

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Novas abordagens para a vacinação animal contra a leptospirose: vacina de DNA com LipL32 e a utilização de IgY

Karina Colonetti

Pelotas, 2015

Karina Colonetti

Novas abordagens para a vacinação animal contra a leptospirose: vacina de DNA com LipL32 e a utilização de IgY

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Éverton Fagonde da Silva

Coorientador: Samuel Rodrigues Félix

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C719n Colonetti, Karina|

Novas abordagens para a vacinação animal contra a leptospirose: vacina de dna com lip132 e a utilização de igy / Karina Colonetti ; Everton Fagonde da Silva, orientador ; Samuel Rodrigues Félix, coorientador. — Pelotas, 2015.

54 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Leptospira. 2. Lip132. 3. Liga. 4. Anticorpos igy. 5. Vacina de dna. I. Silva, Everton Fagonde da, orient. II. Félix, Samuel Rodrigues, coorient. III. Título.

CDD : 614.56

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador, UFPel, Faculdade de Veterinária)

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin (UFPel, Centro de Desenvolvimento Tecnológico)

Prof. Dr. Geferson Fischer (UFPel, Faculdade de Veterinária)

Dr. Samuel Rodrigues Félix (UFPel, Faculdade de Veterinária)

Para minha família, com carinho, gratidão, saudades e muito, muito amor.

Dedico.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas, ao Centro de Biotecnologia e agências de fomento, que proporcionaram a realização destes e de outros trabalhos.

Ao meu Orientador, Éverton Fagonde da Silva, por toda a compreensão, ensinamentos e amizade.

Ao Marco Medeiros e toda a sua equipe, Odir Antônio Dellagostin, Andréia Anciuti e Juliana Diniz, aos queridos colegas de laboratório e do Centro de Biotecnologia em geral, sem o qual este trabalho não teria sido realizado.

Agradeço à minha família e em especial aos meus pais, Luzia Vanice Smânia Colonetti e Carlos Newton Colonetti (*in memoriam*) por todo o carinho, força e amor recebidos. Ao meu irmão, Cleber Colonetti, por me dar a tranquilidade que precisava pra continuar. À minha madrinha, Ana Vianice, que dentre muitos vinhos e saladas me ofereceu o conforto em forma de palavras e um ombro amigo. Agradeço por me ensinarem que a vida é muito mais do que eu poderia imaginar, e que o tempo que se passa com a família é sempre tempo de aprendizado. Com o apoio da família, com força, peito aberto, determinação e bons amigos, tudo se resolve.

Aos amigos queridos. Vocês são muito mais importantes do que pensam. Em especial, Francine, Amanda, Aline, Mariana, Bruno, Juliano, Samuel, Ane, Amilton, Najara. Levo vocês no meu coração, sempre!

A Deus, por ter me proporcionado uma família e amigos maravilhosos e por fazer as coisas acontecerem na hora certa.

Aos desafios enfrentados. Eles dão valor à conquista.

A todos vocês, minha profunda gratidão.

"I do not know what I may appear to the world, but to myself I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me."

Isaac Newton

Resumo

COLONETTI, Karina. **Novas abordagens para a vacinação animal contra a leptospirose: vacina de DNA com LipL32 e a utilização de IgY.** 2015. 55f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose humana e animal é uma doença de ocorrência mundial. Várias tentativas têm sido realizadas visando o desenvolvimento de novas abordagens para a prevenção, diagnóstico e tratamento da doença. No quesito vacinas, apesar de todos os esforços para criar uma alternativa à bacterina, esta continua sendo a forma predominante de prevenção, principalmente no que diz respeito à saúde animal. Assim sendo, este trabalho utiliza uma vacina de DNA com o plasmídeo comercial pVAX contendo o gene *lipL32* para a avaliação do potencial protetor em *Mesocricetus auratus*. O plasmídeo recombinante foi propagado em *E.coli* DH5- α , purificado em larga escala e transfectado em células HEK293 para análise funcional. Após a produção das vacinas, grupos teste de seis hamsters cada foram vacinados com duas doses de vacina de DNA (*prime-boost* homólogo) ou com uma dose de vacina de DNA e um *boost* proteico (*prime-boost* heterólogo). Dois experimentos foram realizados, diferindo na dose-desafio (5×10^2 e 10^3 leptospirosas vivas). Os animais foram desafiados 14 dias após a segunda dose. No experimento em que os animais foram inoculados com 5×10^2 leptospirosas, rim, fígado e pulmão foram coletados e avaliados por imunofluorescência indireta, cultura renal e ELISA. O experimento com desafio 10^3 foi avaliado apenas quanto à sobrevivência dos animais. Os animais que receberam duas doses da vacina de DNA apresentaram 100% de imunoproteção nos dois experimentos. Os animais vacinados com o *boost* proteico obtiveram proteção variável (50-100%). As técnicas de imunofluorescência e cultura renal não indicaram esterilidade tecidual e o ELISA não apresentou relação entre soroconversão e proteção, apesar da sobrevivência total dos animais vacinados no *prime-boost* homólogo. Neste estudo também abordamos a produção e purificação de anticorpos do tipo imunoglobulina Y (IgY). Após a imunização de duas galinhas raça *White Leghorn* com os antígenos rLipL32 ou rLigANI emulsificados em Montanide ISA 50 V2, os ovos foram coletados durante 30 dias. A imunoglobulina Y total foi purificada a partir da gema dos ovos com PEG 6000 para a obtenção dos anticorpos IgY totais. Para a purificação dos anticorpos anti-rLipL32 e rLigANI específicos, utilizou-se a ligação antígeno-anticorpo com desligamento por choque de pH seguido de neutralização. A quantificação foi realizada por espectrofotometria e a manutenção da funcionalidade confirmada por WB. Os anticorpos específicos foram purificados com sucesso através desta técnica.

Palavras-chave: *Leptospira*, LipL32, LigA, anticorpos IgY, vacina de DNA .

Abstract

COLONETI, Karina. **New approaches for animal vaccination against leptospirosis: DNA vaccine with LipL32 and the use of IgY.** 2015. 55f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The human and animal leptospirosis diseases are both worldwide spread. Several trials have been done regarding development of new approaches for prevention, diagnosis and treating of infection. Currently, bacterin vaccination is the predominant form of prevention, mainly in animal health. Due to side effects and short time of protection, this way tends to be replaced or optimized. This study proposes a DNA vaccine encoding LipL32 gene. Thus, the *lipL32* gene was cloned into a eukaryotic expression vector pVax, propagated in DH5- α *E. coli* strain and purified in large scale to obtain the vaccine doses. HEK cells were used in order to verify the eukaryotic expression. After vaccine production, hamsters were inoculated with two doses of DNA vaccine (homologous prime-boost) or one single dose of DNA vaccine plus one protein boost (heterologous prime-boost). Two experiments were done with different challenge doses (5×10^2 and 10^3 leptospores) 14 days after the second dose of vaccine. Once inoculated with 5×10^2 leptospores, kidneys, liver and lung were collected and evaluated by indirect immunofluorescence, ELISA and culture. The experiment which animals received 10^3 leptospiras was evaluated only in survival. At 24 days post-challenge, heterologous (50-100%) and homologous (100%) prime-boost strategies survived. Indirect immunofluorescence and kidney culture did not indicate sterile protection, as well as ELISA did not show relationship between seroconversion and protection, despite animal survival. Furthermore, this study also concern the production and purification of immunoglobulin Y (IgY). Two hens White Leghorn were immunized with rLipL32 or rLigANI antigens emulsified in Montanide ISA 50 V2. Eggs were collected for 30 days. Immunoglobulin Y was purified from the egg yolk with PEG 6000 to obtain the total IgY antibodies. The purification of specific anti-rLipL32 and rLigANI IgY, was done through antigen-antibody binding, following pH shock to release the specific antibodies and neutralization. Quantitation was performed by spectrophotometry and maintenance of the functionality was confirmed by WB technique. The specific antibodies was successfully purified.

Keywords: *Leptospira*, LipL32, LigA, IgY antibodies, DNA vaccines

Lista de Figuras

Figura 1. SDS-PAGE da proteína recombinante rLipL32..	31
Figura 2. Expressão de LipL32 em células HEK 293.	32
Figura 3. Resposta imune humoral anti-IgG total contra o antígeno rLipL32.....	33
Figura 4. Imunofluorescência indireta.....	34
Figura 5. Gel SDS-PAGE de IgY total e proteínas recombinantes..	41
Figura 6. Gel SDS-PAGE e Western Blot (WB) dos anticorpos IgY anti-rLipL32 específicos e IgY total anti-rLipL32.	42
Figura 7. Western Blot com anticorpos IgY anti-rLigANI específicos e IgY anti-rLigANI totais.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Grupos-teste e formulações vacinais utilizadas conforme grupo (n=6)....	28
Tabela 2. Sobrevivência conferida pela vacina recombinante com LipL32 contra desafio letal em hamsters.....	32
Tabela 3. Efeitos profiláticos, de sobrevivência e presença da bactéria nos órgãos de eleição.....	34

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>Leptospira</i> , leptospirose, LipL32 e LigA	15
2.2 Imunoglobulina Y (IgY).....	21
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	24
3.1 Hipóteses	24
3.2 Objetivo Geral	24
3.3 Objetivos Específicos.....	24
4 CAPÍTULO I – Avaliação do potencial protetor do plasmídeo pvax/LipL32 utilizado em uma vacina de DNA contra a leptospirose	25
4.1 Relatório de Atividades	25
4.1.1 Material e Métodos	25
4.1.1.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	25
4.1.1.2 Extração de DNA, PCR e Clonagem	25
4.1.1.3 Expressão de proteínas recombinantes	26
4.1.1.4 Vacinas de DNA	27
4.1.1.5 Transfecção de células HEK 293.....	27
4.1.1.5 Modelo experimental e considerações éticas	28
4.1.1.6 Grupos experimentais.....	28
4.1.1.7 Inoculação dos animais e coleta de material biológico	29
4.1.1.8 ELISA.....	29
4.1.1.9 Imunofluorescência e cultura renal	30
4.1.1.10 Cultura renal	30
4.1.1.11 Análises estatísticas	30
4.1.2 Resultados.....	31

4.1.2.1 Expressão de proteínas recombinantes e transfecção de células HEK	31
4.1.2.2 Imunoproteção	32
4.1.2.3 ELISA.....	33
4.1.2.4 Imunofluorescência e cultura renal	33
4.1.3 Discussão	35
4.1.4 Conclusão	37
4 CAPÍTULO II – Produção de anticorpos do tipo IgY específicos contra a proteína rLipL32 e rLigAni de <i>leptospira interrogans</i> cepa FIOCRUZ I1-130	38
4.2 Relatório de Atividades	38
4.2.1 Material e Métodos	38
4.2.1.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo.....	38
4.2.1.2 Obtenção e caracterização das proteínas recombinantes	38
4.2.1.3 Imunização das galinhas para produção de IgY anti- rLipL32 e anti-rLigAni	39
4.2.1.4 Obtenção dos anticorpos IgY totais e quantificação	39
4.2.1.5 Purificação dos anticorpos IgY específicos anti-rLipL32 e anti-rLigA .	40
4.2.1.6 Experimentação animal e considerações éticas	40
4.2.2 Resultados	41
4.2.2.1 Obtenção, caracterização e quantificação das proteínas recombinantes e anticorpos IgY totais	41
4.2.2.2 Purificação dos anticorpos IgY específicos anti-rLipL32 e anti-rLigA .	41
4.2.3 Discussão	43
4.2.4 Conclusão	44
5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	44
6 CONCLUSÃO GERAL.....	46
7 REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO GERAL

A leptospirose é uma doença endêmica global, que atinge, sobretudo, os países em desenvolvimento (Ko et al., 2009). Uma das formas de controle da doença é a vacinação de animais, os quais podem ser carreadores do patógeno (Dellagostin et al., 2011). A vacinação com DNA têm sido testada contra diferentes micro-organismos, apresentando resultados promissores (Cui, 2005). A resposta imune específica a um antígeno, tanto a celular quanto a humoral, pode ser estimulada pela inoculação intramuscular de um plasmídeo contendo DNA exógeno expresso sem a necessidade do uso de adjuvantes (Cui, 2005; Gurunathan; Klinman; Seder, 2000). A resposta imune celular contra a *Leptospira* já é relatada em bovinos e há indícios de que ela seja importante contra a bactéria também em outros modelos animais (Baldwin et al., 2002; Klimpel et al., 2003).

Poucos trabalhos foram publicados em relação às vacinas de DNA contra a leptospirose, e a alta sobrevivência dos grupos controle e uso de dose desafio subletal (Branger et al., 2005; Faisal et al., 2008; Baomin et al., 2000; Manewatch et al., 2007; He et al., 2008) não permitem uma avaliação efetiva das vacinas utilizadas, apesar de demonstrarem a potencialidade deste tipo de abordagem no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a leptospirose.

