

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ROSANGELA RODRIGUES DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO *in vivo* DE UMA VACINA CONJUGADA  
CONTRA *Pseudomonas aeruginosa***

**CURITIBA**

**2009**

**ROSANGELA RODRIGUES DOS SANTOS**

**DESENVOLVIMENTO E ESTUDO *in vivo* DE UMA VACINA CONJUGADA  
CONTRA *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Lucy Ono

Co-orientador: Prof. MSc. Luis Felipe Caron.

**CURITIBA**

**2009**

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Santos, Rosangela Rodrigues dos

Desenvolvimento e estudo *in vivo* de uma vacina conjugada contra *Pseudomonas aeruginosa*. / Rosangela Rodrigues dos Santos. – Curitiba, 2009.

50 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lucy Ono

Co-orientador: Luis Felipe Caron

Dissertação (mestre) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Vacinas 2. *Pseudomonas aeruginosa* I. Título II. Ono, Lucys III. Caron, Luis Felipe IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 615.372

***Não podemos resolver  
problemas usando o mesmo  
tipo de pensamento que  
usamos quando os criamos.***

***(A. Einstein)***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, como sempre.

À minha família, pela fundação de apoio e incentivo financeiro à minha pesquisa.

Ao Rodrigo, pelo carinho, disposição e paciência.

À minha amiga e orientadora Professora Lucy, pela confiança, por sempre acreditar na minha vontade de fazer pesquisa, compreender minhas dificuldades e ajudar a desenvolver esse projeto que apenas começa.

Ao Professor Felipe pela idéia inicial da pesquisa e por todas as outras idéias que nos influenciam a ter cabeças geradoras de hipóteses.

Aos colegas do Laboratório Yasuyoshi Hayashi pelo companheirismo e colaboração, em especial à Carla por sempre limpar os dongos pra mim.

À família BIOPOL e à Professora Maria Rita Sierakowski pela ajuda e compreensão na minha invasão para utilizar toda sua estrutura laboratorial e conhecimento.

Ao Professor Silvio M. Zanata e à Aline C. Luvizon do Laboratório de Neurobiologia, pelos auxílios prestados nas eletroforeses.

À Maria Luiza Leonardi Gonçalves e ao Laboratório Marcos Enrietti pela prontidão em me ajudar, espero poder incomodá-los todos os dias em breve.

A cada camundongo utilizado e aos que ainda permanecem conosco no projeto.

## RESUMO

O uso de vacinas conjugadas possibilita contornar um problema da imunização contra antígenos não-protéicos: a falta de memória imunológica, e ainda faz com que neonatos e crianças respondam à vacinação para um antígeno contra o qual, naturalmente, não teriam capacidade de responder. *Pseudomonas aeruginosa* é agente etiológico de infecções oportunistas principalmente em pacientes hospitalizados, suas características inerentes em desenvolver resistência aos mais variados tipos de antibacterianos a tornam um ponto crítico no controle das infecções hospitalares ou no tratamento de pacientes. O melhoramento de medidas para prevenção das infecções causadas pela *P. aeruginosa* auxiliaria na manutenção da saúde e qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa foi adaptar um protocolo de conjugação do lipopolissacarídeo (LPS) de *P. aeruginosa* que pudesse ser utilizado como padrão para ser aplicado a outros antígenos polissacarídicos. A técnica de conjugação por aminação reductiva direta com meta-periodato de sódio foi testada para ligar o antígeno LPS à proteína BSA (albumina bovina) e avaliar sua resposta *in vivo* em camundongos. Nossos resultados sugerem que foi possível a formação do imunoconjugado LPS-BSA pela adaptação do protocolo de SHEN *et al.* (2001). A imunização de camundongos com a vacina conjugada LPS-BSA garantiu resposta de anticorpos aglutinantes mesmo sendo, em média, menor que a vacina de LPS sozinho. Uma dose efetiva deve ser estudada, investigações futuras quanto aos efeitos colaterais desta vacina e sua habilidade para proteger contra infecção são necessárias.

