- v. Avaliar a estrutura da molécula total e frações dos LPS purificados através de Ressonância Magnética Nuclear e espectrometria de massas;

4. METODOLOGIAS

Para a execução deste projeto, os seguintes materiais e métodos serão utilizados/executados:

4.1. Cepas de *S. Enteritidis*

Três cepas de *S. Enteritidis* foram utilizadas. A cepa vacinal foi isolada de vacina comercial com *Salmonella Enteritidis* viva atenuada. A cepa de campo foi isolada e cedida pelo Centro de Diagnósticos Marcos Enrietti e a última cepa é uma cepa comercial ATCC®- BAA-1587™.

4.2. Anticorpo IgY anti-*Salmonella enterica Enteritidis*

Aves apresentam três classes imunoglobulinas análogas às imunoglobulinas de mamíferos, IgA, IgM e IgY (análogo a IgG). O IgY é produzido por linfócitos B (células B) circulantes, derivados das células da Bursa de Fabricius, e é transportado para o vitelo, ou gema, do ovo de forma análoga a transferência de anticorpos mamíferos através da placenta. Além disso, o IgY também é transportado do vitelo para o embrião em desenvolvimento. A concentração de IgY no vitelo do ovo são de aproximadamente 20 mg/mL, sendo possível obter até 400mg de IgY por ovo, sendo, desta forma, os principais anticorpos encontrados em ovos de galinhas. Em aves imunizadas, o rendimento por ovo geralmente é ainda maior (CARLANDER, 2002).

A aplicação biotecnológica do IgY representa uma redução do número de animais utilizados para purificação de anticorpos, uma vez que uma galinha poedeira produz, ao longo do seu período de produção de ovos, com imunizações a cada 3 meses, volume muito maior de anticorpos do que um único camundongo, e estes anticorpos podem (e são) utilizados como alternativa a anticorpos de mamíferos utilizados na pesquisa e desenvolvimento e imunoterapia, incluindo a prevenção e tratamento de infecções bacterianas, virais e fúngicas em humanos e em animais (PET ou de corte), uma vez que estruturalmente se assemelha a imunoglobulina G de mamíferos. Comparado com anticorpos mamíferos, o IgY pode ser purificado de maneira muito rápida, com alto rendimento, e principalmente, através de uma técnica

pouco invasiva, uma vez que o IgY é purificado diretamente das gemas de ovos de aves imunizadas (CARLANDER, 2002).

O anticorpo IgY anti-Salmonella enterica Enteritidis (SE) foi cedido pela Imunova Análises Biológicas Ltda. Estes anticorpos foram purificados a partir da gema de ovos produzidos por aves vacinadas com bacterina, bactéria inativada em adjuvante oleoso, sendo a mesma cepa presente na vacina comercial com *Salmonella* Enteritidis viva atenuada. O protocolo de purificação utilizado foi adaptado de Carlander (2002).

A autora desta monografia participou ativamente do processo de imunização, manutenção das aves e purificação do IgY, como estagiária na Imunova Análises Biológicas Ltda.

4.3. Purificação de lipopolissacarídeos

O protocolo de purificação de LPS foi adaptado e padronizado por Ingberman (2015) a partir dos protocolos originais de Galanos et al.. (1969) e Wray e Wray (2000). O protocolo inclui etapas de eliminação de impurezas e particionamento. Para eliminar impurezas, como proteínas e ácidos nucleicos, através de múltiplas lavagens com o solvente orgânico acetona, um solvente orgânico volátil facilmente eliminado por evaporação, e etapa de isolamento do LPS consiste em, após evaporação da acetona, particionar o LPS usando fenol:Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e centrifugação.

De forma descritiva, o protocolo consiste em cultivar separadamente as três cepas de *S. Enteritidis*, doravante denominadas Vacinal, Campo e ATCC, em 1L de meio LB líquido (10g de Triptona, 5g Extrato de Levedura, 10g NaCl e água destilada quantidade suficiente para 1L) a 37°C e 240 rpm por 16 a 20 horas (O/N; overnight). Posteriormente, as culturas bacterianas foram centrifugadas a 5000xg por 30 minutos, a temperatura ambiente (TA). O sobrenadante (SN) foi descartado e o sedimento ressuspenso em 40mL de água destilada, e transferido para um tubo de centrifuga de 50mL. As amostras então foram centrifugadas novamente, desta vez a 9000g por 10 minutos TA. O SN foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 20 mL de água destilada ultrapura (Milliq). Estes 20 mL contendo as bactérias já parcialmente livres de meio de cultivo foram adicionados a 180 mL de Acetona gelada e mantidas a -20°C

por 72 horas. Após 72 horas, a amostra foi novamente centrifugada a 8000xg por 12 minutos a 4°C e o sedimento foi ressuspensão novamente em q.s.p. 50 mL de Acetona gelada. Este processo foi repetido duas vezes. Ao final, o sedimento foi mantido O/N 37°C ou TA para secar. O sedimento seco foi então macerado, pesado e foi adicionado Tris-HCl 50 mM pH 7,4 até formar uma solução 6%. Esta solução foi homogeneizada e aquecida a 65°C e então misturada com o mesmo volume de Fenol tamponado pH 7,4 (também a 65°C). A mistura foi mantida a 65°C por 5', homogeneizando a cada 60 segundos. A solução foi então centrifugada a 8000g por 12 minutos e a fração aquosa (superior) foi coletada e dialisada contra água corrente por 96 horas a 4°C e posteriormente dialisada contra água destilada, em membrana com poros menores que 13 kDa (3 trocas de 10x volume da amostra). Ao final, a amostra foi congelada e liofilizada.

4.4. Extrato bacteriano total

Para extrato de bactérias totais, as três cepas foram cultivadas em 1 L de meio LB, as bactérias foram centrifugadas a 5000xg por 30 minutos TA e o sedimento foi ressuspensão em 10 mL água destilada. As bactérias foram inativadas por aquecimento a 95°C 10 minutos, posteriormente congeladas e liofilizadas.

Para eletroforese, foram pesados 10 mg de cada bactéria, que foram diluídos em 1 mL de água destilada. Destes, 100 µL foram misturados com 100 µL de tampão de amostra 5X redutor (100µL de β-mercaptoetanol/ml de Tampão de Amostra), para uma concentração final de 5 µg/µL.

4.5. Hidrólise parcial do LPS

A hidrólise é uma etapa importante que precede análises estruturais dos resíduos de polissacarídeos ou lipopolissacarídeos. Durante o processo de hidrólise, as porções hidrofóbicas e hidrofílicas dos compostos, promovendo extração do lipídeo A da molécula de LPS (TIRSOAGA et al., 2007). A fração contendo lipídeo A permanece insolúvel, e a fração polissacarídica, denominada OAg, fica no sobrenadante, solúvel.

Para a fragmentação da molécula de LPS em OAg e LipA, as amostras de LPS purificado das três cepas foram hidrolisadas de acordo com o seguinte protocolo, como descrito por Tirsoaga et al.. (2007). Aproximadamente 5mg de cada LPS foram diluídos em 500 μ L de água destilada e 500 μ L de ácido acético 1% em um tubo de ensaio de vidro com tampa. Após, as amostras foram submetidas a temperatura de 100°C, sob agitação, por no máximo 2h ou até ser possível observar uma fração insolúvel no tubo. O volume total foi transferido para um tubo de microcentrífuga tipo eppendorf e centrifugado por 9000xg por 20 minutos. Após este procedimento, o LipA permaneceu na fração insolúvel (pellet) e o OAg na fração solúvel (SN). As amostras foram congeladas e liofilizadas.

4.6. SDS-PAGE e coloração com nitrato de prata

A separação de macromoléculas por um campo elétrico é chamada de eletroforese. Existem diferentes métodos de eletroforese e um dos mais utilizados inclui o uso de géis descontínuos ou contínuos de poliacrilamida como suporte e dodecil sulfato de sódio (SDS) como agente desnaturante e é chamado de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE, do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), primeiramente utilizado por Laemmli (1970). O SDS é um detergente iônico e além de atuar como agente desnaturante, também deixa as moléculas presentes na amostra com carga negativa, deixando a carga elétrica proporcional ao tamanho, permitindo que a separação por eletroforese seja influenciada principalmente pelo seu tamanho (OSWALD et al., 2012).