Nas últimas décadas, esforços para a identificação de componentes imunogênicos nas leptospirosas, com potencial para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos resultaram na caracterização de várias lipoproteínas que são expressas durante a infecção e amplamente reconhecidas pelo sistema imune, sendo a LipL32 a mais abundante no seu proteoma (Cullen et al., 2004, Haake, 2000). Vários trabalhos têm sido publicados indicando o potencial da proteína LipL32, a qual é altamente conservada nos sorovares patogênicos das espécies de *Leptospira*, sugerindo um papel importante durante a infecção (Murray, 2013).

A segunda parte deste trabalho é voltada à produção de IgY. A imunoterapia com anticorpos IgY de galinha é estudada para o controle experimental de enfermidades, tanto para uso humano quanto para uso animal: cárie dentária (Smith; King; Godiska, 2001), estafilococose (Leclaire; Hunt; Bavari, 2002) e coccidiose (Lee et al., 2009), por exemplo. Além disso, anticorpos IgY são encontrados em grande quantidade na gema do ovo, o processo de obtenção é rápido e diário, não interfere

no bem-estar do animal e elimina a necessidade de realizar a eutanásia destes, como ocorre em outros processos para a obtenção de anticorpos (Dias Da Silva & Tambourgi, 2010), sendo considerado um método ético e eficiente para a produção de anticorpos.

Recentemente, Vasconcellos et al. (2010) produziram anticorpos policlonais (IgY) contra *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, a maior causadora de leptospirose urbana no Brasil. Estes anticorpos foram testados em diferentes formatos de ELISA de captura de antígeno, obtendo resultados promissores na detecção de leptospiras em soros experimentalmente contaminados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Leptospira*, leptospirose, LipL32 e LigA

A leptospirose é uma zoonose de ocorrência mundial, com incidência de 873 mil casos severos e 49 mil mortes anuais (Picardeau et al., 2014). O gênero *Leptospira* inclui espécies saprofíticas e patogênicas, o qual pertence à família *Leptospiraceae*, ordem *Spirochaetales* (Faine et al., 1999). O agente etiológico da doença, bactérias patogênicas do gênero *Leptospira*, é classificado em mais de 260 sorovares. A bactéria compartilha características de gram-positivas e gram-negativas (Murray, 2013). O genoma possui dois cromossomos circulares, um com 4279 Kb e o outro com 350 kb. Não existem registros de plasmídeos para a espécie (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010).

Os principais transmissores da leptospirose são os animais infectados, os quais podem manifestar a doença de forma aguda ou crônica, podendo carrear as leptospirosas durante longos períodos e de forma assintomática (Bharti et al., 2003) eliminando-as contínua ou intermitentemente (Levett & Haake, 2009). Geralmente, a transmissão ocorre por contato direto ou indireto com a urina dos animais carreadores, através de água, solo ou alimentos contaminados (Bharti et al., 2003) (Levett, 2001), enquanto o contágio se dá pela penetração da bactéria na corrente sanguínea pelas membranas mucosas ou conjuntivas, mesmo que intactas, ou pela pele com abrasões e cortes (Levett & Haake, 2009). Uma vez na corrente sanguínea, passam por uma fase de multiplicação (leptospirose), e a invasão das barreiras teciduais, podendo atingir o sistema nervoso central e o humor aquoso. A migração transendotelial do patógeno é facilitada por uma vasculite sistêmica, o que ocasiona o amplo espectro clínico da doença (Arean, 1962). Após esta etapa, o patógeno é capaz de se alojar em qualquer órgão, e sua apresentação clínica dependerá do sistema ou sistemas envolvidos (Rathinam, 2002). A patogênese da leptospirose ainda não é claramente compreendida.

O teste de referência para o diagnóstico da leptospirose é a soraglutinação microscópica (MAT), um ensaio laborioso que utiliza cepas vivas de leptospirosas para a triagem dos soros suspeitos para a doença. O teste possui baixa sensibilidade, especialmente na fase inicial da doença (WHO, 2003; McBride et al. 2005), uma vez que o sistema imune do infectado leva alguns dias para produzir níveis

detectáveis de anticorpos contra a leptospira (WHO; 2003). A confirmação de um caso de leptospirose pode, ainda, ser realizada através do isolamento do patógeno em cultivo com meios de cultura específicos, porém, como a bactéria é fastidiosa, o tempo requerido por esta técnica não permite seu uso como rotina laboratorial, fazendo com que o diagnóstico da leptospirose seja baseado principalmente em métodos sorológicos (Faine et al. 1999; WHO, 2003).

Uma das formas de controle da doença é a vacinação de animais, os quais podem ser carreadores do patógeno (Dellagostin et al., 2011). As vacinas contra leptospirose são, em sua maior parte, compostas por bacterinas, e sua resposta protetora é direcionada majoritária, mas não exclusivamente contra o LPS (Adler & de la Peña Moctezuma, 2010). A proteção oriunda da bacterina é de curta duração e problemática em vários aspectos, como reações adversas e proteção relativa somente aos sorovares presentes na composição vacinal (Adler & de la Peña Monctezuma, 2010). Novas formulações e estratégias vacinais, baseadas principalmente em técnicas de biologia molecular são amplamente estudadas para estes fins.

A vacinação com DNA têm sido testada contra diferentes micro-organismos, apresentando resultados promissores (Cui, 2005). A resposta imune específica a um antígeno, tanto a celular quanto a humoral, pode ser estimulada pela inoculação intramuscular de um plasmídeo contendo DNA exógeno expresso, sem a necessidade do uso de adjuvantes. A resposta imune celular contra a *Leptospira* já é relatada em bovinos, onde a estimulação via Th1 mostrou-se importante, indicando que a estimulação da resposta imune celular pode desempenhar um importante papel na imunidade contra o patógeno (Baldwin et al., 2002). Essa hipótese vem sendo cada vez mais aceita diante da descrição do papel da resposta mediada por células contra *Leptospira*, baseada em Th1 CD4⁺ com produção de interferon gama (INF- γ) pelas células gama-delta ($\gamma\delta$ T) (Klimpel et al., 2003; Naiman et al., 2001). Alguns trabalhos foram publicados com relação a vacinas de DNA contra a leptospirose (Branger et al., 2005; He et al., 2008; Faisal et al., 2008; Maneewatch et al., 2007; Foster et al., 2013), reforçando ainda mais a importância da resposta imune celular para a doença (Faisal et al., 2008).

Branger et al. (2005), utilizaram um plasmídeo contendo o gene para hap1 (LipL32), de dois sorovares diferentes de *L. interrogans*: Autumnalis e Grippotyphosa (os genes diferem em um aminoácido). Os animais (*Meriones unguiculatus*)

receberam duas doses de 100 µg de plasmídeos recombinantes, com intervalo de três semanas. Três semanas após a última dose, os animais foram desafiados com 10^7 *L. interrogans* sorovar Canicola. Este experimento contou com 60% de imunoproteção nos grupos vacinais, entretanto, 35% do grupo controle sobreviveu. He et al. (2008) utilizaram uma vacina de DNA contendo o gene para a proteína de membrana externa LipL21, a segunda mais abundante da bactéria, em guinea pig (*Cavia porcellus*) contra *L. interrogans* sorovar Lai. Todos os animais sobreviveram ao desafio. Faisal et al. (2008) testaram uma vacina de DNA com LigA em hamsters (*Mesocricetus auratus*). As vacinas de DNA foram administradas em dois formatos, ambos com a proteína truncada. A primeira diz respeito a proteína em sua porção conservada (DNA/LigAcon) e a segunda, com a porção variável (DNA/LigAvar). Após três doses com intervalo de duas semanas entre elas, os animais foram desafiados com uma dose sub-letal de 10^8 leptospiras (*L. interrogans* sorovar Pomona), o que resultou numa sobrevivência de 60% do grupo-controle. Maneewatch et al. (2007), estudaram uma vacina de DNA contendo OmpL1, que codifica para uma porina transmembrana oriunda de *L. interrogans* sorogrupo Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni. O plasmídeo contendo o gene foi administrado em três doses de 100 µg, com intervalo de duas semanas entre as doses. O desafio foi realizado com *L. interrogans* sorogrupo e sorovar Pomona uma semana após a última dose da vacina. A formulação não protegeu de forma significativa. Foster et al. (2013), testaram cinco formas diferentes de vacina de DNA, uma com LigAi e outra quatro com formas truncadas de LigB em hamsters. Após a administração de duas doses de 100 µg das vacinas de DNA a serem testadas, com intervalo de 21 dias entre elas, e após três semanas da última dose, os animais foram desafiados com 5x DL50% de *L. interrogans* sorovar Copenhageni cepa Spool. A vacina contendo o gene para a forma truncada denominada LigBni obteve o melhor resultado, atingindo 60% de sobrevivência no grupo.

A LipL32 é a proteína mais abundante nas leptospiras patogênicas. Ela não está presente nas saprofíticas, possui aproximadamente 38 mil cópias por célula, sendo muito superior numericamente a outras proteínas presentes em grande número, como a FlaB, Loa22, LipL21 e LipL41, além de ser bem conservada (Malmstrom et al, 2009, Murray, 2013). Como o alto número de proteínas demanda um custo energético significativo para a célula, presume-se que exista uma função biológica importante por trás da proteína. Apesar de ter massa molecular predita em

27,6 kDa, em géis de do tipo SDS-PAGE corados com *comassie blue*, seu peso aparente é de 32 kDa, devido a resíduos ácidos que reduzem a ligação ao SDS (Haake, 2000).

A proteína LipL32 apresenta cerca de 94% de conservação entre as principais espécies. Esse índice de conservação cai para cerca de 67% apenas em *L. broomii*, *L. inadai* e *L. licerasiae*, consideradas de patogênese intermediária (Murray, 2013). A proteína possui 272 aminoácidos com 19 resíduos de lipidação na sequência sinal (Haake et al., 2000). Dois estudos diferentes mostraram uma estrutura cristalina muito similar, onde a LipL32 é representada por uma estrutura compacta, globular e com um dobramento do tipo barril-beta (Hauk et al., 2009; Vivian et al., 2009). Dois padrões de carga eletronegativa superficiais foram identificados, e há possibilidade de que eles mediem interações com ligantes de cargas positivas. A proteína foi cristalizada como um dímero, e este arranjo pode ser biologicamente importante, uma vez que as áreas de sobreposição poderiam esconder epítomos do reconhecimento pelo sistema imune (Vivian et al., 2009).

Leptospiras mutantes para o gene foram construídas por meio de transposons (Murray et al., 2009). O estudo demonstrou que o gene não é necessário para a bactéria, de forma que a taxa de crescimento e morfologia apresentados pelo mutante foram normais. A análise de *microarray* mostrou que 34 genes foram superexpressos, embora nenhum com uma taxa de expressão maior que 2,6 vezes, indicando que não houve compensação pela perda da proteína. Dos genes superexpressos, sete estão envolvidos com o metabolismo da cobalamina e grupos heme, o que vem ao encontro de um outro estudo, onde havia a indicação inicial de que a LipL32 poderia estar associada à hemólise (Hoon et al., 2000). Entretanto, este último estudo não foi corroborado por estudos adicionais, que não encontraram similaridades com outras proteínas hemolíticas. O efeito *in vivo* dos mutantes para LipL32 demonstrou que a proteína não exerce função na doença em hamsters ou colonização em ratos. Entretanto, ainda pode haver influência na virulência, envolvendo fatores como disseminação na doença, rota de infecção transdermal ou mucosa nos hospedeiros carreadores (Murray et al., 2009). Também pode ser uma proteína requisitada quanto à sobrevivência no ambiente, conforme similaridades encontradas em estudos prévios com patógenos marinhos (Hoke et al., 2008).

Quanto ao aspecto imunológico, LipL32 é o antígeno dominante na resposta imune humoral, reconhecido pelo soro de 95% dos pacientes com leptospirose (Flannery et al., 2001; Guerreiro et al., 2001; Luo et al., 2010). Este fato a torna um alvo natural nas pesquisas de desenvolvimento vacinais e diagnóstico. A imunização passiva com anticorpos monoclonais anti-LipL32 foi capaz prevenir a lise de células sanguíneas *in vitro* e de proteger hamsters da infecção letal frente à desafio heterólogo (Maneewatch et al., 2008). Entretanto, a imunidade desenvolvida ao antígeno não é protetora quando a proteína recombinante é administrada com adjuvante de Freund ou hidróxido de alumínio (Branger et al., 2005; Lucas et al., 2011), apesar de apresentar proteção parcial quando administrada vetorizada por BCG ou com a subunidade β da enterotoxina termolábil de *E. coli* (Seixas et al. 2007; Grassmann et al., 2012). Experimentos com a proteína demonstraram que mesmo onde há uma forte resposta humoral frente ao antígeno, não existe proteção significativa. Para tal, contribui o fato de que a proteína está presente na face interna da membrana externa (Pinne & Haake, 2013). Sabe-se que o gene é *down* regulado durante a infecção *in vivo* (Cullen, 2005) tendo, além disso, uma expressão diferencial em modelos suscetíveis e resistentes, com uma expressão maior nos animais suscetíveis (Matsui, 2012). A proteína é capaz de ativar receptores do tipo Toll-Like 2 (TLR-2), sinalizando para o reconhecimento desta e de outras proteínas em células epiteliais renais dos tubos proximais de ratos (Yang et al, 2005).