Palavras chaves: vacina conjugada, *Pseudomonas aeruginosa*, lipopolissacarídeo, albumina.

## ABSTRACT

The use of conjugated vaccines makes possible to pass through the problem of immunization against nonprotein antigens: a lack of immunological memory makes that newborns and children respond to vaccination against an antigen that naturally lack the capacity to respond. *Pseudomonas aeruginosa* is an agent of opportunistic infections especially in hospitalized patients, and their natural characteristics to develop resistance to almost all kinds of antibiotics makes it a critical point in the control of nosocomial infections or even to treat patients. The improvement of tools to prevent infection caused by *P. aeruginosa* helps in the maintenance of patient's health and their quality of life. In this context, the main goal of this research was to adapt a conjugation protocol of lipopolysaccharide (LPS) from *P. aeruginosa* that could be used as a standard to be applied on other polysaccharide antigens. To improve immunogenicity, the antigen was coupled to BSA (Bovine Serum Albumin) with m-periodate as a reductive agent. Mice were used as animal model for immunization. Our results suggest the production of a LPS-BSA immunoconjugate. The immunization of mice with LPS-BSA conjugate vaccine assured antibody response, which was on average lower than the response achieved with vaccination with LPS alone. An effective dose should be studied, and future investigations regarding the side effects of this vaccine and its ability to protect against *Pseudomonas aeruginosa* infections are necessary.

Key words: conjugated vaccines, *Pseudomonas aeruginosa*, lipopolysaccharide, albumin.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Desenho esquemático do LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> demonstrando sua constituição pelo lipídio A, pela região conservada e pelo antígeno-O.....	17
<b>FIGURA 2</b>	Estruturas das glicofomas da região conservada do LPS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
<b>FIGURA 3</b>	Representação do reconhecimento e resposta contra o LPS de bactérias gram negativas.....	21
<b>FIGURA 4</b>	Sequência do Reconhecimento Ligado do conjugado proteína (em vermelho) e LPS (amarelo).....	23
<b>FIGURA 5</b>	Foto das frações separadas após centrifugação na extração de LPS de <i>P. aeruginosa</i> . “A” é a fração aquosa, “B” a residual e “C” a fenólica.....	32
<b>FIGURA 6</b>	Reação de conjugação, em A foto do aspecto da solução depois dos cinco dias em capela de exaustão e em B após 18h de adicionado NaBH <sub>4</sub> antes de seguir para diálise.....	33
<b>FIGURA 7</b>	Representação esquemática da oxidação do polissacarídeo pelo m-Periodato de Sódio em oligossacarídeos com grupamentos aldeído reativos capazes de se ligarem aos grupamentos amina proteicos.....	34



## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1</b>	Perfil de eluição da BSA após passagem por coluna de gel permeação (Sephacrose CL-4B, eluente: NaCl 0,85%).....	34
<b>GRÁFICO 2</b>	Perfil de eluição do LPS de <i>P. aeruginosa</i> não conjugado em coluna de gel permeação (Sephacrose CL-4B, eluente: NaCl 0,85%).....	35
<b>GRÁFICO 3</b>	Perfil de eluição (Sephacrose CL-4B, eluente: NaCl 0,85%) do imunoconjugado LPS-BSA.....	36
<b>GRÁFICO 4</b>	Determinação da DL50.....	39
<b>GRÁFICO 5</b>	Médias das titulações dos grupos.....	41
<b>GRÁFICO 6</b>	Título médio do grupo em cada colheita de sangue. Grupo 2: vacina de LPS (20µg), Grupo 3: vacina de LPS-BSA (5µg), Grupo 4: vacina de LPS-BSA (10µg), Grupo 5: vacina de LPS-BSA (20µg), Grupo 6: vacina de LPS-BSA (40µg).....	42