O nitrato de prata apresenta afinidade por diferentes macromoléculas, incluindo proteínas e carboidratos, e por isso, foi utilizado para desenvolver técnicas de coloração sensíveis, na escala de nanogramas, para diferentes macromoléculas. A coloração para LPS foi aprimorada por Tsai e Frasch (1982), formando um protocolo completo, que inclui fixação do LPS no gel com etanol e ácido acético, a sensibilização do LPS (oxidação com ácido perclórico), impregnação da amostra no gel com nitrato de prata, revelação com solução contendo formaldeído e ácido cítrico e por fim, a interrupção da revelação, pela adição de ácido acético.

Para análise do perfil dos LPS purificados, as amostras de bactérias totais, LPS e suas frações foram submetidas a técnica de SDS-PAGE e coloração com nitrato de prata.

Os LPS purificados e as suas frações foram diluídos para concentrações finais de 0,5 µg/µL e 0,25 µg/µL, respectivamente, com tampão de amostra 5X Redutor (concentração final 2,5X). Em um gel de poliacrilamida 18% 1 mm (29,75 mL de Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1 30%, 7 mL de água destilada, 13 mL de Tris 1,5M pH 8,8 + SDS 10%), foram aplicados, no total 50 µg de bactérias totais, 5 µg de LPS total e 2,5 µg de cada uma das frações dos LPS. O gel foi então submetido a corrente de 15 a 25mA até a frente de migração estar a 1 cm da margem inferior do gel. A coloração com prata foi realizada como descrito por Tsai e Frasch (1982) e brevemente sintetizado anteriormente neste item.

4.7. Western blot

Western blot é uma técnica amplamente utilizada em laboratórios e consiste, basicamente, na identificação de proteínas com o uso de anticorpos específicos, após a transferência eletroforética das proteínas para uma membrana. Esta técnica foi desenvolvida por Burnette (1981), Renart et al.. (1979) e Towbin et al.. (1979), sendo Burnette, pesquisador do *Fred Hutchinson Cancer Research Center* de Seattle, Washington (Costa Oeste dos Estados Unidos da América), responsável pela atual nomenclatura, uma referência a tradição de nomear as técnicas de transferência de acordo com a posição geográfica dos seus desenvolvedores.

Para o ensaio de Western Blot, após a separação eletroforética das amostras, proteínas e carboidratos presentes no gel foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose por 60 minutos a 225mA. Após, a membrana foi bloqueada com tampão TBST (tampão tris-salina; 50 mM Tris e 150 mM HCl pH 7,6 + 0,001% Tween 20) + 5% Leite desnatado Molico® por 1 hora a TA. Após o bloqueio, a membrana foi lavada com TBST por 3 vezes e então incubada com anticorpo primário IgY (produzido em galinhas) Anti - Salmonella Enteritidis 1:400 O/N a 4°C, sob agitação. A etapa de lavagem foi repetida e a membrana incubada com anticorpo secundário anti-galinha conjugado com enzima HRP (Horseradish peroxidase) na proporção de 1:25.000 por 1 hora a TA em agitador do tipo recíproco. A etapa de lavagem foi repetida novamente

e para revelação, a membrana foi incubada com substrato quimioluminescente Westar ECL-SUN (Cyanagen) por 5'. Posteriormente, a membrana foi exposta a filme autorradiográfico (Hiperfilm, GE), que foi revelado em seguida.

4.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA

ELISA (sigla do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) é um ensaio desenvolvido para detectar e quantificar diferentes substâncias, incluindo peptídeos, proteínas, anticorpos, hormônios, lipopolissacarídeos, e outras biomoléculas, que são denominadas genericamente de antígenos, que começou a ser desenvolvido nas décadas de 1960 e 1970, principalmente por Engvall e Perlmann (1971) como alternativa às técnicas anteriores, que utilizavam isótopos radioativos para detecção de macromoléculas. O primeiro ensaio de ELISA comercial, o KIT HEPANOSTIKA desenvolvido pela Organon Teknika foi utilizado para diagnóstico e acompanhamento clínico de pacientes com hepatite B (LEQUIN, 2005).

No ensaio de ELISA, de forma geral, a molécula alvo é imobilizada, direta ou indiretamente, em uma placa de microtitulação, e desta forma, é possível eliminar moléculas inespecíficas ou indesejadas por lavagens consecutivas, tornando este ensaio muito específico. Após a imobilização do alvo, este é reconhecido por anticorpos específicos, que são detectados por uma reação enzimática. A enzima mais utilizada é a HRP (sigla do inglês, Horseradish peroxidase) derivada do extrato de raiz forte (*Armoracia rusticana*), que gera a união de peróxido de hidrogênio com um substrato (usualmente TMB, Tetrametilbenzidina), gerando um resultado colorimétrico, cuja intensidade está diretamente relacionada a quantidade de antígeno na amostra) (Thermo Fischer Scientific, 2016).

Neste ensaio, ELISA indireto, 150 ng de cada antígeno (LPS, Antígeno O e lipídeo A, das três cepas) foram utilizados para sensibilizar, utilizando um tampão Carbonato pH 9,6, cada poço de placas de 96 poços de fundo plano e alta capacidade absorviva (Maxisorp, Nunc) num volume de 50 µL por poço, em triplicata, por 48 horas a 4°C, sem agitação. Após as 48 horas, a placa foi lavada com PBST (tampão fosfato-salina; 20 mM NaH₂PO₄, 150 mM Na₂HPO₄, 1,54 mM NaCl + 0,005% Tween20) por 3 vezes e posteriormente, os poços foram bloqueados com 200µL de PBST+ 1% Caseína, O/N 4°C. Após o bloqueio, a etapa de lavagem foi repetida e foram

adicionados 200 μL do anticorpo primário IgY (produzido em galinhas) Anti - Salmonella Enteritidis em diluição seriada de 3,33 a 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, por duas horas a 37°C. A etapa de lavagem foi repetida novamente e a placa recebeu 200 μL por poço de anticorpo secundário anti-galinha conjugado com enzima HRP na proporção de 1:25.000 e foi incubada por 1 hora a 37°C sem agitação. Antes da revelação, a placa foi lavada novamente e cada poço recebeu 100 μL de solução comercial TMB (*3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*) *single solution* (Life Technologies) e foi incubada sem exposição a luz por 10 a 15 minutos. Para interromper a reação, foram adicionados 50 μL de 1 M Ácido Sulfúrico por poço. O resultado é obtido por leitura de absorbância a 450 nm.

4.9. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

Cromatografia líquida de alto desempenho é um método de separação de compostos de alta seletividade e eficiência, operando em condições de alta pressão. Espectrometria de massa é um método capaz de fornecer informações estruturais e quantitativas de um composto amostrado. A combinação destas duas técnicas permite a identificação e quantificação seletiva de compostos específicos presentes em uma amostra. Um equipamento de cromatografia pode ser acoplado a diferentes espectrômetros de massa. Neste trabalho, foi utilizada a detecção por ionização em pressão atmosférica, onde o material eluído da coluna cromatográfica passa por um nebulizador pneumático, onde são geradas gotículas que são dessolvatadas, ou seja, são liberadas das moléculas de água, formando um 'spray', que é seco e passa por uma corona de descarga, submetida a um campo elétrico suficiente para gerar ionização. Desta forma, como o solvente, proveniente da fase móvel líquida do cromatógrafo, encontra-se em maior concentração no 'spray' que o analíto, o solvente é ionizado preferencialmente, e passam a ocorrer reações entre os íons em fase gasosa e as moléculas neutras do analíto, dando origem aos íons do analíto (CHIARADIA et al., 2008).

Para análise estrutural, portanto, as amostras foram submetidas a sistema de cromatografia líquida ultra alta eficiência (UHPLC), onde a separação da amostra foi realizada com gradiente linear de 6% a 58% de solvente B (Acetonitrila 60% v/v, Ácido Fórmico 0,1% v/v, em água) e solvente A (Acetonitrila 2%, ácido fórmico 0,1% v/v, em

água) em coluna com fase estacionária C18, e detectadas por espectrômetro de massas do tipo íon-trap linear Thermo LTQ-XL, onde foram realizados processos de fragmentação em série (MSn) nas moléculas presentes nas amostras, visando obter informações estruturais que acreditem sua identificação. A detecção foi realizada em modo positivo e negativo de ionização em pressão atmosférica (API, do inglês, *atmospheric pressure ionization*). As amostras foram aplicadas por injeção direta utilizando uma bomba de infusão a um fluxo de 10 µL/min, ou então em modo hifenado UPLC-EM. A aquisição e o processamento de dados foram realizados utilizando o software XCALIBUR.