Recentemente, demonstrou-se que na proteína LipL32 isolada diretamente de ratos infectados existem mudanças pós-traducionais no padrão de acetilação ou trimetilação, enquanto na *Leptospira* cultivada *in vitro* essas modificações nos resíduos de lisina não estão presentes. A construção de um peptídeo sintético com a trimetilação nos resíduos de lisina demonstrou menor reatividade com o soro de pacientes com leptospirose, sugerindo que essas modificações podem alterar o reconhecimento pelo sistema imune, existindo a possibilidade de uma mudança funcional que contribui para a persistência da bactéria durante a infecção (Witchell et al., 2014).

Além da LipL32, outros importantes fatores de virulência foram identificados, incluindo as proteínas de membrana externa conhecidas como Lig (*Leptospiral immunoglobulin-like proteins*). Estas proteínas possuem domínios da superfamília Big (*bacterial immunoglobulin-like*) repetidos em tandem, presente apenas em leptospiros patogênicas. Este grupo proteico conta com dois genes e um pseudogene (*ligA*, *ligB*

e *ligC*, respectivamente), os quais são estreitamente relacionados com a virulência (Matsunaga et al., 2003). A expressão destes genes em culturas, particularmente no que se refere ao *ligA*, é relacionada com o número de passagens *in vitro*. Cultivos de alta passagem deixam de expressar a proteína; porém, *in vivo*, a expressão é aumentada. As condições de osmolaridade fisiológicas aumentam as taxa de expressão dos genes *lig* (Matsunaga et al., 2005).

A LigA é uma proteína de membrana externa (OMP) de 130kDa, a primeira de leptospira a ser descrita como contendo 12 ou mais repetições em tandem e também é a primeira a ser expressa durante a infecção (Palaniappan et al., 2002). Possui 1224 aminoácidos e pode ser dividida em dois segmentos, levando em conta sua similaridade com LigB. A parte inicial, de seis domínios N- terminais, é muito similares a presente na proteína LigB. A segunda parte, composta de seis domínios carboxi-terminais é única (Koizumi; Watanabe, 2004), dando origem ao termo LigANI, correspondendo aos nucleotídeos 1873-3675, referente aos aminoácidos 625-1224 (Silva et al., 2007). A proteína está presente de forma conservada nas leptospiros patogênicas *L. interrogans* e *L. kirschneri* (Mcbride et al, 2009). *L. interrogans* sorovar Lai é o único isolado desta espécie no qual LigA não foi encontrado (Rem et al, 2003). Tanto LigA quanto LigB são capazes de ligarem-se a componentes da matriz extra celular e fibrinogênio, envolvidos na interação com o hospedeiro (Choy et al., 2007). A diversidade de ligantes relatados a família Lig, poderiam, então, estar relacionados a diversos estágios da patogênese, os quais incluem processos críticos de adesão.

Imunologicamente, as proteínas Lig são majoritariamente reconhecidas pelo hospedeiro durante a infecção aguda (Matsunaga et al., 2003). A localização do antígeno na membrana externa e sua similaridade entre os sorovares patogênicos torna-o um importante alvo de estudos. Os resultados de testes de imunoproteção relatados para LigA apresentadas de diversas formas são variáveis, com sobrevivência de 50 a 100% (Faisal et al., 2008, Koizumi; Watanabe, 2004; Palaniappan et al., 2006; Silva et al., 2007). Kanagevel e colaboradores (2014), produziram a porção C-terminal de LigA (LigA-C) e dois epítomos específicos deste mesmo segmento para fins diagnósticos. Quando utilizados em ELISA para pacientes na fase aguda da leptospirose, a fração proteica atingiu 92,1% de sensibilidade, 97,7% de especificidade e 92,8% de valor preditivo positivo e 97,5%

de valor preditivo negativo. O uso dos epítomos específicos aumentou de 5,1 a 5,8% a sensibilidade do teste quando comparado a LigA-C.

A inexistência de um teste laboratorial com sensibilidade e especificidade confiáveis para a fase aguda da leptospirose, principalmente para os grupos de risco (McBride et al., 2005), que seja rápido e barato, em conjunto com a dificuldade diagnóstica em razão das manifestações clínicas da enfermidade, as quais são similares a outras doenças infecciosas, como gripe, dengue e malária (Adler & de la Peña Monctezuma, 2010), em conjunto com as limitações do emprego da bacterina como principal forma de vacinação, torna o desenvolvimento de novas estratégias vacinais e diagnósticas de suma importância no combate à enfermidade.

2.2 Imunoglobulina Y (IgY)

Anticorpos do tipo IgY são os mais proeminentes em aves. Inicialmente considerado semelhante a IgG de mamíferos, hoje sabe-se que é um ancestral evolutivo comum da IgG e IgE (Warr et al., 1995). Uma vez que os genes V-C são rearranjados nas células B, a IgY é continuamente sintetizada e secretada no sangue, de onde é transferida para a gema do ovo, ficando ali acumulada (Warr et al., 1995). Isto proporciona à cria uma proteção humoral efetiva até que eles sejam capazes de produzir seus próprios anticorpos (Chen et al., 1989). Além da IgY, também são produzidas IgM e IgA. Existem indícios, embora não comprovados da produção de IgD e IgE (Chen et al., 1989; Burns & Maxell, 1981). A molécula IgY possui de 167 a 250 kDa, está presente no sangue em grandes quantidades, onde é transferida para o ovo (50-100 mg) (Carlander et al., 2002). Também é encontrada nos conteúdos duodenais, secreções traqueais e fluido seminal (Lesle & Clem, 1969). A secreção de IgY inicia seis dias após a eclosão. Com a secreção pelas células B diretamente na corrente sanguínea, atingem uma concentração constante de 1-1,5 mg/ml de soro. Ao longo da vida reprodutiva do animal, essa concentração se mantém estável pelo processo contínuo de síntese e transferência. Ao contrário da IgY, IgM e IgA estão presentes, mas são praticamente indetectáveis na gema do ovo (Carlander et al., 2002). A transferência de IgY para o interior do ovo começa com a aderência no saco vitelino onde eles se ligam a receptores Fc específicos pH dependentes. A concentração da IgY na gema varia significativamente entre indivíduos (3-7 mg/ml) (Carlander et al., 2001), linhagens genéticas e raça (Leghorn

Single Comb White, 2,2-0,4 mg/ml, Rhode Island Red, 1,7-0,5 mg/ml), (Carlander et al, 2002; Gross et al., 1990). A quantidade de IgY transferida parece ser independente do tamanho do ovo (Dohms et al, 1978; Bollen et al, 1997).

O peso molecular mínimo de um antígeno para se obter uma resposta imunológica suficiente em aves é similar aos de mamíferos, de 5 a 10 KDa, podendo ser aplicado a antígenos de origem natural ou sintética. Apesar da imunogenicidade de um peptídeo depender largamente da sequência de aminoácidos e da substância carreadora deste antígeno (uso ou não de adjuvantes, bem como seu tipo), estima-se que concentrações de 100 a 250 µg de peptídeo por imunização pode ser aplicada (Alving, 1997). Em galinhas, o título máximo de anticorpos pode ser obtido, segundo Mahn (1998), utilizando uma concentração de antígenos variável de 10 µg a 1 mg.

Os anticorpos do tipo IgY são encontrados em grande quantidade na gema do ovo, o processo de obtenção é rápido e diário, não interfere no bem-estar do animal e elimina a necessidade de realizar a eutanásia destes, como ocorre em outros processos para a obtenção de anticorpos (Dias da Silva & Tambourgi, 2010). Além de ser considerado um método ético e eficiente para a produção de anticorpos, a obtenção de anticorpos IgY em galinhas é menos onerosa do que o similar em outras espécies animais, além de ser mais adequada aos padrões de bem-estar animal. A produção de anticorpos de uma galinha corresponde a de um animal de grande porte. Desta maneira, aproximadamente 17 a 35 g de IgY total/galinha/ano pode ser produzido, dos quais 1-10% pode ser específico para o antígeno (Schade et al., 1994).

Uma substancial vantagem do uso de IgY é a inabilidade para reações cruzadas com fatores reumatóides, pela ausência dos sítios de ligação no Fc correspondente. A IgY também não reage com IgG ou IgM, nem com os componentes do sistema complemento de mamíferos, não acarretando em reações cruzadas que poderiam causar resultados falso-positivos em imunoenaios e ainda, reduzindo a interferência de alguns fatores do complemento em testes (Dias da Silva & Tambourgi, 2010).

Vários estudos vêm sendo publicados com IgY, principalmente na área odontológica (Smith, King & Godiska, 2001; Sugano, 2012; Yoshiaki et al, 2014;) e para imunoterapia em animais e humanos (Chalghoumi et al., 2009; Kovacs-Nolan, 2012). Proteção contra patógenos como *Salmonella enteritidis*, *Salmonella e.*

typhimurium, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* ETEC, rotavirus murinho e bovino e coronavírus bovino em ratos, suínos e bezerros foram obtidos por imunoterapia utilizando anticorpos IgY (Chalghoumi et al., 2009). Em adição, a produção de IgY contra leptospiros inteiras ou proteínas recombinantes constitui-se em uma alternativa de baixo custo quando comparada a produção de anticorpos em mamíferos. O processo de produção de IgY consiste em imunizações das galinhas em intervalos regulares, com conseqüente produção de IgY sérica e transferência para a gema do ovo. A quantidade obtida no ovo dependerá da concentração sérica.

Apesar de haver uma gama de trabalhos realizados associando IgY à patógenos bacterianos (Chalghoumi et al., 2009), os trabalhos relativos à *Leptospira spp.* ainda são poucos. Vasconcellos et al. (2009) demonstraram a potencialidade desses anticorpos quando aplicados como anticorpos de detecção à um teste diagnóstico contra o patógeno, associados ao anticorpo de captura mAB 1D9. Diniz (2012) produziu e caracterizou anticorpos IgY anti-rLipL32 de *Leptospira interrogans*, tentando imunização passiva com este anticorpo. No formato utilizado, não houve proteção. Em 2013, Tavares et al. produziram e caracterizaram anticorpos IgY contra dois tipos de antígenos: uma suspensão de 14 sorovares de *L. interrogans* (Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippytyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi e Wolffi) integrais inativadas e proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, para fins de imunodiagnóstico em testes de ELISA. Os anticorpos não foram testados em soros suspeitos ou experimentalmente contaminados no estudo.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

O plasmídeo comercial pVAX, com o inserto codificante para LipL32 protege hamsters do desafio letal.

A produção de imunoglobulinas Y (IgY) anti-rLipL32 e anti-rLigA específicas é possível a partir de anticorpos totais produzidos contra estes antígenos recombinantes.

3.2 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi testar, por meio da experimentação animal em *Mesocricetus auratus*, que a construção vacinal utilizada como vacina de DNA é eficiente em promover a sobrevivência dos animais quando frente ao desafio.

Produzir e purificar IgY específicos anti-rLipL32 e anti-rLigANI.

3.3 Objetivos Específicos

- Produzir em larga escala o plasmídeo recombinante pVAX/LipL32 e a proteína rLipL32;
- Testar a vacina de DNA pVAX/LipL32 em modelo experimental suscetível (*Mesocricetus auratus*), através do desafio letal com cepa homóloga (Fiocruz L1-130);
- Produzir IgY total anti-rLipL32;
- Produzir IgY anti-rLigANI;
- Purificar IgY anti-rLipL32 específica;
- Purificar IgY anti-rLigANI específica.

4 CAPÍTULO I – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROTETOR DO PLASMÍDEO pVAX/LIPL32 UTILIZADO EM UMA VACINA DE DNA CONTRA A LEPTOSPIROSE

4.1 Relatório de Atividades

4.1.1 Material e Métodos

4.1.1.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

A cepa *L. interrogans Icterohaemorrhagiae* sorovar Copenhageni FIOCRUZ L1-130 (Nascimento et al., 2004) foi utilizada em todas as etapas. As bactérias foram cultivadas a 30°C em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) (Difco Laboratories®) enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco®) em estufa bacteriológica (B.O.D) sob condições aeróbicas. A contagem de células foi realizada em câmara de *Petroff-Hausser* (Thomas Scientific®). As cepas de *E. coli* utilizadas foram DH5α para a clonagem e replicação de plasmídeos das vacinas de DNA, Top10F para a clonagem que deu origem ao vetor de expressão das proteínas recombinantes e BL21 STAR (DE3) para a expressão das proteínas recombinantes. Todas as cepas foram crescidas em meio LB a 37°C, na presença de antibiótico apropriado quando necessário (50 µg/ml de canamicina ou 100 µg/ml de ampicilina).