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	Caracterização química do LPS extraído de <i>P. aeruginosa</i> e do conjugado BSA-LPS.....	33
<b>QUADRO 2</b>	Títulos mínimos e máximos das soro-aglutinações dos camundongos vacinados segundo o protocolo de LABORDE e DE FAJARDO (1969).....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ag-O – antígeno polissacarídeo O  
Al(OH)<sub>3</sub> – Hidróxido de Alumínio  
AT – açúcar total  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
BSA – soro albumina bovina (*bovine serum albumin*)  
CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal  
DL50 – dose letal 50%  
EDAC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida  
g – grama  
Hib – *Haemophilus influenzae* tipo B  
LBP – proteína ligadora de LPS  
LPS – lipopolissacarídeo  
mg – miligrama  
MHC – complexo de histocompatibilidade principal  
mL – mililitro  
mM - milimolar  
NaBH<sub>4</sub> – Borohidreto de Sódio  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NaCNBH<sub>4</sub> –Cianoborohidreto de Sódio  
NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de Sódio  
NaIO<sub>4</sub> – meta-Periodato de Sódio  
nm – nanômetro  
*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*  
PCA – *Plate Count Agar*  
PT – proteína total  
rpm – rotações por minuto  
SC – subcutânea  
TLR4 – *tool like receptor 4*  
UFC – unidades formadoras de colônia  
µg – micrograma  
µm – micrometro  
µL – microlitro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO E BACTERIOLOGIA	16
2.2 PATOGÊNESE	16
2.3 LIPOPOLISSACARÍDEO	17
2.3.1 Resposta imune ao LPS	20
2.4 VACINAS E VACINAÇÕES	21
2.4.1 Vacinas conjugadas	22
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>25</b>
3.1 CULTIVO E INATIVAÇÃO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
3.2 CONTAGEM E LIOFILIZAÇÃO	25
3.3 EXTRAÇÃO DO LPS	25
3.3.1 Análises do LPS	26
3.4 GEL-PERMEAÇÃO DOS ANTÍGENOS	26
3.5 CONJUGAÇÃO DOS ANTÍGENOS	26
3.5.1 Análises do imunoconjugado	27
3.6 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS	27
3.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DA VACINA <i>IN VIVO</i>	28
3.7.1 Desafio pós-vacinal	28
3.7.1.1 Determinação da Dose Letal 50% - DL50	28
3.7.2 Titulação de anticorpos	29
3.8 ANÁLISE ESTADÍSTICA	30
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>31</b>
4.1 CULTIVO, LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO LPS	31
4.1.1 Análises do LPS	32
4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISES DO CONJUGADO	33
4.3 GEL PERMEAÇÃO DO LPS, DA BSA E DO CONJUGADO LPS-BSA	34
4.4 CONFIRMAÇÃO DA CONJUGAÇÃO	36

4.5 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% - DL50 .....	38
4.6 DESAFIO PÓS-VACINAL.....	39
4.7 TESTES SOROLÓGICOS .....	40
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Microbiologia Prof. Yasuyoshi Hayashi, do Departamento de Patologia Básica da UFPR, com vacinas conjugadas. *Pseudomonas aeruginosa* foi a bactéria escolhida para padronizar o protocolo de conjugação, pois é considerado um bacilo não-exigente com relação às suas necessidades nutricionais de crescimento, tem alta tolerância a condições adversas e está envolvido na patogênese de uma série de doenças no homem e nos animais.

*Pseudomonas aeruginosa* é agente etiológico de infecções oportunistas principalmente em pacientes hospitalizados, mas também ocorre na comunidade. Ela teve emergência com os adventos da antibioticoterapia na década de 50 para bactérias gram-positivas (HOLDER, 2004). Na saúde humana se torna um ponto crítico no controle das infecções hospitalares por possuírem capacidade inerente de desenvolver resistência aos mais variados tipos de antibacterianos utilizados na rotina hospitalar.