4.10. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Espectroscopia de ressonância nuclear é uma ferramenta para determinação estrutural e conformacional de polissacarídeos e outras moléculas que explora a propriedade magnética dos núcleos dos átomos, que podem ser vistos como objetos que giram em torno de si mesmos, em seu próprio campo magnético, principalmente átomos de ^1H e ^{13}C . Apesar de estarem distribuídos aleatoriamente na molécula a ser estudada, quando esta é submetida a um forte campo magnético externo, são obrigados a alinhar-se em orientações específicas, com diferentes níveis energéticos. Quando os núcleos atômicos organizados são expostos a pulsos de radiação eletromagnética, eles são obrigados a mudar de orientação, passando para um nível energético superior, e quando volta para seu estado original, libera energia, emitindo radiação específica, que pode ser interpretada como intensidade do sinal em função da frequência aplicada. Este processo é chamado de ressonância magnética nuclear, ou RMN. A liberação de energia na forma de radiação gera um sinal elétrico que é tratado matematicamente e gera um espectro de RMN, onde estão representadas as frequências de ressonância em uma unidade de desvio químico, que indica a localização de um sinal de RMN, em relação a um padrão que é, por convenção, determinado como desvio químico igual a 0,0 ppm (LUZANIN e ABRANTES, 2010).

Espectros de 1D e 2D de ^1H e ^{13}C foram realizados em um espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600, operando a 14,1 Tesla (600 MHz para ^1H), equipado com uma sonda quadrinuclear de observação inversa de 5 mm e gradiente de campo no eixo z. Antes das análises, as amostras foram submetidas a troca de H por D, por

sucessivas solubilizações e evaporações em solventes deuterados. Destes 600 µL foram transferidos para tubos de RMN de 5 mm para aquisição dos experimentos de RMN. Os deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C foram referenciados em relação ao sinal do TMSP-D4 (*3-(trimethylsilyl)-2,2',3,3'-tetradeuteropropionic acid*) em 0,00 ppm a 70°C.

Esta análise de RMN, em particular, é uma espectrometria de correlação heteronuclear individual, ou HSQC (do inglês, *Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy*), associado a uma técnica de aumento de sensibilidade sem distorções através de transferência de Polarização, ou DEPT (do inglês, *Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*), pelo qual é possível analisar sinais positivos e negativos com mais sensibilidade. Análises do tipo HSQC-DEPT geram espectro 2D heteronuclear, onde todos os sinais observados no espectro representam correlação direta entre um carbono e um próton (DAG, 2005).

4.11. Análises estatísticas dos resultados

Os resultados do ELISA foram analisados no software *GraphPad Prism*, utilizando o teste de análises de variância (ANOVA) com dois fatores (*2-way*), com teste de correção de Sidak para valores de significância e intervalo de confiança de 0,05 (95%), 0,01(99%) e 0,001 (99,9%).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação e fracionamento de LPS

O protocolo de purificação e fracionamento do LPS foi realizado como descrito nos materiais e métodos. Foram utilizados um total de 3L de meio de cultivo com bactérias (fase Log) de cada cepa. O rendimento das purificações está representado na tabela 1. Os rendimentos de cada purificação foram adequados e suficientes para a realização dos ensaios propostos nesta monografia.

As diferenças de rendimento, que pode ser observada na tabela 1, não representam diferentes proporções de LPS na membrana externa da parede celular de cada cepa, uma vez que diferenças estruturais, ainda que muito discretas, influenciam o processo de purificação.

TABELA 1. RENDIMENTO DAS PURIFICAÇÕES DE LPS DE *Salmonella enterica* ENTERITIDIS

| CEPAS | CULTIVO (L) | PELLET (MG) | LPS (MG) | LPS (MG/L DE CULTIVO) |
|---------|-------------|-------------|----------|-----------------------|
| VACINAL | 3 | 554,8 | 112,3 | 37,43 |
| CAMPO | 3 | 1369,4 | 48,3 | 16,1 |
| ATCC | 3 | 678,7 | 7,1 | 2,37 |

Após a purificação e fracionamento, o LPS e suas frações foram caracterizados por diferentes abordagens, com resultados descritos adiante.

Apesar de não apresentado aqui, no perfil de SDS-PAGE do LPS total e suas frações, e posterior coloração com Coomassie blue, um corante específico para proteínas, não foram identificadas proteínas contaminantes na nossa purificação.

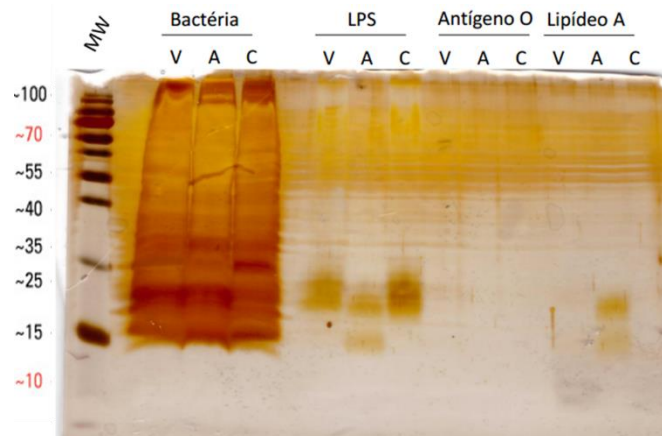
5.2. Coloração com nitrato de prata

A coloração com nitrato de prata está representada na figura 4. A intensidade de coloração geralmente indica maior quantidade relativa de material e/ou maior afinidade da amostra pelo nitrato de prata.

Os resultados obtidos para a coloração com prata, a princípio, podem divergir dos resultados descritos em diversas referências. Contudo, é importante notar que

neste projeto, o perfil de coloração analisado corresponde ao LPS extraído de cultivos bacterianos em fase estacionária, ou seja, nesta etapa a adição de repetições do OAg já aparece finalizada, na maior parte das bactérias. Tendo considerado isso, neste resultado, não foi possível observar o padrão de LPS em 'escada', como é classicamente descrito quando purificado de bactérias em fase de crescimento logarítmico (TSAI e FRASCH, 1982).

FIGURA 4. COLORAÇÃO COM NITRATO DE PRATA DOS EXTRATOS BACTERIANOS TOTAIS, LPS PURIFICADOS E FRAÇÕES DAS CEPAS VACINAL, CAMPO E ATCC. V: Vacinal. A: ATCC e C: Campo. MW: Marcador de peso molecular, em kDa.



As 'bandas' de coloração mais intensa no gel representam a porção polissacarídica do LPS, uma vez que o fracionamento realizado foi uma hidrólise ácida e o LipA gerado por hidrólise ácida branda não é corado por esta coloração, como descrito originalmente por Tsai e Frasch (1982). A banda identificada na fração de lipídeo A da cepa de Campo possivelmente representa uma contaminação.

5.3. Imunoensaios

Como descrito anteriormente, o reconhecimento do LPS e suas frações por anticorpos produzidos por aves (IgY) após a vacinação com vacina viva de *Salmonella* Enteritidis foi estudado por duas técnicas diferentes: ELISA e Western Blot.

Os imunoensaios realizados neste projeto apresentam resultados complementares, uma vez que o ensaio de Western Blot permite a identificação da massa molecular aproximada, através de SDS-PAGE, da molécula reconhecida pelos

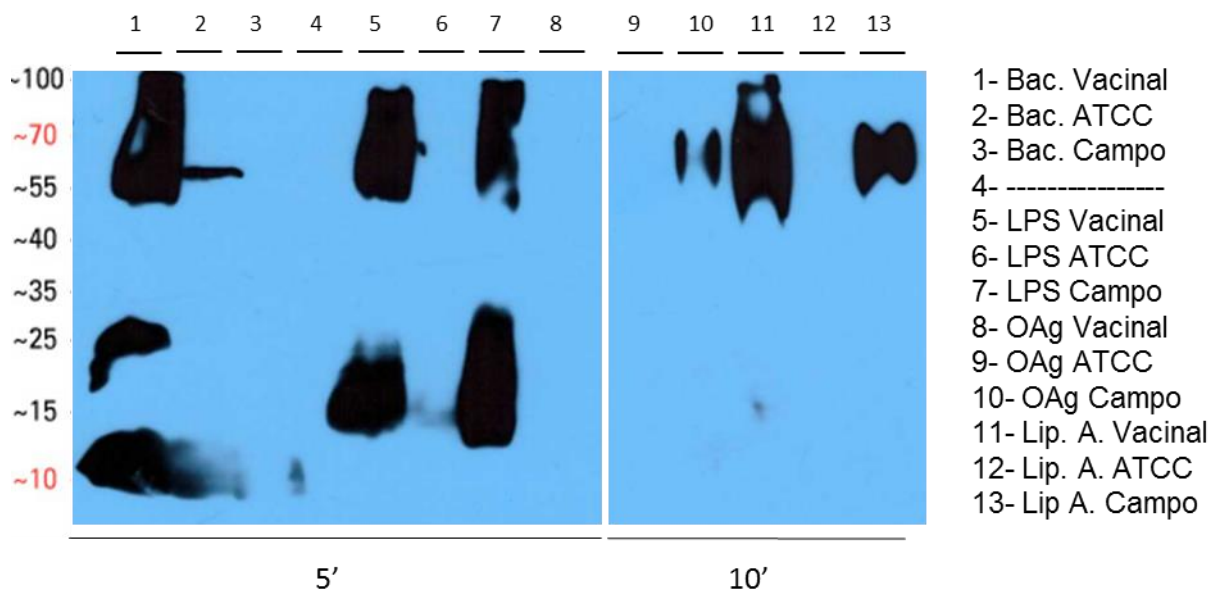
anticorpos específicos e o Ensaio de ELISA permite a reação do anticorpo específico com o antígeno na sua conformação nativa.