4.1.1.2 Extração de DNA, PCR e Clonagem

Todos os procedimentos para a obtenção das proteínas recombinantes foram realizados no laboratório de Vacinologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (CDTec/UFPel). Os primers foram desenhados a partir da sequência depositada no GenBank sob o número de acesso NC005823, derivada do sequenciamento da cepa Fiocruz L1-130, com o auxílio do software Vector NTI 10.0 (Invitrogen). Os fragmentos amplificados por PCR foram clonados no vetor pAE (Ramos et al., 2004), checados em gel de agarose 1% e purificados utilizando o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE), seguindo orientações do fabricante. Os fragmentos foram digeridos com enzimas de restrição

e re-purificados com o mesmo kit. O vetor pAE foi digerido e purificado pelos mesmos métodos. Para a reação de ligação, utilizou-se T4 DNA ligase (Invitrogen) em concentrações equimolares do inserto e do vetor. A reação de ligação foi mantida a 16°C por 2 h. O produto da reação foi utilizado para transformar células competentes de *E. coli* TOP10F. As colônias que cresceram nas placas foram submetidas ao processo de triagem rápida pelo método *microprep* (Jouglard et al., 2002). Os clones que apresentaram o plasmídeo pAE mais o inserto foram selecionados e cultivados individualmente em 5 ml de LB líquido acrescido de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina, 37°C overnight. Utilizou-se 3 ml para extração de DNA plasmidial através do *GFXTM Micro Plasmid Prep Kit* (Amersham Biosciences) e o DNA resultante foi submetido a digestão com enzimas de restrição, a fim de checar a presença e orientação do inserto. *E. coli* BL21 STAR (DE3) foi transformada com os plasmídeos resultantes da transformação e cultivadas em 5 ml sob as mesmas condições anteriormente descritas.

4.1.1.3 Expressão de proteínas recombinantes

Do cultivo contendo *E. coli* STAR transformada, 1 ml foi utilizado como inóculo em 9 ml de LB líquido acrescido de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ampicilina e a cultura incubada a 37°C até atingir DO 600 de 0,5 a 0,7. Neste momento, a cultura foi fracionada em duas alíquotas de igual volume, sendo uma induzida com 1mM de isopropil β -D-tiogalactosídeo (IPTG) e a outra não induzida, ambas incubadas durante 3 h e 30 min. Ao final do cultivo coletou-se uma alíquota (1 ml) de cada amostra, centrifugou-se 14.000 x g por 1 minuto e o *pellet* foi utilizado para verificar a expressão em pequena escala das proteínas recombinantes, através de uma eletroforese em um SDS-PAGE com extrato proteico total de cada clone, como descrito por Sambrook e Russell (2001). A expressão e a antigenicidade da proteína recombinante foi também confirmada através da técnica de *Western blotting* (Sambrook & Russell, 2001) utilizando anticorpo monoclonal anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma) na diluição 1:3000, conforme instruções do fabricante, ou soro de humano convalescente para leptospirose, cedido pela Fiocruz-BA. Após este processo, procedeu-se a expressão em balões de Erlenmeyer de 2 L, com 0,5 L de meio e a purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-

Sepharose. A proteína resultante foi quantificada pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce) e checada novamente por SDS-PAGE e *Western blotting* conforme descrito anteriormente.

4.1.1.4 Vacinas de DNA

Os plasmídios pVAX e pVAX/LipL32 para as vacinas de DNA foram obtidos em parceria com a FIOCRUZ, Laboratório de Tecnologia Recombinante- LATER, Biomanguinhos. Após a caracterização das vacinas de DNA mediante sistema eucarioto, os plasmídios foram novamente propagados em cepa *E. coli* DH5- α , em meio LB com canamicina em sistema de larga escala (500 ml) e purificados com o kit *NucleoBond[®] Xtra Maxi Plus* (Macherey - Nagel), armazenados a -20°C.

4.1.1.5 Transfecção de células HEK 293

A caracterização foi realizada pela transfecção de células HEK293 com o plasmídio para sistema de expressão eucarioto pVAX (Invitrogen[®]), sem o inserto e com o inserto para LipL32 (pVAX/LipL32) em uma placa de seis cavidades utilizando Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen[®]) de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, 1,5 μ L de Lipofectamine[®] 2000 e 36 μ L de meio livre de soro foram misturados e incubados por 5 min a temperatura ambiente e 500 ng de DNA foi adicionado e incubado a 20 min. Após, outros 500 μ L de meio livre de soro foi adicionado e a mistura final foi incubada em placa de seis cavidades a 37°C. Quarenta e oito horas depois da transfecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e lisadas com tampão de lise contendo SDS (Tris 50 mM, pH 6,8, DTT 50 mM, SDS 2%, glicerol 10%, PMSF 100 μ g. μ L⁻¹, leupepetina 10 μ g. μ L⁻¹ e bromofenol blue 0,1%) por 10 min no gelo. Os lisados celulares foram fervidos e centrifugados a 12.000 x g a 4°C por 10 min. As soluções do sobrenadante foram coletadas e analisadas por *Western Blotting* (WB) (Sambrook; Russell, 2001), utilizando anticorpo anti-LipL32 conjugado com peroxidase e revelação com DAB/H₂O₂.

4.1.1.5 Modelo experimental e considerações éticas

Hamsters sírios capa dourada (*Mesocricetus auratus*) de 4 semanas de idade foram obtidos da unidade de criação do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os animais foram alocados no setor de experimentação do mesmo biotério e mantidos de acordo com as normas éticas vigentes, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este trabalho faz parte de um projeto cadastrado no COCEPE/UFPel sob o número 5.00.00.019, tendo sido analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel. O processo encontra-se registrado sob o número 23110.004657/2010-84.

4.1.1.6 Grupos experimentais

Foram realizados dois experimentos independentes para as vacinas compostas por LipL32. Cada um dos grupos experimentais foi composto por dois grupos teste propriamente ditos e seus respectivos controles: pVAX/LipL32 e pVAX/LipL32+rLipL32/ Al(OH)₃ como grupos-teste; pVAX e pVAX + Al(OH)₃ como seus respectivos controles (Tabela 1). Além destes, mais dois grupos controle adicionais foram utilizados como controle de desafio, um grupo bacterina e um grupo PBS. Cada um dos seis grupos foi composto por 6 animais (n=36), para cada experimento. Os volumes finais de inoculação foram ajustados para 250 µL. Para o primeiro experimento de imunoproteção com a vacina de DNA pVAX/LipL32 a dose desafio foi de 5x10² leptospiras vivas. No segundo teste de imunoproteção a dose desafio foi de 10³ leptospiras vivas.

Tabela 1. Grupos de hamsters (n=6) e formulação das doses utilizadas no experimento, conforme grupo.

Grupo	1ª dose	2ª dose
pVAX	100 µg pVAX	100 µg DNA pVAX
pVAX + Al(OH) ₃	100 µg pVAX	PBS + 15% Al(OH) ₃
pVAX/LipL32	100 µg pVAX/LipL32	100 µg DNA pVAX/LipL32
pVAX/LipL32 + rLipL32/ Al(OH) ₃	100 µg pVAX	40 µg rLipL32 + 15%Al(OH) ₃
PBS	250 µL PBS	250 µL PBS
Bacterina	10 ⁸ células inativadas em PBS	10 ⁸ células inativadas em PBS

4.1.1.7 Inoculação dos animais e coleta de material biológico

Os animais de todos os experimentos foram inoculados no dia 0 e 14, via intramuscular e desafiados dia 28 após o início do experimento, duas semanas após a segunda dose vacinal, via intraperitoneal. As coletas de sangue para o ELISA foram realizadas no dia 0, 14 e 28, previamente às inoculações, via punção do plexo retro-orbital. O experimento foi dado como encerrado aos 52 dias do início do mesmo, 24 dias após o desafio, com a eutanásia dos animais sobreviventes. Para os animais que vieram a óbito durante os experimentos, rins, fígado e pulmões foram coletados para os ensaios de cultura renal e imunofluorescência indireta (IF). Para os animais sobreviventes, os mesmo órgãos foram coletados após a eutanásia. Durante a necropsia, foi realizada a análise macroscópica dos órgãos para lesões características da doença. As coletas dos órgãos foram realizadas apenas nos experimentos com dose desafio de 5×10^2 leptospiros vivas como triagem para a esterilidade conferida pelas formulações vacinais.

4.1.1.8 ELISA

Para o ELISA indireto, 10 μ L do soro de cada um dos animais que compunham os diferentes grupos originaram o *pool* do grupo correspondente. Este *pool* foi utilizado para todos os ensaios deste tipo. Inicialmente, microplacas de 96 poços foram sensibilizadas com 50 ng do antígeno rLipL32 por cavidade. A etapa de sensibilização ocorreu *overnight* a 4°C. Após, as placas foram lavadas com PBS-T por três vezes, e bloqueadas por 1 h a 37°C com solução de lavagem adicionada de leite em pó desnatado 1%. Novas lavagens foram realizadas e os soros diluídos (1:50) foram adicionados às cavidades e mantidos à 37°C por mais uma hora. Após novas lavagens, adicionou-se conjugado anti-IgG total de hamster sírio conjugado à peroxidase (1:6000), seguindo-se uma nova etapa de incubação, nas condições previamente citadas. Após cinco lavagens, solução de revelação foi adicionada às placas. Depois de um período de incubação de 15 min à temperatura ambiente, a reação foi parada com ácido sulfúrico 4 N. As densidades ópticas foram obtidas a 492 nm.

4.1.1.9 Imunofluorescência e cultura renal

Rim direito, fígado e pulmão de todos os animais foram coletados e a técnica de imunofluorescência foi realizada conforme descrito anteriormente por Chagas Júnior et al. (2009). Brevemente, os órgãos foram cortados ao meio e pressionados sobre as lâminas preparadas com poli-L-lisina e fixadas com acetona. As lâminas foram, então, hidratadas três vezes e bloqueadas com solução de BSA 0,4% por 40 min. Após lavagem, foram incubadas com anticorpo anti-*Leptospira* inteira, produzido em coelhos e incubadas durante 1 h. Lavaram-se as lâminas e adicionou-se anti-coelho conjugado a FIT-C. Após novo período de incubação, as lâminas foram lavadas e montadas para a leitura em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX 51).

4.1.1.10 Cultura renal

O rim esquerdo de todos os animais foi coletado e macerado para fins de cultura. O macerado do órgão foi incubado durante 1 h em meio EMJH suplementado em estufa B.O.D a 37°C. Após este período, 500 µL de sobrenadante foram repicados para novos tubos do tipo *falcon* contendo meio EMJH fresco. As culturas foram avaliadas semanalmente, a partir do vigésimo dia em cultura, por dez semanas.

4.1.1.11 Análises estatísticas

Os testes de Fisher, *LogRank Test*, e o Teste *T de Student* foram utilizados para as análises de mortalidade, sobrevivência e ELISA, respectivamente. Todas as análises estatísticas e os gráficos de sobrevivência foram confeccionados no programa *Prisma 4 for Windows* versão 4.03.

4.1.2 Resultados

4.1.2.1 Expressão de proteínas recombinantes e transfecção de células HEK

As proteínas recombinantes expressas foram caracterizadas por SDS-PAGE e WB e quantificadas por BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce) (Figura 1). As proteínas já caracterizadas foram utilizadas como controles no gel de transfecção. A técnica de WB para a caracterização das construções plasmidiais em células HEK 293 apresentaram as massas moleculares esperadas para rLipL32 tanto no extrato celular quanto no sobrenadante. Nenhuma banda foi verificada nos controles de células transfectadas com o vetor sem o inserto ou não transfectadas (Figura 2). Estes resultados confirmaram a expressão celular da vacina de DNA, bem como o reconhecimento pelos anticorpos anti-LipL32.

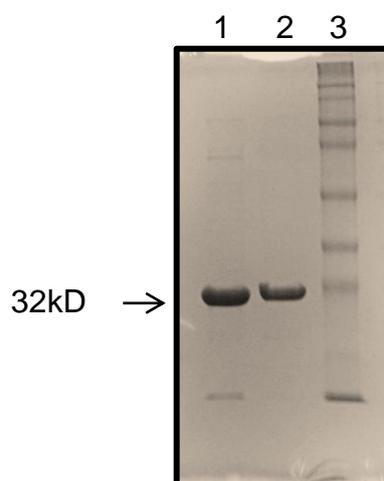


Figura 1. SDS-PAGE da proteína recombinante rLipL32. Na coluna 1, rLipL32 previamente caracterizada (C+) e na coluna 2, lote vacinal. Na coluna 3, marcador de peso molecular Rainbow Molecular Weight Markers Full Range (GE Life Sciences).

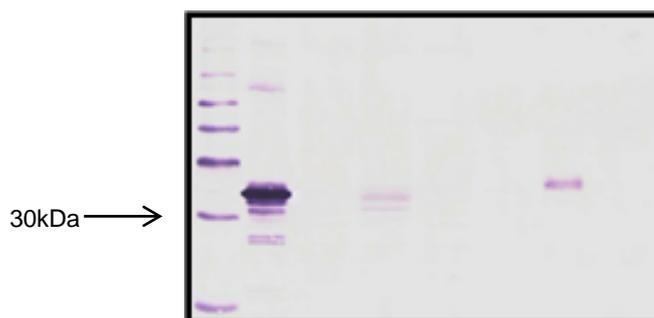


Figura 2. Expressão de LipL32 em células HEK 293. WB com anticorpo monoclonal anti-LipL32 conjugado com peroxidase. Coluna 1, marcador molecular Magic Mark (Invitrogen®); coluna 2, 1µg de LipL32; coluna 3, extrato celular do controle de células; coluna 4, extrato celular de pVAX/LipL32; coluna 5, extrato celular de pVAX; coluna 6, extrato celular do controle de células; coluna 7, sobrenadante cultivo celular transfectado com pVAX/LipL32; coluna 8, sobrenadante do cultivo transfectado com pVAX.