A despeito dos avanços tecnológicos no desenvolvimento de drogas de maior potência antibacteriana, suas características naturais de resistência a mantém em papel de destaque no que se refere às dificuldades terapêuticas. Essas bactérias multirresistentes tornam-se o agente etiológico de surtos de septicemia dentro de UTIs - Unidades de Tratamento Intensivo dos hospitais ou de infecções nosocomiais em pacientes imunossuprimidos, que sofreram queimaduras, portadores de leucemia ou Fibrose Cística. É a segunda bactéria com maior incidência nas infecções de feridas pós-cirúrgicas. Na comunidade, *P. aeruginosa* pode ser uma séria causa de ceratite ulcerativa em indivíduos que usam lentes de contato (PIER, 2003). Na saúde animal os problemas com multirrestência também ocorrem, principalmente em casos de otite externa, cistite canina, úveo-conjuntivite, endometrite em eqüinos e mastite em ruminantes (QUIN *et al.*, 2005).

As pesquisas com vacinas para combater a infecção por esta bactéria são vastas, desenvolvidas em vários países, na tentativa de auxiliar o tratamento e prognóstico de pacientes por ela acometidos. O melhoramento de medidas para prevenção das infecções causadas pela *P. aeruginosa* auxiliaria na manutenção da saúde e qualidade de vida dos pacientes.

As vacinas produzidas a partir de células inteiras inativadas (bacterinas) ou compostas apenas pelo lipopolissacarídeo (LPS) da célula bacteriana (vacina de subunidade) são eficazes, mas esses tipos de vacinas conferem resposta protetora temporária. A indução de anticorpos contra lipopolissacarídeos de membrana da *P. aeruginosa* é T-independente pelo fato do antígeno induzir a produção de anticorpos por uma via independente de linfócitos T-auxiliares, não ativando Células B para geração de células de memória. Antígenos T-independentes são geralmente moléculas grandes, com múltiplas repetições de subunidades, como os lipídeos e carboidratos da membrana externa de bactérias Gram negativas.

No entanto, a geração de memória pode ser induzida quando esses antígenos são transformados em T-dependentes pela sua conjugação com uma proteína. A ligação covalente de antígenos carboidratos a antígenos protéicos, descrita pela primeira vez por AVERY E GOEBEL em 1929 (apud MIDWINTER *et al.*, 1994), confere propriedades celulares T-dependentes a vários antígenos polissacarídeos. As proteínas são antígenos T-dependentes, recrutando a participação de células T auxiliares para desencadear a produção de anticorpos pelos plasmócitos (via linfócitos B), uma vez que diferentemente dos antígenos T-independentes (LPS e polissacarídeos), os antígenos protéicos durante a resposta imune são acoplados aos complexos do MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe I ou II, o que determina a geração de uma sub-população de células de memória. Uma característica da imunidade T-dependente é a sua capacidade de ativar o braço da memória imunológica, além de induzir uma mudança da classe predominante de imunoglobulinas, de IgM para IgG (WHO, 1993 e JANEWAY *et al.*, 2002).

Assim, fragmentos peptídicos que estimulam Linfócitos T e cuja ativação resulta em memória imunológica, somente são reconhecidos quando ligados a uma molécula do MHC; o reconhecimento do ligante pela célula T é, portanto, um complexo de peptídeo e uma molécula do MHC (JANEWAY *et al.*, 2002). Conjugando-se o antígeno LPS de *P. aeruginosa* com a proteína Albumina Bovina (BSA), alteramos sua via de reconhecimento, fazendo com que o sistema imune faça o reconhecimento ligado do imunocombinado (LPS-BSA) gerando uma resposta T-dependente com células de memória para o antígeno LPS.

De posse destes conhecimentos, pretende-se com esse trabalho testar uma técnica de conjugação por aminação reductiva direta utilizando meta-Periodato de Sódio como espaçador (SHEN *et al.*, 2001) do lipopolissacarídeo (LPS) de