5.3.1. Western Blot (WB)

O ensaio de WB consiste, como descrito anteriormente, na resolução dos componentes da amostra por tamanho relativo, seguido por transferência a uma membrana de nitrocelulose, incubação com anticorpos específicos e revelação, utilizando luminol. O ensaio de Western Blot dos LPS purificados e suas frações foi realizado em triplicatas. Neste ensaio, a intensidade de sinal geralmente representa maior afinidade pelos anticorpos específicos ou quantidade relativa de material. Os resultados do WB estão apresentados na figura 5.

O LPS íntegro e as frações OAg e LipA da cepa ATCC não foram reconhecidos pelo IgY Anti-*Salmonella* Enteritidis. As cepas Vacinal e isolada de Campo, ou simplesmente 'Campo', apresentam um perfil geral de reconhecimento muito similar. As frações de LipA foram reconhecidas nas amostras 'Vacinal' e 'Campo' enquanto a fração OAg foi reconhecida apenas na amostra da cepa 'Campo'.

FIGURA 5. WESTERN BLOT DOS EXTRATOS BACTERIANOS TOTAIS, LPS PURIFICADOS E FRAÇÕES DAS CEPAS VACINAL, CAMPO E ATCC.

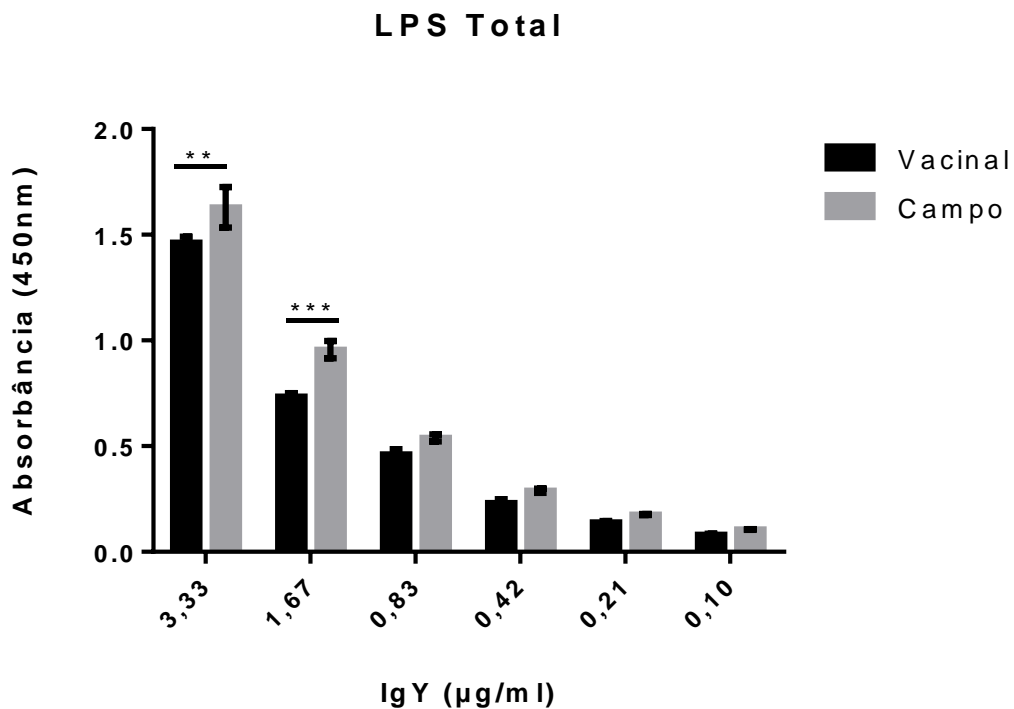


5.3.2. ELISA

O ensaio de ELISA para análise do LPS e suas frações foi realizado em triplicata. Não houve identificação de sinal positivo, neste ensaio, para o LPS e frações da cepa ATCC (dados não mostrados). Os resultados obtidos estão representados nas figuras 6, 7 e 8.

O anticorpo IgY utilizado apresenta maior afinidade pelo LPS total da cepa 'Campo' do que pelo LPS total da cepa 'Vacinal' (Figura 6), a mesma que foi utilizada para produção do anticorpo policlonal, principalmente quando reagido com concentrações maiores de IgY específico, 3,33 μ g/ mL (**, $p < 0,01$) e 1,67 μ g/ mL (***, $p < 0,001$) (FIGURA 6).

FIGURA 6. ELISA INDIRETO DE DETECÇÃO DE LPS VACINAL E CAMPO POR ANTICORPOS POLICLONAIS IgY.



No ELISA das frações, também procedido em triplicatas, a fração com maior absorbância (ABS_{450nm}) foi a fração OAg, tanto para LPS vacinal, quanto para campo (Figuras 7 e 8, A). Para melhor visualização dos resultados, foi calculado a porcentagem de sinal que cada fração representa, com relação ao LPS íntegro (Figuras 7 e 8 'B'). De forma relativa, o sinal observado para OAg Vacinal corresponde

a aproximadamente 40% do sinal total observado para o LPS vacinal enquanto o OAg Campo representa aproximadamente 55% do reconhecimento do LPS campo ao IgY específico (Figura 7 e 8, B).

FIGURA 7. ELISA INDIRETO DE DETECÇÃO DE LPS VACINAL E SUAS FRAÇÕES POR ANTICORPOS POLICLONAIS IgY.

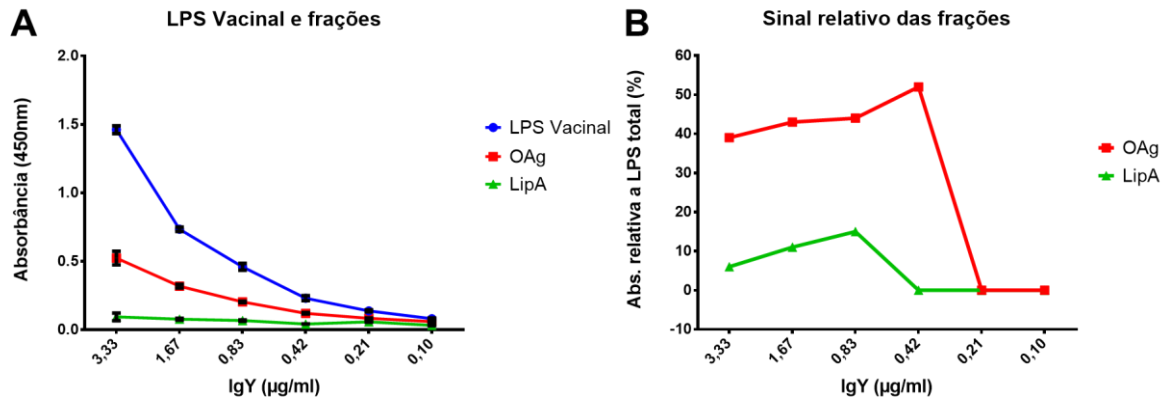
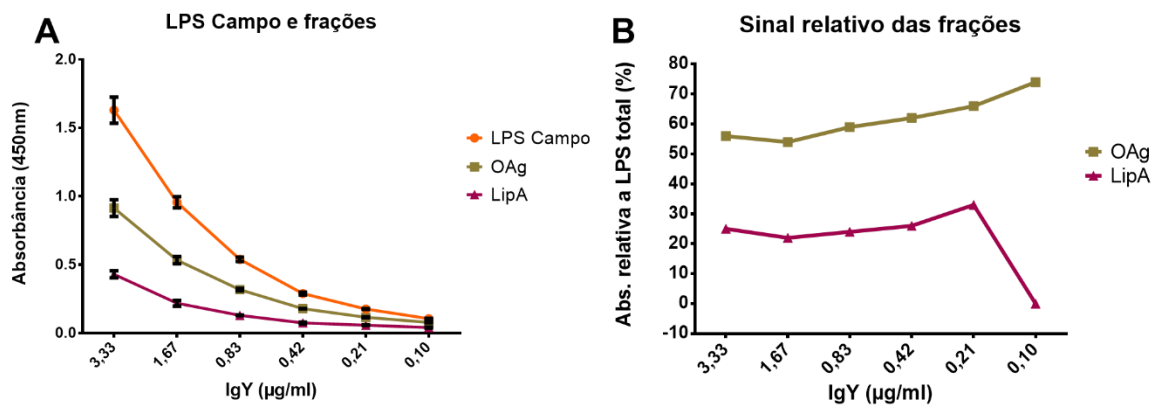


FIGURA 8. ELISA INDIRETO DE DETECÇÃO DE LPS CAMPO E SUAS FRAÇÕES POR ANTICORPOS POLICLONAIS IgY.