4.1.2.2 Imunoproteção

As formulações baseadas em um plasmídeo vacinal recombinante contendo o inserto codificante para a proteína LipL32 foram capazes de promover proteção significativa nos dois experimentos, tanto para o desafio com 5×10^2 quanto para 10^3 leptospiras vivas (Tabela 2).

Tabela 2. Sobrevivência conferida pela vacina recombinante com LipL32 contra desafio letal em hamsters.

Grupos	Sobreviventes/Total (%)			
	E1 ^{f a}	D.P.O.	E2 ^{m, b}	D.P.O.
1- pVAXLipL32	6/6 (100)	-	6/6 (100) ^{(a)(b)}	-
2- pVAXLipL32 / rLipL32 + Al(OH) ₃	6/6 (100)	-	3/6 (50) ^(c)	8, 10, 12
3- pVAX	3/6 (50)	9, 10, 12	0/6 (0)	8, 8, 8, 8, 8, 8
4- pVAX / Al(OH) ₃	3/6 (50)	9, 10, 11	0/6 (0)	8, 8, 8, 10, 12, 15
5- PBS	0/6 (0)	9, 9, 9, 11, 11, 10	0/6 (0)	-
6- Bacterina	6/6 (100)	-	6/6 (100)	-

Legenda:

* f = fêmeas; m = machos; **^a = dose desafio 5×10^2 ; ^b = dose desafio 10^3

^(a) proteção estatisticamente significativa $p=0,0009$, quando a sobrevivência foi comparada com o grupo controle negativo (pVAX) no *Logrank Test*; ^(b) proteção estatisticamente significativa $p=0,002$ quando a mortalidade foi comparada com o grupo controle negativo (pVax) no *Fisher's Test*; ^(c)

proteção estatisticamente significativa $p=0,005$ quando a sobrevivência foi comparada com o grupo controle negativo [pVAX / Al(OH₃)] no *Logrank Test*.

D.P.O.= dias para óbito

4.1.2.3 ELISA

O ELISA indireto foi realizado para todos os experimentos. Não houve correlação entre soroconversão e proteção (Figura 3). Entretanto, todos os animais dos grupos vacinados com duas doses de pVAX/LipL32 sobreviveram ao desafio, em ambos os experimentos.

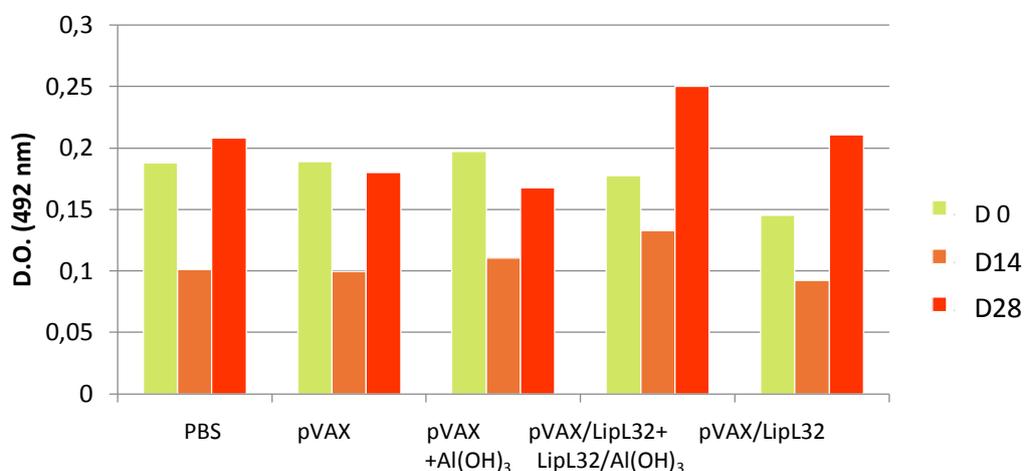


Figura 3. Resposta imune humoral anti-IgG total contra o antígeno rLipL32.

4.1.2.4 Imunofluorescência e cultura renal

Os animais vacinados com as formulações à base de LipL32 não apresentaram culturas renais positivas. Na imunofluorescência, os positivos dos mesmos animais apresentaram frequência reduzida quando comparado aos seus respectivos grupos controle. Ainda, dois animais do grupo bacterina foram positivos para a técnica de imunofluorescência. Um deles, para o tecido renal e pulmonar. Estes mesmos animais foram negativos para a técnica de reisolamento. A análise dos órgãos dos animais sobreviventes dos grupos pVAX e pVAX + Al(OH)₃ revelou que apenas um dos animais não apresentava imunofluorescência e/ou cultura renal positiva. Um dos animais do grupo controle (pVAX) que veio a óbito no décimo segundo dia pós-desafio não apresentou caráter positivo para ambas as técnicas.

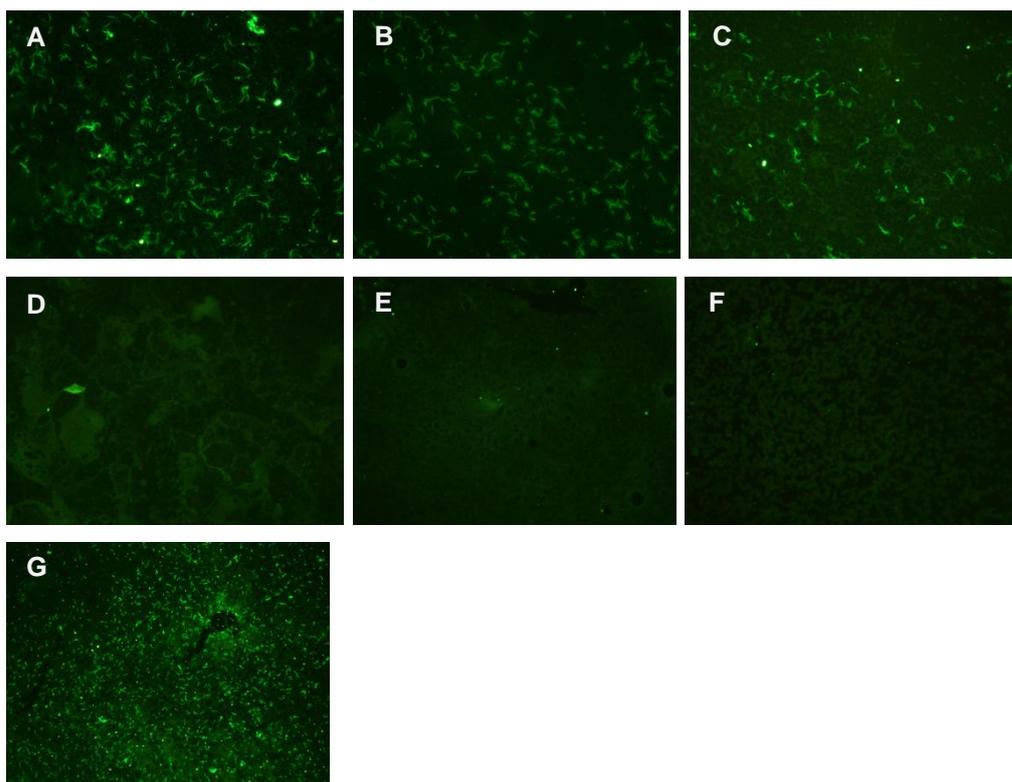


Figura 4. Imunofluorescência indireta. Tecidos (A) renal, (B) hepático e (C) pulmonar de animais positivos. Tecidos (D) renal, (E) hepático e (F) pulmonar de animais negativos (não desafiados). Em (G), animal do grupo PBS, desafiado.

Tabela 3. Efeitos profiláticos em termos de sobrevivência e presença nos órgãos de eleição.

Grupos	Sobreviventes (Sobrevivente/total)	Reisolamento (Positivos/total)	Imunofluorescência (Positivos/total)		
			Rim	Fígado	Pulmão
			pVAX	3/6	1/6
pVAX + Al(OH) ₃	3/6	4/6	3/5*	3/5*	2/3*
pVAX/LipL32 + rLipL32/Al(OH) ₃	6/6	0/6	1/6	2/6	1/6
pVAX/LipL32	6/6	0/6	2/6	1/6	1/6
PBS	0/6	4/6	6/6	4/6	6/6
Bacterina	6/6	0/6	2/6	0/6	1/6

*Órgãos não coletados por apresentarem sinais característicos da doença, como hemorragia petequiral difusa, icterícia, baço aumentado.

4.1.3 Discussão

Neste estudo demonstramos que o uso de LipL32, quando apresentada ao sistema imune através de plasmídeo de expressão em eucariotos, é capaz de produzir imunidade protetora em modelo experimental para leptospirose. Vários trabalhos têm sido publicados indicando o potencial da proteína LipL32, a qual é uma proteína considerada como candidata ao desenvolvimento de uma vacina contra a leptospirose (Murray, 2013). Dessa forma, nosso estudo realizou a abordagem para avaliar o potencial imunoprotetor de LipL32 quando apresentada de diferentes formas: como vacina de DNA com *boost* de DNA ou proteína.

O grupo vacinal cujos animais receberam somente o plasmídeo contendo o inserto codificante para LipL32 mostrou uma imunoproteção maior do que todos os outros grupos vacinais no desafio com 10^3 leptospiras. Este dado foi surpreendente, uma vez que estudos demonstram que mutantes para LipL32 não interferem no processo de infecção (Murray et al., 2009) e que a LipL32 é uma proteína localizada na face interna da membrana externa (Pine, Haake, 2013), e não uma proteína de membrana externa. Apesar de anticorpos monoclonais anti-LipL32 terem demonstrado efetividade na proteção passiva de animais (Maneewatch et al., 2008), sinalizando para uma resposta imune humoral, as vacinas com a abordagem de administração da proteína recombinante LipL32, de forma vetorizada ou não, com ou sem o uso de adjuvantes, não demonstrou ser eficiente na proteção dos animais imunizados, ainda que estes respondessem com altos títulos de anticorpos. O melhor resultado para LipL32 foi obtido com 60% de imunoproteção, quando vetorizado por BCG viva expressando a proteína (Seixas et al., 2007). Estes resultados foram obtidos em modelo animal hamster e é o único que conta com esterilidade vacinal. Neste estudo, não houve esterilidade tecidual, evidenciada pela presença de leptospiras tanto na IF quanto na cultura renal dos animais vacinados, ou detecção de soroconversão significativa. Ainda assim, é o primeiro trabalho a demonstrar proteção absoluta em termos de sobrevivência de animais vacinados somente com a formulação pVAX/LipL32, em dois experimentos independentes.

A imunidade estéril é um marcador secundário muito importante em avaliações de candidatos vacinais, tendo em vista que as vacinas comerciais utilizadas em animais não previnem a leptospirose (Adler; Moctezuma, 2010). No grupo bacterina, houve presença de leptospiras na IF renal de dois animais e

pulmonar de um animal, apesar de não ser verificado o crescimento em cultura. O isolamento através da cultura é considerado o padrão-ouro na detecção direta de leptospiras em amostras biológicas (WHO, 2003). Entretanto, uma série de fatores pode prejudicar a eficácia e viabilidade da detecção de leptospiras na cultura (Faine, 1999; Levett, 2001; Adler e Moctezuma, 2010), entre elas, a presença de contaminantes, o que ocasiona potenciais falsos negativos. A imunofluorescência e a cultura do macerado renal, em conjunto, potencializam a detecção do micro-organismo. A imunofluorescência é uma técnica que só identifica leptospiras inteiras e não diferencia leptospiras viáveis de não viáveis (Chagas Júnior, 2009). Além disso, a avaliação macroscópica durante a necropsia e a análise histopatológica realizada em órgãos como pulmões, fígados e rins, pode determinar padrões de manifestações patológicas semelhantes ao que ocorrem em humanos e animais ou, até mesmo, determinar novos padrões de ocorrência relacionados a novos sorovares (Athanzio et al., 2008). A utilização de *Mesocricetus auratus* como modelo experimental reflete esta afirmação, uma vez que este modelo é acometido por síndrome pulmonar hemorrágica relacionada à leptospirose de forma semelhante à que ocorre em humanos. Houve, ainda, presença de pulmões com hemorragia difusa ou petequial, icterícia e baço aumentado, sinais macroscópicos para animais doentes por leptospirose em todos os animais necropsiados que vieram a óbito.