*Pseudomonas* spp com albumina bovina (BSA-*Bovine Serum Albumin*) e testar sua resposta *in vivo* utilizando camundongos como modelo experimental. Seguindo com essa linha de pesquisa em vacinas conjugadas, este trabalho propõe trazer propostas para melhorar o produto, que surgirão com base nos primeiros resultados.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem por objetivos o desenvolvimento e estudo *in vivo* de uma vacina conjugada para *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair lipopolissacarídeo de *Pseudomonas aeruginosa*;
- Padronizar protocolo da conjugação por aaminação reductiva direta (com meta-periodato de sódio) de lipopolissacarídeo bacteriano a proteína;
- Analisar e confirmar a formação do imunoconjugado utilizando técnicas de dosagem de açúcar e de proteína associadas à cromatografia de gel-permeação;
- Avaliar a resposta *in vivo* através da vacinação experimental em camundongos, com determinação do título de anticorpos aglutinantes induzidos nos soros dos camundongos vacinados.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DO ANTÍGENO E BACTERIOLOGIA

*Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbico Gram negativo, pertencente à família *Pseudomonadaceae*, medindo de 0,5 a 0,8 µm por 1,5 a 3,0 µm e com motilidade conferida por um único flagelo polar. É um bacilo não-fermentador de açúcares que, dentro do grupo fluorescente, é o único que produz pigmento azul, a piocianina, e é capaz de crescimento a 42°C, mas não a 4°C. Utiliza glicose e outros carboidratos por oxidação. Patógeno oportunista ubíquo, normalmente presente no solo, na água, na vegetação e na microbiota da pele de pessoas saudáveis, mas quando colonizam fômites e ambientes hospitalares, provocam surtos de infecções nosocomiais. É o pseudomonídeo mais isolado de amostras clínicas de locais onde existe acúmulo de umidade como traqueostomias, catéteres permanentes, queimaduras, ouvido externo e feridas cutâneas exsudativas. E, como um agente oportunista, é agravante principalmente em pacientes imunocomprometidos, com Fibrose Cística ou transplantados. (WIN JR. *et al.*, 2006; TODER, 2002; STANISLAVSKY E LAM, 1997).

### 2.2 PATOGÊNESE

*P. aeruginosa* possui fatores R, além dos plasmídeos, que transportam genes que determinam a resistência aos antibióticos. À medida que os fatores R se recombinam, novos e múltiplos fatores de resistência são produzidos. A resistência também é provavelmente devido à característica de possuir poucas porinas na parede celular, e muitas bombas de efluxo que faz com que o pouco antibiótico que entra na célula é rapidamente expulso. Possui ainda fatores de virulência como fímbrias, adesinas e flagelos que conferem aderência; exotoxinas A que inibem a síntese de proteínas interrompendo a atividade celular e a resposta macrofágica; exoenzimas S e V inibem a fagocitose; fosfolipases C que degradam lipídios de membrana e inativam as opsoninas; rhamnolipídeos que solubilizam lipídeos e

inibem a função ciliar do epitélio respiratório superior; pigmentos como a piocianina e pioverdina que inibem a proliferação da epiderme, de linfócitos e de outras bactérias.

O morfotipo mucóide de *P. aeruginosa* é produtor de um mucopolissacarídeo (o alginato) em grandes quantidades, que forma uma espécie de gel na superfície da bactéria, chamado biofilme, que a protege da ação de macrófagos e neutrófilos, conferindo ainda tolerância a anticorpos e impedindo a difusão de antibióticos. Esse biofilme pode permanecer em instrumentais, catéteres ou outros fômites, garantindo a persistência da bactéria no ambiente ou sua contaminação cruzada (WIN JR. *et al.*, 2006, STANISLAVSKY E LAM, 1997). A neutralização de qualquer fator de virulência específico pode não ter sucesso em prevenir ou diminuir morbidade ou mortalidade em infecções por *P. aeruginosa* em todas as formas que ela se apresenta nos pacientes (HOLDER, 2004). O melhoramento de medidas para prevenção das infecções causadas pela *P. aeruginosa* auxiliaria na manutenção da saúde e qualidade de vida dos pacientes acometidos.

### 2.3 LIPOPOLISSACARÍDEO

O LPS é uma molécula complexa que consiste em três regiões: uma região polissacarídica O-específica (Antígeno-O, Ag-O), uma região polissacarídica conservada (*core*) e um componente lipídico chamado Lipídio-A (FIGURA 1).