O IgY utilizado nos imunoenaios é um anticorpo policlonal e apesar de ter sido produzido pelo estímulo vacinal de *Salmonella* Enteritidis, não necessariamente precisa reconhecer de forma mais robusta o LPS Vacinal. O reconhecimento do LPS pelo anticorpo IgY tanto da sua cepa de origem quanto da cepa de campo, indica que possivelmente este reconheça estruturas muito similares entre as duas cepas e que não está presente no LPS ATCC.

De acordo com os imunoenaios, é possível inferir que o anticorpo IgY policlonal apresenta mais afinidade pelo LPS da cepa Campo do que pelo LPS Vacinal e analisando os resultados de sinal relativo (figura 7B e 8B) podemos observar que o IgY policlonal tem mais afinidade pela fração de OAg da cepa de Campo do que pelo OAg da cepa Vacinal, indicando que possivelmente a estrutura do OAg de Campo apresente mais estruturas imunogênicas ou mais repetições de estruturas imunogênicas.

5.4. Ensaio estruturais

5.4.1. Espectrometria de massas

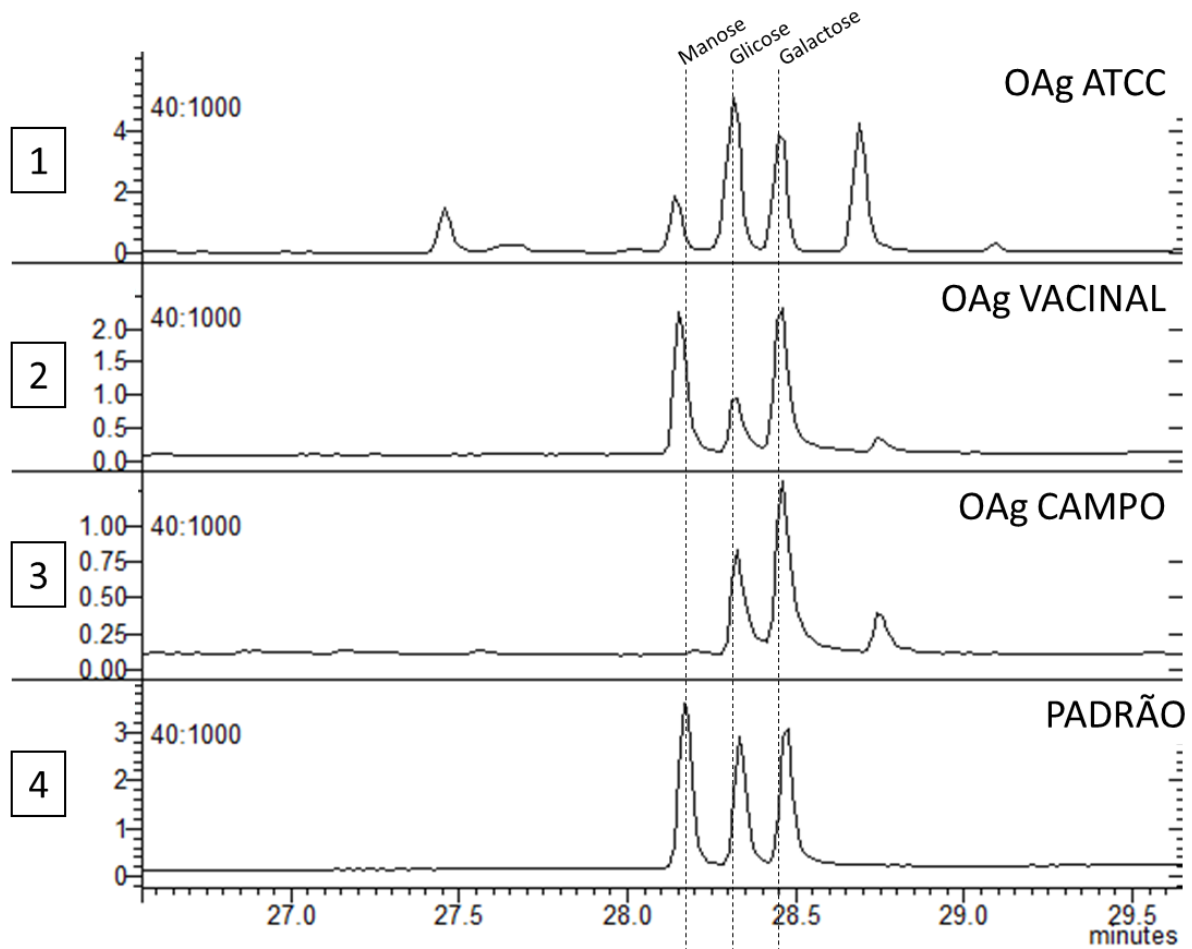
A espectrometria de massas foi procedida somente com as amostras de LPS fracionados, OAg ou LipA.

Na análise da fração de carboidratos (OAg), foram identificadas principalmente três carboidratos, manose, glucose e galactose, de acordo com as relações de massa / carga (m/z) padrão dos íons repórter de cada, assim como os tempos de retenção na cromatografia gasosa, como descritas por Sasaki e Souza (2013). Na figura 9, estão representados os picos de intensidade destes carboidratos nas amostras de OAg ATCC, Vacinal e Campo (Figura 9, 1-3, respectivamente) e padrão interno de carboidratos (Figura 9, 4). Os resultados indicam que o OAg ATCC e Vacinal apresentam manose na sua composição, enquanto esta não foi identificada no OAg do LPS campo. A proporção de glucose parece ser menor no OAg Vacinal do que nos outros dois.

Compostos derivados de manana (polímero da manose) apresentam atividade imunogênica, uma vez que são reconhecidos por receptores de lectinas tipo C, como o receptor de manose, que estão presentes em diversas células do sistema imunológico, incluindo células dendríticas e macrófagos. Estes receptores induzem atividade endocítica seguida de ativação das vias endossomais. A presença de resíduos de manose em antígenos também está relacionada a um aumento da apresentação de antígenos mediada pelos complexos de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) em células dendríticas. A conjugação de antígenos com resíduos de manose já foi utilizada como abordagem para aumentar eficiência de vacinação e para induzir a rejeição de tumores (SHENG et al., 2006). Entretanto, a aparente

ausência de manose no LPS da cepa Campo, parece não estar relacionada ao reconhecimento ou não deste pelo IgY anti-*Salmonella* Enteritidis Vacinal nos imunoenaios descritos anteriormente.