Atualmente, não existe uma vacina contra a leptospirose humana aceita mundialmente. Na área animal, a vacinação é empregada desde a década de 50 (Faine et al., 1999). Porém, novas estratégias têm sido utilizadas para a diminuição da disseminação das leptospiras patogênicas entre os rebanhos, devido às grandes perdas econômicas causadas pelas infecções. Assim, a prioridade está sendo no desenvolvimento de vacinas que gerem uma resposta imune efetiva e inibam a eliminação de leptospiras através da urina (Dellagostin et al., 2011). Apesar de não verificarmos uma esterilidade dos órgãos nos animais vacinados com pVAX/LipL32, tanto pela imunofluorescência quanto pela cultura renal, os animais sobreviventes do grupo vacinado com pVAX/rLipL32 foram negativos para a cultura renal e apresentaram um menor número de órgãos positivos na imunofluorescência indicando redução da carga bacteriana no órgão. Recentemente, demonstrou-se que animais imunizados com a proteína rLipL32 previamente ao desafio apresentaram uma diminuição na colonização renal de *L. interrogans* sorovar Canicola, reduzindo

a severidade das lesões renais, apesar de não demonstrar proteção significativa em termos de sobrevivência (Humphryes et al., 2014).

4.1.4 Conclusão

A formulação vacinal com a construção pVAX/LipL32 quando administrada em duas doses iguais (100 µg) protege 100% dos hamsters. A administração de pVAX/LipL32 + rLipL32 confere proteção variável (50 a 100%) quando administrada nas doses testadas.

4 CAPÍTULO II – PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DO TIPO IGY ESPECÍFICOS CONTRA A PROTEÍNA rLipL32 e rLigAni DE *Leptospira interrogans* CEPA FIOCRUZ L1-130

4.2 Relatório de Atividades

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

As bactérias *Leptospira* foram crescidas em meio EMJH (Difco), enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) em estufa bacteriológica a 29°C. A expressão da proteína recombinante foi realizada em *E. coli* BL21 (DE3) Star™. Para a técnica de WB as leptospiros foram centrifugadas a 10.000×g, por 10 min. O sedimento foi lavado com PBS, pH 7,2 por 3 vezes e a concentração ajustada para 10⁸ células.ml⁻¹ após contagem em câmara de Petroff-Hausser, de onde seguiram para a inativação a 56°C por 30 min e estocagem a -20°C até o uso.

4.2.1.2 Obtenção e caracterização das proteínas recombinantes

Todos os procedimentos para a obtenção das proteínas recombinantes foram realizados no laboratório de Vacinologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas (CDTec/UFPel), conforme descrito no capítulo anterior (Páginas 18 e 19). Os primers foram desenhados a partir da sequência depositada no GenBank sob o número de acesso NC005823 derivada do sequenciamento da cepa Fiocruz L1-130, com o auxílio do software Vector NTI 10.0 (Invitrogen).

O vetor recombinante pET/LigANI foi obtido segundo Silva et al., (2007) e utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star™. Na fase de crescimento logarítmico do cultivo, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1mM de IPTG durante 4h. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. A proteína recombinante purificada foi caracterizada por SDS-PAGE e Western Blotting (WB) e quantificada pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce).

O vetor recombinante pAE/LipL32 foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star™. Na fase de crescimento logarítmico do cultivo, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1 mM de IPTG durante 4 h. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. A proteína recombinante purificada foi caracterizada por gel em SDS-PAGE e Western Blotting (WB) e quantificada pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce).

4.2.1.3 Imunização das galinhas para produção de IgY anti- rLipL32 e anti-rLigAni

Foram utilizadas quatro galinhas poedeiras de 29 semanas de idade, da raça Leghorn obtidas no Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG/IFSUL). As aves foram selecionadas e alojadas em cercados dentro da matriz no CAVG, compondo duas unidades experimentais, com umidade e ventilação controladas. O programa de luz seguiu o recomendado pelo manual da linhagem. O alimento foi fornecido através de comedouro tipo calha, localizado dentro do cercado, com mais de 10 cm/ave. As aves tiveram livre acesso à água através de dois bebedouros tipo *nipple*. As galinhas foram imunizadas via intramuscular com 100 µg de rLipL32 ou rLigA emulsificadas em adjuvante oleoso (Montanide ISA 50 V2), totalizando um volume de 500 µL por dose. Realizaram-se quatro imunizações com intervalo de 15 dias entre cada imunização. Amostras de 3 a 5 ml do sangue de cada ave foram coletados nos dias 0, 15, 30 e 45, através da punção da veia ulnar. O soro foi armazenado a -20°C até o uso. Anteriormente às imunizações, a produção de anticorpos de interesse foi verificada por ELISA indireto do soro dos animais. Os ovos foram coletados durante trinta dias, a partir do terceiro dia após última imunização (dia 48) e estocados a 4°C até o uso.

4.2.1.4 Obtenção dos anticorpos IgY totais e quantificação

A extração da IgY total da gema foi realizada utilizando precipitação por polietilenoglicol (PEG 6000) (Pauly et al., 2011). Brevemente: retirou-se a maior quantidade de clara possível com auxílio de um separador de gemas e papel filtro. A gema foi homogeneizada com PBS e foram adicionados 3,5% (w/v) de PEG,

seguido por uma homogeneização de 10 min em agitador rotativo de cilindros. Os tubos foram então centrifugados por 20 min a 4°C e o sobrenadante descartado. As etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas por mais duas vezes, após a adição de 8,5% (w/v) de PEG, quando o sobrenadante foi novamente descartado e o pellet dissolvido em 1 ml de PBS e após a adição de 12% (w/v) de PEG. O pellet resultante foi dissolvido em 800 µL de PBS e acrescido mais 400 µL, para completar o volume necessário para a diálise. O extrato foi dialisado por 8 h em solução salina 0,1% seguido por mais 3 h de diálise em PBS. A concentração de IgY foi mensurada através de quantificação por método de Lowry modificado pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce) e espectrofotometria a 280 nm com fator de correção de 1,33. As amostras foram estocadas a -20°C até o uso.

4.2.1.5 Purificação dos anticorpos IgY específicos anti-rLipL32 e anti-rLigA

Quinhentos microgramas de rLipL32 ou rLigA foram colocados sobre uma membrana de nitrocelulose (8,5 cm x 5 cm) (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare). Após secagem a temperatura ambiente, a membrana foi incubada com 50 ml de leite em pó 5% em PBS por uma hora a temperatura ambiente. A membrana foi, então, incubada com 10 ml de IgY total durante 2 h a temperatura ambiente, sob agitação. Após a remoção do líquido, a membrana foi lavada uma vez com PBS-T e no mínimo três vezes com PBS. Mediu-se a densidade óptica a 280 nm, e uma vez estando abaixo de 0,1, procedeu-se o choque de pH com tampão glicina pH 2,3 por tempos que variaram de 2,5 min a 15 min. Imediatamente, o eluído foi neutralizado com tampão tris 100 mM pH 8,00 a uma razão de 2:1, respectivamente. A concentração final do anticorpo purificado foi medida por espectrofotometria a 280 nm, em cubetas de quartzo, com fator de correção de 1,33.

4.2.1.6 Experimentação animal e considerações éticas

A experimentação animal deste trabalho conta com o registro no COCEPE/UFPel, número 5.00.00.020. A análise pela Comissão de Ética em Experimentação Animal

(CEEAA) da UFPel, encontra-se registrada pelo processo nº 23110.004657/2010-84. Os animais foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2.2 Resultados

4.2.2.1 Obtenção, caracterização e quantificação das proteínas recombinantes e anticorpos IgY totais

A obtenção dos anticorpos por método de precipitação com PEG 6000 foi realizada com sucesso, bem como a purificação da proteína recombinante (Figura 5). A quantificação do anticorpo a 280 nm apresentou uma D.O. de 3,00. Levando em consideração o fator de correção de 1,33 e o cálculo pela lei de Lambert-Beer a concentração final foi de $2,25 \text{ mg/ml}^{-1}$. Para a proteína recombinante, utilizou-se o mesmo lote descrito no capítulo anterior (Figura 1). A concentração obtida foi 1 mg/ml^{-1} . Para a proteína rLigA, a concentração final foi de $0,5 \text{ mg/ml}^{-1}$.

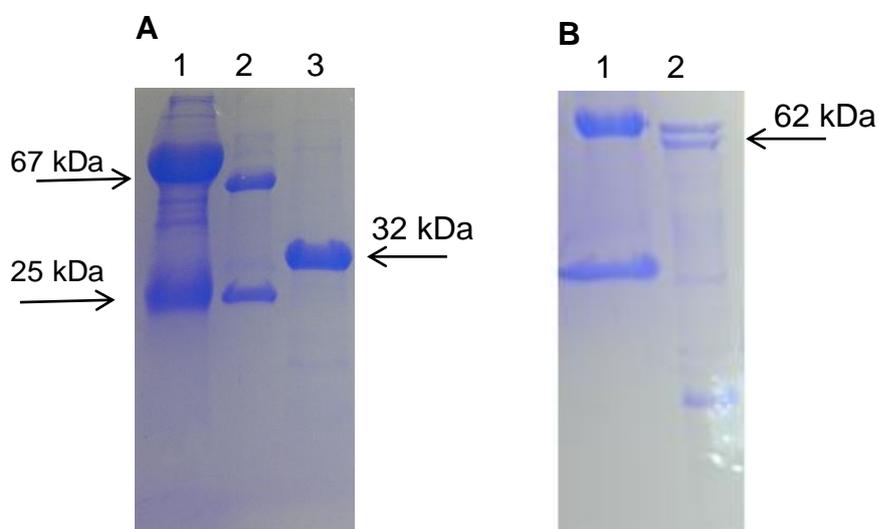


Figura 5. Gel SDS-PAGE de IgY total e proteínas recombinantes. (A) Em 1, IgY total 1:2; 2, IgY total 1:20; e 3, rLipL32. (B) Em 1, IgY total 1:20; e 2, rLigANI.

4.2.2.2 Purificação dos anticorpos IgY específicos anti-rLipL32 e anti-rLigA

Após a purificação dos anticorpos IgY totais, a etapa de purificação para a obtenção dos anticorpos IgY específicos foi realizada por afinidade antígeno-anticorpo e desligamento por choque de pH seguido de neutralização. A purificação dos anticorpos específicos resultou numa perda de cerca de 90% na quantidade dos anticorpos originais. Os resultados obtidos e a diferença de reação entre anticorpos totais e antígeno-específicos são mostrados nas figuras 6 e 7. Utilizou-se a mesma quantidade de anticorpos para as reações.

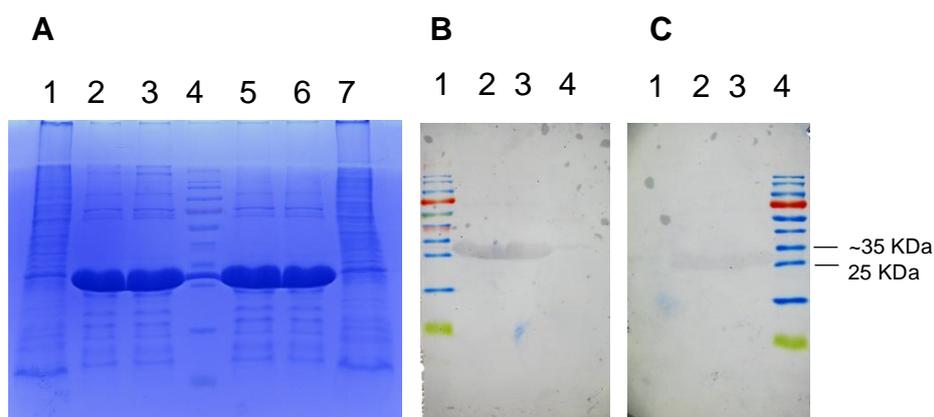


Figura 6. Gel SDS-PAGE e Western Blot (WB) dos anticorpos IgY anti-rLipL32 específicos e IgY total anti-rLipL32. (A) Colunas 1 Bacterina; 2 e 3 rLipL32; 4 Marcador de peso molecular; 5 e 6 rLipL32; 7 Bacterina. (B) WB IgY purificada. 1 marcador de peso molecular Page Ruler Prestained protein ladder (Thermo Scientific); 2 e 3 rLipL32; 4 bacterina. (C) WB IgY não purificada. 1 bacterina; 2 e 3 rLipL32; e 4, marcador de peso molecular.

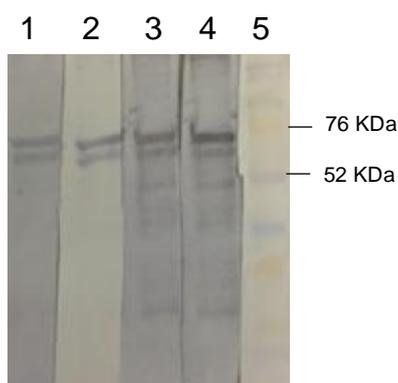


Figura 7. Western Blot com anticorpos IgY anti-rLigANI específicos e IgY anti-rLigANI totais. 1, Anticorpo específico purificado (1:250); 2 Anticorpo específico purificado (1:1000); 3 IgY total (1:1000); 4 IgY total (1:250). 5. Marcador molecular Full-Range Amersham Rainbow Marker.