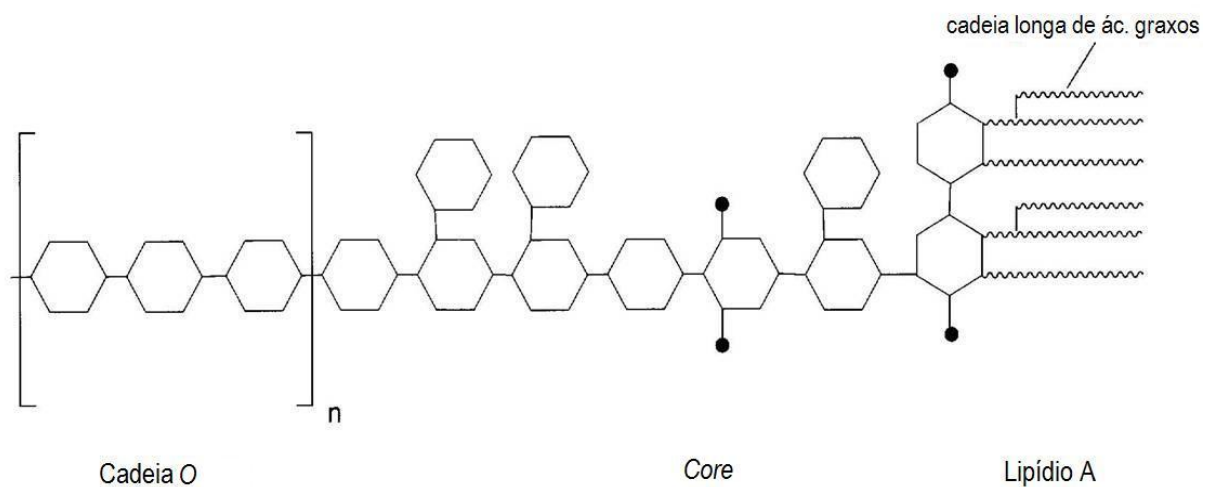


FIGURA 1 – DESENHO ESQUEMÁTICO DO LPS DE *Pseudomonas aeruginosa* DEMONSTRANDO SUA CONSTITUIÇÃO PELO LIPÍDIO A, PELA REGIÃO CONSERVADA E PELO ANTÍGENO-O  
Os hexágonos representam monossacarídeos e os círculos pretos grupos fosfatos.  
FONTE: GOLDBERG e PIER (1996)

A porção *core* é constituída de Kdo – cetodeoxioctonato. Ligado ao *core* está o Ag-O, que é a parte mais variável do LPS, a qual normalmente é composta por glucose, ramnose, xilose e ribose. Estes açúcares são agrupados em 4 ou 5 sequências, as quais frequentemente são ramificadas. Os ácidos graxos do Lipídio A são conectados por ligações amino-éster a dissacarídeos compostos de fosfato N-acetilglicosamina (MADIGAN, MARTINKO E PARKER, 1997).

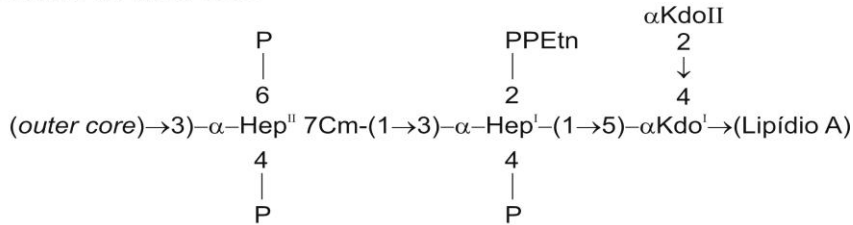
O LPS da *P. aeruginosa* contém uma estrutura básica de Lipídio A ligado a uma cadeia principal formada por repetições de diglucosamina bifosfato N – e O – acilados  $[4\text{-}P\text{-}\beta\text{-}D\text{-}Glc\text{p}N^{\text{II}}\text{-(1}\rightarrow\text{6)-}\alpha\text{-}D\text{-}Glc\text{p}N^{\text{I}}\text{-(1}\rightarrow\text{P}]$ , com uma variação no número de grupos acilas primários e nos tipos de ácidos graxos que substituem os grupos acilas primário e secundário. A maioria das cepas de *P. aeruginosa* sintetiza um LPS penta-acilado (75% da molécula) com a outra proporção um LPS hexa-acilado. A diferença entre as duas isoformas é o espaço de um grupo ácido 3-hidroxi decanóico O-ligado na posição 3 da primeira glicosamina na isoforma penta-acilada. Condições de crescimento como quantidades de magnésio no meio podem interferir no modelo de acilação do Lipídio A da bactéria (PIER, 2007).