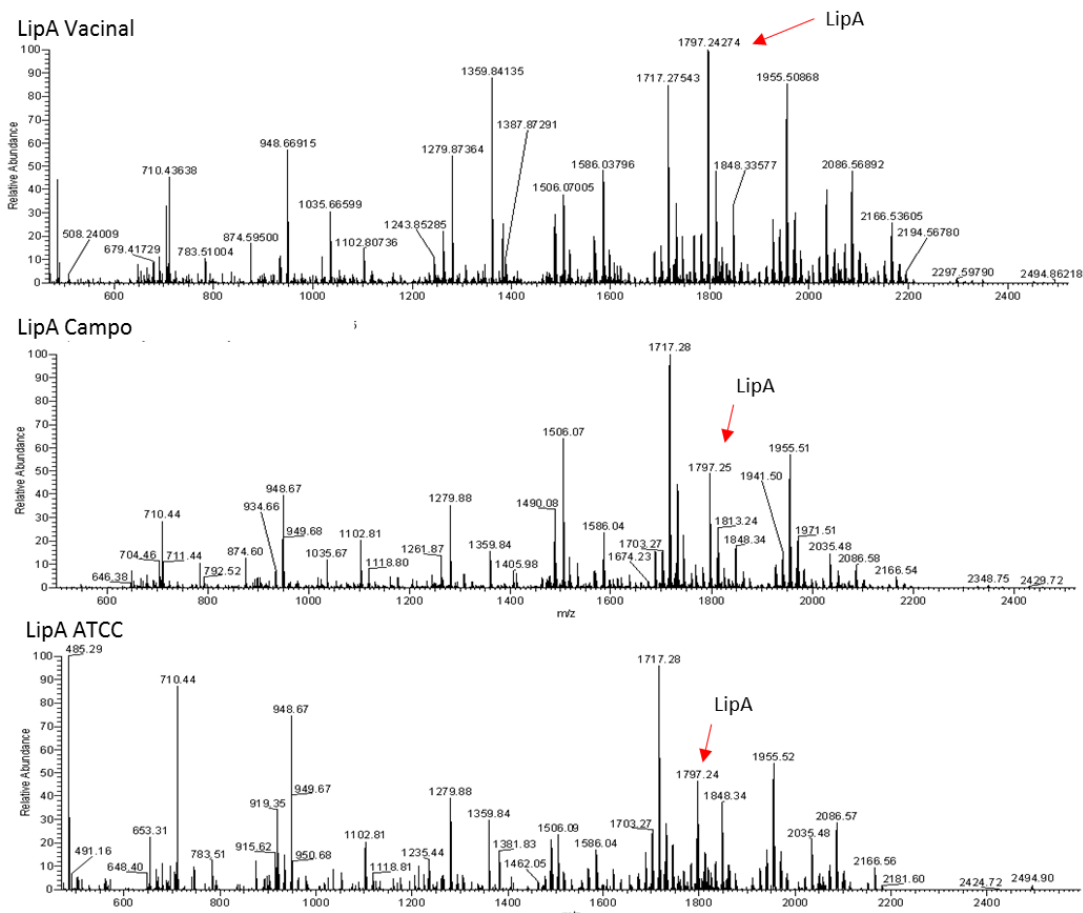
FIGURA 9. ESPECTRO DE UPLC-MS DAS FRAÇÕES ANTÍGENO O (OAg) DOS LPS DE *Salmonella enterica* ENTERITIDIS



Para análise da fração de LipA, as massas relativas foram calculadas com o software ACD/ChemSketch (ACD/Labs, 2015). Foram identificadas massas (em unidades de daltons, Da) mais altas do que a massa esperada para o lipídeo A padrão, que foi calculada com base na estrutura apresentada por Alexander e Rietschel (2001) (Figura 3). Esperava-se uma massa mais alta de aproximadamente 1770 Da. Entretanto, os maiores picos apresentam massa de aproximadamente 2550 Da. Ramificações das cadeias de carbono do lipídeo A não explicariam este aumento de massa observado, uma vez que uma cadeia de 14 carbonos apresenta em média 200

Da apenas. Durante a hidrólise ácida (hidrólise parcial) ocorre a clivagem da ligação covalente entre o resíduo de Kdo e o lipídeo A. Desta forma, os picos de alta massa observados no espectro de lipídeos (Figura 10) possivelmente representam contaminações de material não hidrolisado na amostra.

FIGURA 10. ESPECTRO DE UPLC-MS DAS FRAÇÕES lipídeo A (LipA) DOS LPS DE *Salmonella enterica* ENTERITIDIS



Foram identificados picos com massa próxima a esperada para a estrutura completa do lipídeo A (~1797 Da), considerando o processo de ionização positiva pelo qual a amostra é submetida, com variações pequenas, mas significativas de massa, indicando haver diferenças estruturais também na estrutura de lipídeos.

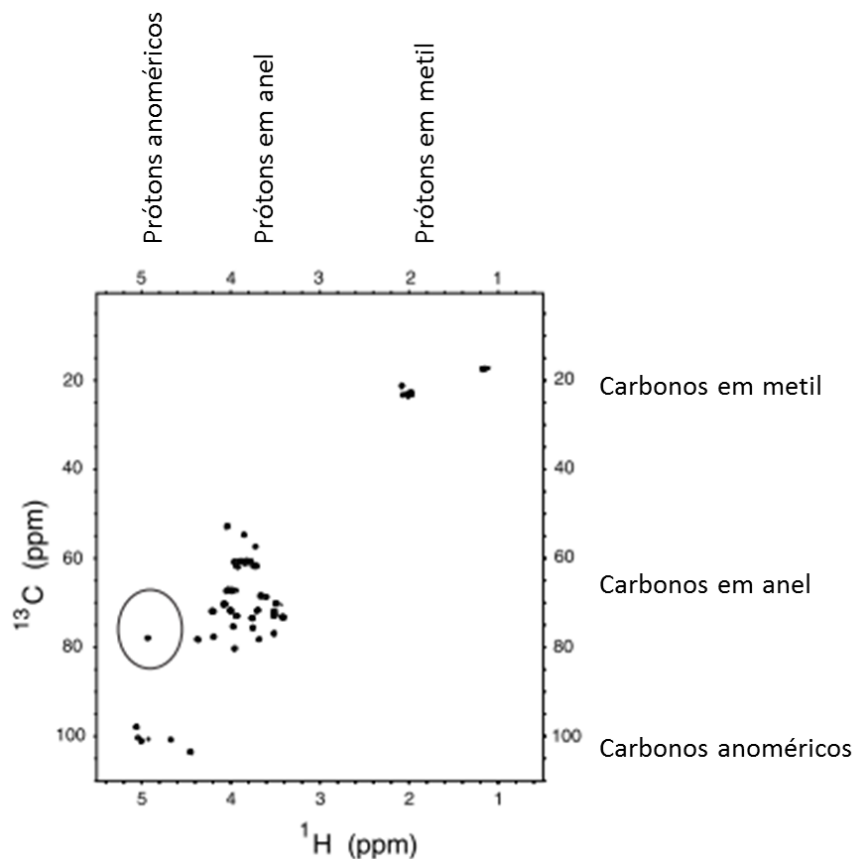
O lipídeo A representa a porção mais conservada do LPS (CAROFF e KARIBIAN,2003; RAETZ e WHITFIELD, 2002; WANG e QUINN, 2010) e portanto, uma pequena variação entre diferentes linhagens é esperada. Essa variação pode estar relacionada ao comprimento das cadeias de carbono, ramificadas ou não, que

representariam alterações de massa (Da) mais sutis do que a remoção ou adição de outros grupamentos ao LipA.

5.4.2. Espectrometria de RMN

Para análise dos espectros de RMN 2D – HSQC-DEPT foram considerados os deslocamentos químicos típicos de sinais de interações entre carbonos e prótons, que está representado na figura 11, conforme descrito por Dag (2005). Os deslocamentos foram agrupados de acordo com as localizações dos núcleos na molécula original, incluindo a análise de carbonos e prótons anoméricos, carbonos e prótons em anéis não aromáticos, e carbonos e prótons em grupamentos metil.

FIGURA 11. DESVIOS QUÍMICOS TÍPICOS DE SINAIS DE INTERAÇÃO ENTRE CARBONOS E PRÓTONS EM UM ESPECTRO $^1\text{H};^{13}\text{C}$ -RMN- HSQC-DEPT.



FONTE: Adaptado de Dag (2005).

Os resultados dos espectros estão representados nas figuras 12, 13 e 14, sendo LPS ATCC, Vacinal e Campo, respectivamente.