4.2.3 Discussão

Anticorpos policlonais (PAbs) possuem uma série de vantagens quando comparados aos anticorpos monoclonais (MAbs). Sua forma de produção é mais rápida, barata e exige habilidades técnicas menos específicas do que aquelas requeridas para a produção de MAbs. Quando analisados sob a ótica da quantidade de epítomos que podem reconhecer, os MAbs podem perder sua afinidade caso ocorram mudanças no epítomo a que se destinam. Este problema é consideravelmente menor nos PAbs, uma vez que uma mudança não inibiria a ligação a outros epítomos proteicos. Entretanto, tal fator também torna os anticorpos policlonais menos reprodutíveis que os anticorpos monoclonais, uma vez que são oriundos da produção de várias células B, e não de um único hibridoma, que pode ser cultivado e reproduzido de forma padrão. Justamente por ser capaz de reconhecer vários epítomos, pode haver reconhecimento cruzado com outras proteínas que apresentem um padrão semelhante. Anticorpos policlonais frequentemente possuem uma melhor especificidade que anticorpos monoclonais, e para aumentar a especificidade de anticorpos monoclonais, múltiplos MAbs podem ser utilizados, mas este método aumenta ainda mais o custo final da técnica em que são utilizados (Lipman et al., 2005).

A escolha da espécie para a produção de PAbs é relevante, uma vez que a quantidade de anticorpos obtida é proporcional ao tamanho do animal. Comumente, são utilizados coelhos, ovelhas e cabras, não só pelo tamanho, mas também pela facilidade de acesso ao sistema vascular, natureza e robustez da resposta imune. Destes, o animal mais utilizado é o coelho, que apesar de requer a imunização de vários animais com o mesmo antígeno para garantir uma resposta imune adequada, é mais fácil e menos caro para manter (Harlow & Lane, 1988). O uso de galinhas para a obtenção de anticorpos policlonais torna possível aliar a fácil obtenção através da coleta do ovo, sem a necessidade do isolamento dos anticorpos através do sangue. A quantidade de IgY obtida durante uma semana pela coleta dos ovos é de até dez vezes aquela obtida pela coleta de sangue de coelhos durante o mesmo período (Gassmann et al., 1990).

Anticorpos monoclonais anti-LipL32 oriundos de *L. interrogans* sorogrupo/sorovar Icterohaemorrhagiae já foram utilizados com sucesso na proteção de hamsters contra infecção letal heteróloga (*L. interrogans* sorogrupo/sorovar

Pomona) (Maneewatch et al., 2009), demonstrando o potencial deste tipo de abordagem para a imunoterapia. Ainda, anticorpos do tipo IgY são de fácil obtenção e purificação, aliado ao alto rendimento. Este tipo de anticorpo não interfere com as imunoglobulinas de mamíferos (fator reumatoide) ou com os anticorpos anti-mouse humanos (HAMA- *human anti-mouse antibody*), além de não interferir com o sistema complemento (Schade et al., 2005), tornando múltiplas doses mais seguras, pois reduz risco de choque anafilático.

A etapa de purificação de anticorpos antígeno-específicos reduziu em cerca de 90% a quantidade total dos anticorpos. Sabe-se, entretanto, que a quantidade de anticorpos antígeno-específicos são apenas 1 -10 % dos anticorpos totais (Schade et al, 1994). Portanto, em se tratando de anticorpos específicos, uma grande quantidade de anticorpos totais é necessária para que se obtenha uma quantidade adequada e suficiente de anticorpos específicos através do método utilizado.

4.2.4 Conclusão

- Realizou-se com sucesso a produção de IgY anti-LipL32 e IgY anti-LigANI, bem como a extração das IgY totais.
- A obtenção de IgY anti-LipL32 e IgY anti-LigANI específicos foi possível utilizando o método de ligação antígeno-anticorpo seguido de desligamento por choque de pH.

5 DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

O plasmídeo de DNA pVAX/LipL32 demonstrou ser eficiente em promover a proteção dos animais quando estes foram submetidos ao desafio letal com cepa virulenta. A análise em conjunto das técnicas de imunofluorescência e cultura renal proporcionaram uma visão melhor não só do espectro de proteção oferecido pela vacina, uma vez que bacterinas, apesar de serem negativas para a cultura renal, apresentaram imunofluorescências positivas e animais sobreviventes dos grupos controle apresentaram imunofluorescência e cultura renal positivas, mas também de adequação da dose-desafio. A técnica de imunofluorescência apesar de não

diferenciar leptospiras viáveis das não viáveis (Chagas Júnior et al., 2009), é importante a fim de reconhecer a presença das bactérias nos órgãos de eleição.

O resultado promissor dos experimentos mediante desafio letal instiga-nos a investigar o espectro de proteção da vacina de DNA. Outros sorovares e espécies da bactéria deverão ser testados nos próximos experimentos a fim de elucidar esta questão.

Obtemos e purificamos anticorpos policlonais de galinha contra as proteínas conservadas de leptospiras patogênicas LipL32 e LigA (segmento não idêntico). A partir dos anticorpos totais, obtivemos anticorpos policlonais específicos contra as proteínas de interesse, numa tentativa de reduzir ao máximo anticorpos oriundos do contato com outros antígenos. Os anticorpos policlonais possuem a vantagem de reconhecimento de vários epítomos de uma mesma proteína, o que aumenta seu poder de detecção quando comparado aos anticorpos monoclonais, mas também potencializa reações cruzadas com epítomos semelhantes de outras proteínas. Ainda, são mais baratos e de fácil produção (Lipman et al., 2005). Uma vez eliminando anticorpos inespecíficos, pode-se partir para a avaliação de sua real capacidade de detecção, levando em conta as possíveis reações cruzadas.

Futuramente, as imunoglobulinas Y totais, bem como as imunoglobulinas específicas anti-LigA e anti-LipL32 purificadas, devem ser testadas em ensaios de imunoterapia e também quanto ao seu potencial quanto à capacidade de detecção do patógeno, inclusive em técnicas de imunohistopatologia e imunofluorescência, após conjugação.

6 CONCLUSÃO GERAL

- A formulação vacinal com a construção pVAX/LipL32 quando administrada em duas doses iguais (100 µg) protege 100% dos hamsters testados.
- A administração de pVAX/LipL32 + rLipL32 confere proteção variável (50 a 100%) quando administrada nas doses testadas.
- A produção e purificação de IgY específica contra LipL32 e IgY específica contra rLigANI é possível através dos métodos utilizados.
- A IgY anti-LipL32, purificada por choque de pH é capaz de reconhecer a proteína nativa.

7 REFERÊNCIAS

- ADLER, B. & DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. (2010). *Leptospira* and leptospirosis. *Veterinary microbiology*. 140(3-4). p. 287–96..
- ALVING, C.R. (1997). Liposomes as adjuvants for vaccines. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS (eds) *New generation vaccines*, 2nd, Marcel Decker, New York, p. 207–213.
- AREÁN, V. M. (1962). The pathologic anatomy and pathogenesis of fatal human leptospirosis (Weil's disease). *American Journal of Pathology*. 40. p. 393-423.
- ATHANAZIO, D. A., SILVA, E. F., SANTOS, C. S., ROCHA, G. M., VANNIER-SANTOS, M. A., MCBRIDE, A. J. A., KO, A. I., REIS, M. G. (2008). *Rattus norvegicus* as a model for persistent renal colonization by pathogenic *Leptospira interrogans*. *Acta Tropica*. 105. p. 176–180.
- BALDWIN, C.L., SATHIYASEELAN, T., NAIMAN, B., WHITE, A.M., BROWN, R., BLUMERMAN, S., ROGERS, A. & BLACK, S.J. (2002). Activation of bovine peripheral blood gd T cells for cell division and IFN- g production. 87. p. 251–259.
- BAOMIN, D., ZILI, Y., ZHUANG, C., HEPING, Y., ZHIMAO, F. (2000). Protection against leptospirosis by immunization with plasmid DNA encoding 33 kDa endoflagellin of *L. interrogans* serovar Lai. *Chinese Medical Science Journal*. 15(1). p.14-19.
- BHARTI, A.R., NALLY, J.E., RICALDI, J.N., MATTHIAS, M.A., DIAZ, M.M., LOVETT, M.A., LEVETT, P.N., GILMAN, R.H., WILLIG, M.R., GOTUZZO, E. & VINETZ, J.M. (2003). Reviews Leptospirosis : a zoonotic disease of global importance. *The Lancet Infectious Diseases*. 3 (12). p. 757–771.
- BOLLEN, L. S. & HAU, J. (1997). Immunoglobulin G in the developing oocytes of the domestic hen and corresponding egg yolk. *In Vivo*. 11. p. 395-398.
- BRANGER, C., CHATRENET, B., GAUVRIT, A., AVIAT, F., AUBERT, A., BACH, J. M., ANDRÉ-FONTAINE, G. (2005). Protection against *Leptospira interrogans* sensu lato challenge by DNA immunization with the gene encoding hemolysin-associated protein 1. *Infection and Immunity*. 73. p. 4062-4069.
- BURNS, R. B., MAXELL, M. H. (1981). Probable occurrence of IgE in the adult domestic fowl (*Gallus domesticus*) after horse serum stimulation. *Veterinary Research Communications*. 5(1). p.67-72.
- CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. (2002) Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. *BioDrugs*. 16 (6), p.433-437.
- CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P. E.; LARSSON, A. (2000) Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunologic Research*. 21(1), p.1-6.
- CHAGAS-JUNIOR, A. D., MCBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., FIGUEIRA, C. P., MEDEIROS, M. A., REIS, M. G., KO, A. I., MCBRIDE, F. W. (2009). An imprint method for detecting

leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*. 58. p.1632-1637.

- CHALGHOUMI, R., BECKERS, Y., PORTETELLE, D., THE'WIS, A. (2009). Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 13. p. 295–308
- CHEN, C.L., LEHMEYER, J. E., COOPER, M. D. (1982) Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. *Journal of Immunology*. 129 (6). p. 2580-2585.
- CHOY, H. A., KELLEY, M. M., CHEN, T. L., MOLLER, A. K., MATSUNAGA, J., HAAKE, D. A. (2007). Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. *Infection and Immunity*. 75 (5) p. 2441-2450.
- CULLEN, P. A, HAAKE, D. A & ADLER, B. (2004). Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. *FEMS Microbiology Reviews*. 28(3). p. 291–318.
- CULLEN, P.A., XU, X., MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., KO, A.I., HAAKE, D.A., ADLER, B., (2005). Surfaceome of *Leptospira* spp. *Infection and Immunology*. 73. p. 4853–4863.
- CUI, Z. DNA Vaccine. (2005).. 54. P.257-289. In: *Non-viral Vectors For Gene Therapy, Part 2, 2nd Edition. Advances In Genetics*. Elsevier.
- DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R. SILVA, E. F.; McBRIDE, A. J. A.. (2011). Recombinant vaccines against Leptospirosis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 7. p. 1215-1224.
- DIAS DA SILVA, W. & TAMBOURGI, D. V (2010). IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology*. 135(3-4). p. 173–80.
- DINIZ, J. A. Produção e caracterização de IgY contra rLipL32 de *Leptospira interrogans*. 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.
- DOHMS, J.E., SAIF, Y.M. & BACON, W.L. (1978). Metabolism and passive transfer of immunoglobulins in the turkey hen. *American Journal of Veterinary Research*. 39. p. 1472 -1481.
- FAINE, S., ADLER, B., BOLIN, C. & PEROLAT, P. (1999). *Leptospira and Leptospirosis Second Edition*,
- FAISAL, S.M., YAN, W., CHEN, C.-S., PALANIAPPAN, R.U.M., McDONOUGH, S.P. & CHANG, Y.-F. (2008). Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*. 26(2). p. 277–87.
- FLANNERY, B., COSTA, D., CARVALHO, F. P., GUERREIRO, H., MATSUNAGA, J., DA SILVA, E. D., FERREIRA, A. G., RILEY, L. W., REIS, M. G., HAAKE, D. A., KO, A. I. (2001).

Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(9). p.3303-3310.