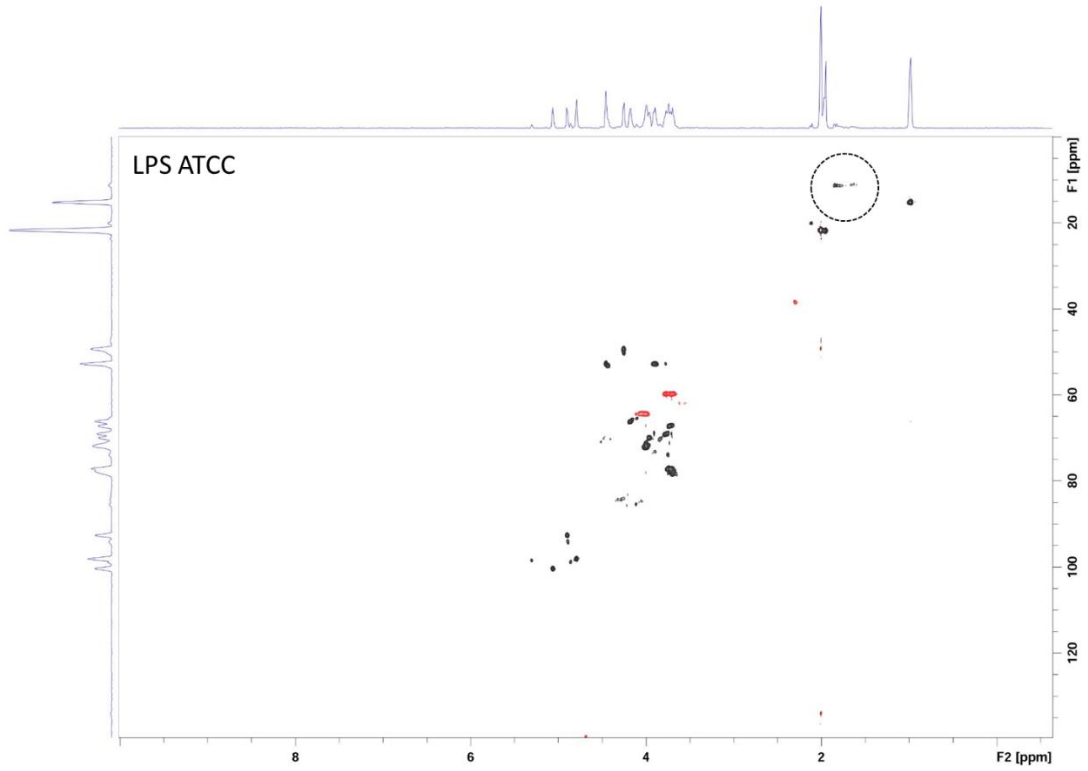
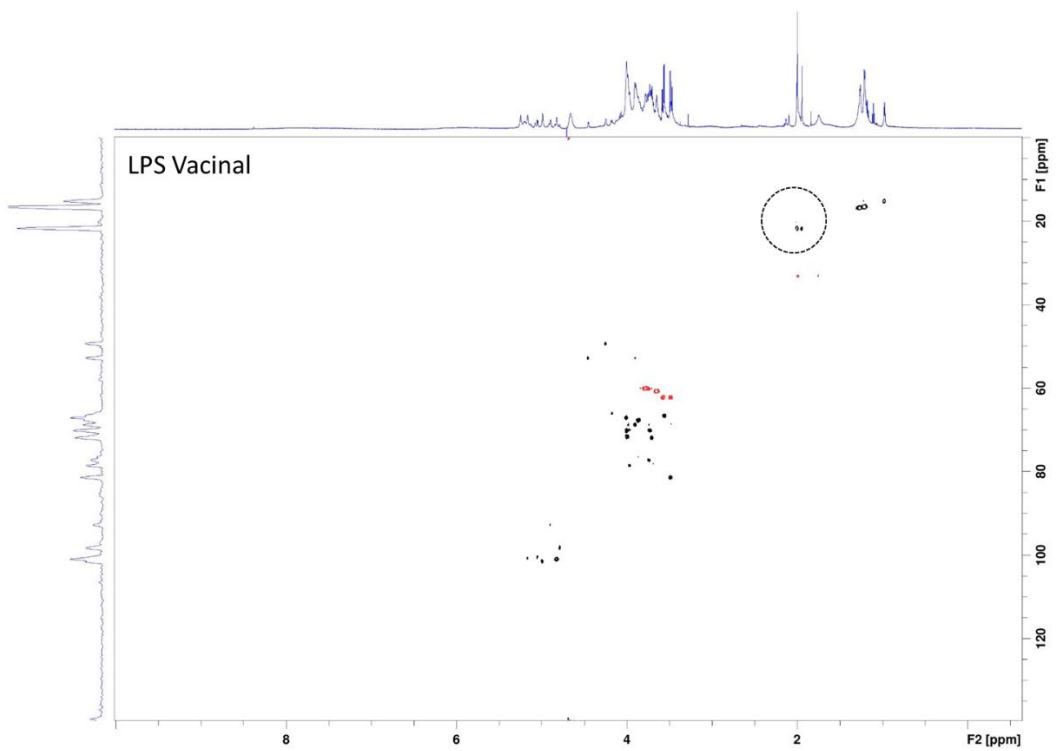
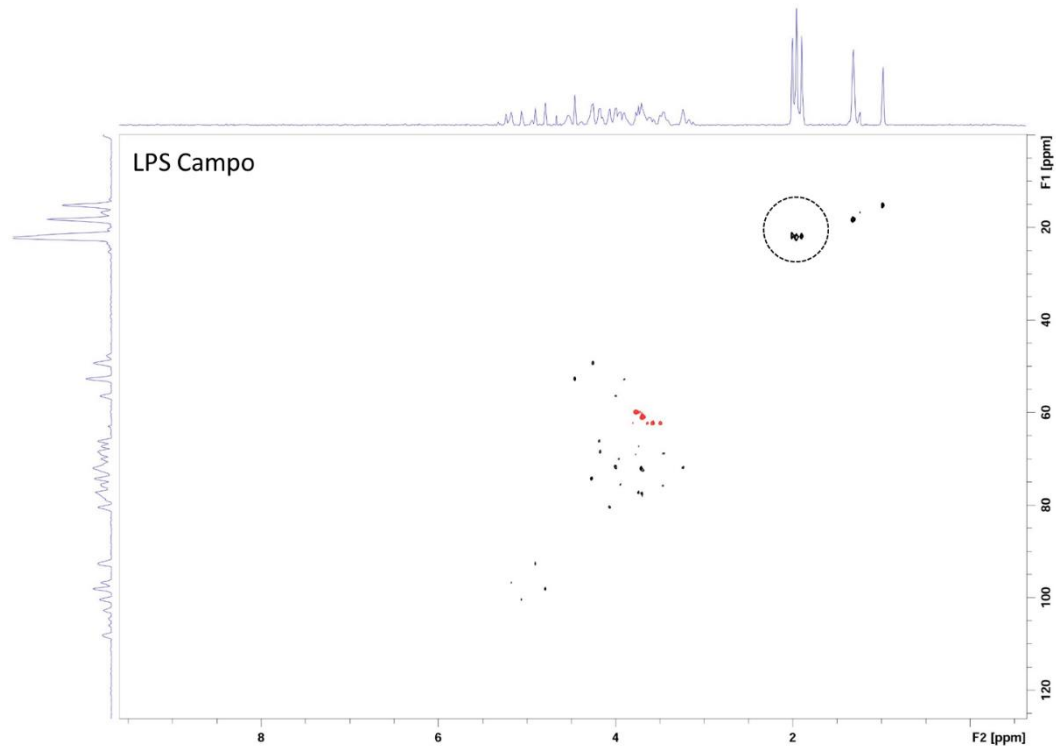
FIGURA 12. ESPECTRO ^1H - ^{13}C -RMN- HSQC-DEPT DO LPS ATCC.FIGURA 13. ESPECTRO ^1H - ^{13}C -RMN - HSQC-DEPT DO LPS VACINAL.

FIGURA 14. ESPECTRO ^1H - ^{13}C -RMN - HSQC-DEPT DO LPS CAMPO.

A principal alteração observada foi que o LPS ATCC não apresenta um grupamento metil na posição δ_{H} 1,5ppm e δ_{C} 20ppm, que é comum aos LPS Vacinal e Campo. O Kdo pode ser observado na região δ_{H} 2.12 e 2.33 ppm (representado por um círculo nas figuras 12, 13 e 14).

Apesar de ser possível extrair alguns resultados destes espectros, serão necessárias outras análises, incluindo metilação das amostras antes de proceder análises estruturais, para melhor elucidar a estrutura dos LPS.

6. CONCLUSÃO

- a) O Protocolo de purificação de LPS padronizado e utilizado neste trabalho se mostrou altamente eficiente, obtendo massa adequada de LPS para proceder os ensaios e ainda, para fornecer para algumas colaborações. O processo de fracionamento foi igualmente satisfatório, apesar de algumas contaminações de Kdo presentes na fração hidrofóbica (LipA).
- b) A coloração com prata apresentou perfil distinto do já descrito para LPS, mas este resultado era esperado devido ao LPS ser extraído após as cepas atingirem fase estacionária do crescimento. Para futura publicação, será necessário comparar o perfil de coloração com prata para purificação do LPS em fase estacionária e exponencial.
- c) Os anticorpos IgY produzidos pela cepa 'Vacinal' não foram capazes de reconhecer o LPS ATCC, apenas os LPS Campo e Vacinal, tanto sua fração lipídica quando a fração polissacarídica através de ELISA e WB.
- d) As estruturas dos LPS das diferentes cepas não foram completamente elucidadas, e ainda são necessários outros experimentos para melhor elucidar as diferenças estruturais entre as cepas Vacinal, Campo e ATCC. Entretanto, foi possível identificar variações importantes relacionadas com a composição de carboidratos da fração polissacarídica (OAg) e variações do comprimento de cadeia dos ácidos graxos do lipídeo A.
- e) A técnica de purificação de LPS e os LPS Vacinal e de Campo já são utilizados em diferentes trabalhos de colaboração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACD/LABS. ACD/ChemSketch 2015.2.5. , 2015.

ALEXANDER, C.; RIETSCHER, E. T. Invited review: Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, n. 3, p. 167–202, 2001. Disponível em: <<http://ini.sagepub.com.ezlibrary.technion.ac.il/content/7/3/167.abstract>>.

AVICULTURA PARANÁ. Anuário Paranaense da Avicultura. **Sindiavipar. Paraná, Brasil. Edição especial Nº 50, Janeiro/ fevereiro 2016.**, 2016.

BURNETTE, W. N. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195–203, 1981.

CARLANDER, D. **Avian IgY Antibody**. 2002.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 23, p. 2431–2447, 2003.

CENTRE FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Enteric Disease Surveillance : STEC Surveillance Overview**. 2011.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

COBURN, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Salmonella, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 112–118, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.icb.7100007>>.

COLEY, W. B. The Treatment of Inoperable Sarcoma by Bacterial Toxins (the Mixed Toxins of the Streptococcus erysipelas and the Bacillus prodigiosus). **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 3, n. Surg Sect, p. 1–48, 1910.

COWARD, C.; SAIT, L.; COGAN, T.; HUMPHREY, T. J.; MASKELL, D. J. O-antigen repeat number in Salmonella enterica serovar Enteritidis is important for egg contamination, colonisation of the chicken reproductive tract and survival in egg albumen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 343, n. 2, p. 169–176, 2013.

DAG, S. **Lipopolysaccharides and Extracellular Polysaccharides using NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry**. 2005.

DUNKLEY, K. D.; CALLAWAY, T. R.; CHALOVA, V. I.; et al. Foodborne Salmonella ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, v. 15, n. 1-2, p. 26–35, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.05.007>>.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. **Immunochemistry**, v. 8, n. 9, p. 871–874, 1971.

ERNST, R. K.; YI, E. C.; GUO, L.; et al. Specific Lipopolysaccharide Found in Cystic

Fibrosis Airway Pseudomonas aeruginosa. **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1561–1565, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.286.5444.1561>>.

FEARON, D. T.; LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science (New York, N.Y.)**, v. 272, n. 5258, p. 50–53, 1996.

FOLEY, S. L.; NAYAK, R.; HANNING, I. B.; et al. Population dynamics of Salmonella enterica serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273–4279, 2011.

GALANOS, C.; LUDERITZ, O.; RIETSCHEL, E. T.; et al. Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 148, n. 1, p. 1–5, 1985.

GALANOS, C.; LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 9, p. 245–249, 1969.

GUO, L.; LIM, K. B.; GUNN, J. S.; et al. Regulation of lipid A modifications by Salmonella typhimurium virulence genes phoP-phoQ. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5310, p. 250–253, 1997.

HELANDER, I. M.; LINDNER, B.; BRADE, H.; et al. Chemical structure of the lipopolysaccharide of Haemophilus influenzae strain I-69 Rd-/b+. **European Journal of Biochemistry**, v. 177, n. 3, p. 483–492, 1988. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14397.x>>.

HOLST, O.; ULMER, A. J.; BRADE, H.; FLAD, H. D.; RIETSCHEL, E. T. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 83–104, 1996.

INGBERMAN, M. **ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE FRANGO ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES CD80 E CD86 COM A PROTEINA CD28 RECOMBINANTE** ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE FRANGO ATRAVÉS DA INTERAÇÃO ENTRE OS RECEPTORES CD80 E CD86 COM A PROTEINA CD28 RECOMBINANTE, 2015.

IZQUIERDO-LÁZARO, L. **Biosíntesis del lipopolisacárido de Klebsiella Pneumoniae** Univesitat de Barcelona, 2003.

KAWAHARA, K.; SEYDEL, U.; MATSUURA, M.; et al. Chemical structure of glycosphingolipids isolated from Sphingomonas paucimobilis. **FEBS Letters**, v. 292, n. 1-2, p. 107–110, 1991.

KOGUT, M. H.; HE, H.; KAISER, P. Lipopolysaccharide binding protein/CD14/ TLR4-dependent recognition of salmonella LPS induces the functional activation of chicken heterophils and up-regulation of pro-inflammatory cytokine and chemokine gene expression in these cells. **Animal biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 165–181, 2005.

LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage- T4. **Nature**, v. 227, 1970.

LEQUIN, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2415–2418, 2005.

- LUTFUL KABIR, S. M. Avian colibacillosis and salmonellosis: A closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89–114, 2010.
- LUZYANIN, K.; ABRANTES, M. Ressonância Magnética Nuclear - Ferramenta Versátil em Química Farmacêutica e Imaginologia Médica. **Química, Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 117, n. 2, p. 25–30, 2010.
- MAPA. Aves - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves.>>. Acesso em: 9/2/2016.
- MIZUMOTO, N.; SASAI, K.; TANI, H.; BABA, E. Specific adhesion and invasion of Salmonella Enteritidis in the vagina of laying hens. **Veterinary Microbiology**, v. 111, n. 1-2, p. 99–105, 2005.
- OSTRO, M. J.; SILVERMAN, M. H. Bacterial Endotoxin in Human Disease. , p. 1–28, 1988.
- OSWALD, N.; KENNEDY, S.; HOGAN, M.; CARTWRIGHT, M. **10 Things Every Molecular Biologist Should Know**. Science Squared Ltd UK, 2012.
- PFEIFFER, R. Untersuchungen iiber das Cholera Gift-. **Springer- Verlag**, 1892.
- PORTAL BRASIL. Higiene no preparo de alimentos evita contaminação por Salmonella. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2015/01/higiene-no-preparo-de-alimentos-evita-contaminacao-por-salmonella.>>. Acesso em: 1/1/2016.
- PORTAL DO AGRONEGÓCIO. Paraná abate 3 mil frangos por minuto. Disponível em: <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/parana-abate-3-mil-frangos-por-minuto-139854.>>. Acesso em: 1/1/2016.
- RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, n. 1, p. 635–700, 2002. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>>. .
- REECE, J. B.; URRY, A. .; CAIN, M. .; et al. **Campbell Biology**. 2014.
- RENART, J.; REISER, J.; STARK, G. R. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 7, p. 3116–20, 1979. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/91164>\n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC383774>>.
- RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H.; HOLST, O.; et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 216, p. 39–81, 1996.
- RIETSCHEL, E. T.; CAVAILLON, J. M. Richard Pfeiffer and Alexandre Besredka: Creators of the concept of endotoxin and anti-endotoxin. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 15, p. 1407–1414, 2003.
- SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M. DE. Mass Spectrometry Strategies for Structural

Analysis of Carbohydrates and Glycoconjugates. **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology** » **"Tandem Mass Spectrometry - Molecular Characterization**, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/tandem-mass-spectrometry-molecular-characterization/mass-spectrometry-strategies-for-structural-analysis-of-carbohydrates-and-glycoconjugates>>.

SHENG, K. C.; POUNIOTIS, D. S.; WRIGHT, M. D.; et al. Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. **Immunology**, v. 118, n. 3, p. 372–383, 2006.

SONCINI, R. A. CONTROLE DE SALMONELLA ENTERITIDIS NA AVICULTURA Introdução Controle. , p. 1–6, 2000.

SUZUKI, S. Pathogenicity of Salmonella enteritidis in poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1-2, p. 89–105, 1994.

THERMO FISCHER SCIENTIFIC. Overview of ELISA. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/>>.

TIRSOAGA, A.; EL HAMIDI, A.; PERRY, M. B.; CAROFF, M.; NOVIKOV, A. A rapid, small-scale procedure for the structural characterization of lipid A applied to Citrobacter and Bordetella strains: discovery of a new structural element. **Journal of lipid research**, v. 48, n. 11, p. 2419–27, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17703058>>.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4, 1979. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=411572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 119, n. 1, p. 115–119, 1982.

WANG, X.; QUINN, P. J. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 2, p. 97–107, 2010. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2009.06.002>>.

WRAY, C.; WRAY, A. Salmonella in Domestic Animals. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 281–282, 2000.

ZARIRI, A.; VAN DER LEY, P. Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant. **Expert Review of Vaccines**, v. 14, n. 6, p. 861–876, 2015. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000354440700009>.