- FORSTER, K. M., HARTWIG, D. D., SEIXAS, F. K., BACELO, K. L., AMARAL, M., HARTLEBEN, C. P., & DELLAGOSTIN, O. A. (2013). A Conserved Region of Leptospiral Immunoglobulin-Like A and B Proteins as a DNA Vaccine Elicits a Prophylactic Immune Response against Leptospirosis. *Clinical and Vaccine Immunology : CVI*. 20(5). p. 725–731.
- GASSMANN, M., THOMMES, P., WEISER, T., HUBSCHER, U. (1990) Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conservative mammalian protein. *FASEBJ* 4. p. 2528-2532.
- GRASSMANN, A.A., FELIX, S.R., XIMENDES DOS SANTOS, C., AMARAL, M.G., SEIXAS NETO, A.C., FAGUNDES, M.Q., SEIXAS, F.K., DA SILVA, E.F., CONCEICAO, F.R., DELLAGOSTIN, O.A. (2012). Protection against lethal leptospirosis after vaccination with LipL32 coupled or coadministered with the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19. p. 740–745.
- GROSS, W. B. & SIEGEL, P. B. (1990). Genetic-environmental interactions and antibody response in chickens to two antigens. *Avian Diseases*. 34. p. 843-847.
- GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. (2001). Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. *Infection and Immunity*. 69 (8) p. 4958-4968.
- GURUNATHAN, S., KLINMAN, D. M., & SEDER, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annual Review Immunology*. 18. p. 927-974.
- HAAKE, D. A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., BERNETT, J. K., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P. N., BOLIN, C. A. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. *Infection and Immunity*. 68. p. 2276-2285.
- HAAKE, D.A. (2000). Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiology*. 146. p. 1491–1504.
- HARLOW, E., LANE, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- HAUK, P., GUZZO, C.R., ROMAN RAMOS, H., HO, P.L. & FARAH, C.S. (2009). Structure and calcium-binding activity of LipL32, the major surface antigen of pathogenic *Leptospira* sp. *Journal of molecular biology*. 390(4). p. 722–36.
- HE, H.J., WANG, W.Y., WU, Z.D., LV, Z.Y., LI, J. & TAN, L.Z. (2008). Protection of guinea pigs against *Leptospira interrogans* serovar Lai by LipL21 DNA vaccine. *Cellular & molecular immunology*. 5(5). p. 385–91.

- HOKE, D.E., EGAN, S., CULLEN, P. A & ADLER, B. (2008). LipL32 is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. *Infection and immunity*. 76(5). p. 2063–2069.
- HOON, S., KIM, K.A., KEUN, Y., WHA, I., JA, M. & JU, Y. (2000). Identification and partial characterization of a novel hemolysin from *Leptospira interrogans* serovar lai. 254. p. 19–28.
- HUMPHRYES, P.C., WEEKS, M.E., ABUOUN, M., THOMSON, G., NÚÑEZ, A & COLDHAM, N.G. (2014). Vaccination with leptospiral outer membrane lipoprotein LipL32 reduces kidney invasion of *Leptospira interrogans* serovar canicola in hamsters. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 21(4). p. 546–551.
- JOUGLARD S.D., MEDEIROS M.A., VAZ E.K., BASTOS R.G., DA CUNHA C.W., ARMOA G.R.G. & DELLAGOSTIN O.A. (2002). An Ultra-Rapid and Inexpensive Plasmid Preparation Method for Screening Recombinant Colonies. *Abstracts American Society for Microbiology*. H-71. p.234.
- KAMIKAWA, Y., FUGISAKI, J., NAGAYAMA, T., KAWASAKI, K., HIRABAYASHI, D., HAMADA, T., SAKAMOTO, R., MUKAI, H., SUGIHARA, K. (2014). Use of *Candida*-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of *Candida* to denture base materials: prevention of denture stomatitis. *Gerodontology*. 12.
- KANAGAVEL, M., SHANMUGHAPRIYA, S., ANBARASU, K., NATARAJASEENAVASAN, K. (2014). B-Cell-Specific Peptides of *Leptospira interrogans* LigA for Diagnosis of Patients with Acute Leptospirosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 21 (3). p. 354-359.
- KARLSSON M., KOLLBERG H. & LARSSON A. (2004). Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. *World Poultry Science Journal*. 60. p. 341-348.
- KLIMPEL, G.R., MATTHIAS, M.A. & VINETZ, J.M. (2003). *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. *Journal of Immunology*. 171. p. 1447–1455.
- KOVACS-NOLAN, J., MINE, Y. (2012). Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review Food Science Technology*. 3. p.163-182.
- KO, A.I., GOARANT, C. & PICARDEAU, M. (2009). *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature reviews. Microbiology*. 7(10). p. 736–747.
- KOIZUMI, N., WATANABE, H. (2004). Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*. 22. p.1545-1552.
- LECLAIRE, R. D., HUNT, R. E., BAVARI, S. (2002) Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infection and Immunity*. 70(5). p.2278-2281.

- LEE, K., KIM, H., SHIN, E., KIM, Y., CHANG, S., CHOI, J. (2009). Validity of measles immunization certificates submitted upon enrollment in an elementary school in Korea. *Journal of Preventive Medicine and Public Health*. 42 (2). p.104-108.
- LESLIE, G. A. & CLEM, L.W. (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function: immunoglobulins of the chicken. *The Journal of Experimental Medicine*. 130. p. 1337-1352.
- LEVETT, P. N., HAAKE, D. A. *Leptospira* Species (Leptospirosis).(2009). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (ed). Mandell, Douglas, and Bennett's *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th ed. Orlando, FL: Saunders Elsevier.
- LEVETT, P.N. (2001). Leptospirosis. *Clinical microbiology reviews*. 14(2). p. 296–326.
- LIPMAN, N. S., JACKSON, L. R., TRUDEL, L. J., WEIS-GARCIA, F. (2005). Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR Journal*. 46(3). p. 258-268.
- LUCAS, D. S., CULLEN, P. A., SRIKRAN, A., SERMSWAN, R. W., ADLER, B. (2011). Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. *Vaccine*. 29 (18). p. 3413–3418.
- MALMSTROM, J., BECK, M., SCHMIDT, A., LANGE, V., DEUTSCH, E.W., AEBERSOLD, R., (2009). Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature*. 460. p. 762–765.
- MANEEWATCH, S., SAKOLVAREE, Y., SAENGJARUK, P., SRIMANOTE, P., TAPCHAI SRI, P., TONGTAW E, P., KLAYSING, B., WONGRATANACHEEWIN, S., CHONGSA-NGUAN, M., CHAICUMPA, W., (2008). Monoclonal antibodies to LipL32 protect against heterologous *Leptospira* spp. challenge. *Hybridoma*. 27. p. 453–465.
- MANEEWATCH, S., TAPCHAI SRI, P., SAKOLVAREE, Y., KLAYSING, B. & TONGTAW E, P. (2007). OmpL1 DNA Vaccine Cross-Protects against Heterologous *Leptospira* spp. Challenge.. p. 75–82.
- MATSUI, M., SOUPE, M.E., BECAM, J., GOARANT, C. (2012). Differential in vivo gene expression of major *Leptospira* proteins in resistant or susceptible animal models. *Applied and Environmental Microbiology*. 78. p. 6372–6376.
- MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M. A., CRODA, J., YOUNG, T. A., SANCHEZ, Y., SIQUEIRA, I., BOLIN, C. A., REIS, M. G., RILEY, L. W., HAAKE, D. A., KO, A. I. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Molecular Microbiology*. 49(4). p.929-945.
- MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., XU, X., HAAKE, D.A. (2005). Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. *Infection and Immunity*. 73. p. 70–78.
- McBRIDE, A. J., ATHANAZIO, D. A., REIS, M. G., KO, A. I. (2005). Leptospirosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*.18(5). p.376-386.

- MCBRIDE, A. J., CERQUEIRA, G. M., SUCHARD, M. A., MOREIRA, A. N., ZUERNER, R. L., REIS, M. G., HAAKE, D. A., KO, A. L., DELLAGOSTIN, O. A. (2009). Genetic diversity of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* spp. *Infection Genetics and Evolution*. 9. p.196–205.
- MAHN, K. (1998). Etablierung eines immunisierungsschemas für Legehennen. Veterinazy Medicine Doctoral Thesis, University of Munich. 110pp. Munich, Germany: University of Munich.
- MURRAY, G.L. (2013). The lipoprotein LipL32, an enigma of leptospiral biology. *Veterinary microbiology*. 162(2-4). p. 305–314.
- MURRAY, G.L., MOREL, V., CERQUEIRA, G.M., CRODA, J., SRIKRAM, A., HENRY, R., KO, A.I., DELLAGOSTIN, O. A, BULACH, D.M., SERMSWAN, R.W., ADLER, B. & PICARDEAU, M. (2009). Genome-wide transposon mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species. *Infection and immunity*. 77(2). p. 810–6.
- NAIMAN, B.M., ALT, D., BOLIN, C. A, ZUERNER, R. & BALDWIN, C.L. (2001). Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infection and immunity*. 69(12). p. 7550–7558.
- PALANIAPPAN, R. U., CHANG, Y. F., JUSUF, S. S., ARTIUSHIN, S., TIMONEY, J. F., MCDONOUGH, S. P., BARR, S. C., DIVERS, T. J., SIMPSON, K. W., MCDONOUGH, P. L., MOHAMMED, H. O. (2002). Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. *Infection and Immunity*. 70(11). p.5924-5930.
- PALANIAPPAN, R. U., MCDONOUGH, S. P., DIVERS, T. J., CHEN, C. S., PAN, M. J., MATSUMOTO, M. et al. (2006). Immunoprotection of recombinant leptospiral immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona infection. *Infection and Immunity*. 74. p.1745-1750.
- PAULY, D., CHACANA, P. A, CALZADO, E.G., BREMBS, B. & SCHADE, R. (2011). IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *Journal of visualized experiments : JoVE*. (51). p. 1–6.
- PICARDEAU, M., BERTHERAT, E., JANCLOES, M., SKOULLOUDIS, A.N., DURSKI, K. & HARTSKEERL, R. A (2014). Rapid tests for diagnosis of leptospirosis: current tools and emerging technologies. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 78(1). p. 1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24207075> [Accessed September 26, 2014].
- PINNE, M. & HAAKE, D. A (2013). LipL32 Is a Subsurface Lipoprotein of *Leptospira interrogans*: presentation of new data and reevaluation of previous studies. *PLoS one*. 8(1). p. E51025.
- RAMOS, C. R., ABREU, P. A., NASCIMENTO, A. L., HO, P. L. (2004). A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins

with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 37 (8). p. 1103-1109.

RATHINAM, S.R. (2002). Ocular leptospirosis. *Current Opinion in Ophthalmology*. 13(6). p. 381–386. Available at:

<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00055735-200212000-00007>.

REN, S., FU, G., JIANG, X., ZENG, R., MIAO, Y., XU, H., et al. (2003). Unique and physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by whole genome sequencing. *Nature*. 422, p. 888–893.

SAMBROOK, J., RUSSEL, D. W. (2001). *Molecular Cloning – A laboratory Manual*. ed. Cold Spring Harbor, New York.

SCHADE, R., BURGER, W., SCHONEBERG, T., SCHNIERING, A., SCHWARZKOPF, C., HLINAK, A., KOBILKE, H. (1994). Avian egg yolk antibodies. The egg-laying capacity of hens following immunization with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies. *Altex Alternativen Zu Tierexperimenten*. 11. p. 75–84.

SCHADE, R., CALZADO, E. G., SARMIENTO, R., CHACANA, P. A., PORANKIEWICZ-ASPLUND, J., TERZOLO, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Alternatives to Laboratory Animals* 33 (2). p.129-154.

SEIXAS, F. K., DA SILVA, E. F., HARTWIG, D. D., CERQUEIRA, G. M., AMARAL, M., FAGUNDES, M. Q., DOSSA, R. G., DELLAGOSTIN, O. A. (2007). Recombinant *Mycobacterium bovis* BCG expressing the LipL32 antigen of *Leptospira interrogans* protects hamsters from challenge. *Vaccine*. 26(1). p.88-95.

SILVA, E. F., MEDEIROS, M. A., MCBRIDE, A. J., MATSUNAGA, J., ESTEVES, G. S., RAMOS, J. G., SANTOS, C. S., CRODA, J., HOMMA, A., DELLAGOSTIN, O. A., HAAKE, D. A., REIS, M. G., KO, A. I. (2007). The terminal portion of Leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of Leptospirosis. *Vaccine*. 25. p.6277-6286.

SMITH, D. J., KING, W. F., GODISKA, R. (2001). Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infection and Immunity*. 69(5). p.3135-3142.

SUGANO, N. (2012). Biological plaque control: novel therapeutic approach to periodontal disease. *Journal of Oral Science*. 54(1). p. 1-5.

TAVARES T.C.F., SOARES P.M., NEVES J.H.F.F., SOARES M.M., FERREIRA JUNIOR Á., SOUZA D.L.N., ÁVILA V.M.R. & LIMA-RIBEIRO A.M.C. (2013). Produção e purificação de imunoglobulinas Y policlonais anti-*Leptospira* spp. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(9). p. 097-1102.

- VIVIAN, J.P., BEDDOE, T., MCALISTER, A.D., WILCE, M.C.J., ZAKER-TABRIZI, L., TROY, S., BYRES, E., HOKE, D.E., CULLEN, P. A, LO, M., MURRAY, G.L., ADLER, B. & ROSSJOHN, J. (2009). Crystal structure of LipL32, the most abundant surface protein of pathogenic *Leptospira* spp. *Journal of molecular biology*. 387(5). p. 1229–38. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19236879> [Accessed November 11, 2014].
- WITCHELL, T.D., ESHGHI, A., NALLY, J.E., HOF, R., BOULANGER, M.J., WUNDER, E. A, KO, A.I., HAAKE, D. A & CAMERON, C.E. (2014). Post-translational Modification of LipL32 during *Leptospira interrogans* Infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 8(10). p. E3280. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356675> [Accessed November 3, 2014].
- World Health Organization. Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control. Geneva, Switzerland: WHO, 2003.