Ligado ao Lipídio A está uma estrutura conservada chamada *inner-core*, a qual contém dois resíduos de D –*mano*–octo–2 ácido ulosônico (Kdo<sup>I</sup> e Kdo<sup>II</sup>) e dois resíduos de L-*glicero*-D-*mano*-heptose (Hep<sup>I</sup> e Hep<sup>II</sup>) (FIGURA 2, p. 19). Ligado ao segundo resíduo Hep<sup>II</sup> há um grupo 7-O-carbamil, o qual é encontrado em outras espécies de *Pseudomonas*. Os resíduos heptose são geralmente fosforilados nas posições 2 e 4 de Hep<sup>I</sup> e na posição 6 de Hep<sup>II</sup>. Fosfatos substituintes podem ser mono-, di- ou mesmo tri-fosfatos, mas a maioria dos LPS de *P. aeruginosa* analisados até hoje são tri-fosfatos, o qual até agora só tem sido detectado no LPS dessa espécie bacteriana (PIER, 2007).

A fosforilação da porção interna da região conservada (*inner-core*) do LPS é essencial para viabilidade bacteriana. Uma mutação no gene *waaP*, que fosforila a posição 4 dos grupos Hep<sup>I</sup>, é letal para célula. Já a porção externa da região conservada (*outer-core*) do LPS é geralmente sintetizada como duas diferentes glicofomas (FIGURA 2, p. 19), sendo que ambas contêm um resíduo galactosamina N-alanilada, três resíduos de D-glicose e um resíduo L-ramnose; a posição de cada resíduo é que varia nas duas isoformas. Há também uma variação estrutural na glicofoma 1 de LPS de diferentes linhagens de *P. aeruginosa*, com uma variante

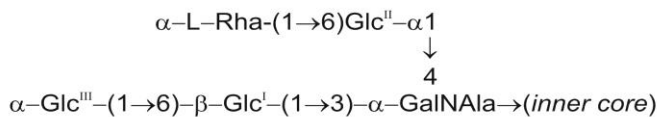
menos comum contendo 4 resíduos de glucose no *outer-core* (BYSTROVA *et al.*, 2006; STANISLAVSKY E LAM, 1997).

#### Glicofoma da *inner core*



#### Glicofomas da *outer core*

##### Glicofoma 1



##### Glicofoma 2

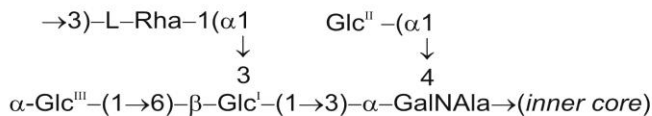


FIGURA 2 – ESTRUTURAS DAS GLICOFORMAS DA REGIÃO CONSERVADA DO LPS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

Ligando a core externa à interna existe um resíduo GalN n-acilado com alanina.

FONTE: ADAPTADO DE PIER (2003)

O polissacarídeo O (Ag-O) está ligado à estrutura da glicofoma 2 da *outer-core* para formar o LPS. Na maioria das linhagens lisas de LPS estudadas, a glicofoma 2 é totalmente substituída por um Ag-O, exceto nos sorogrupos O14 e O15. Cepas de LPS rugosas isoladas de pacientes com Fibrose Cística têm várias mutações dentre os genes que biossintetizam o Ag-O e não o possuem na glicofoma 2 (PIER, 2007; BYSTROVA *et al.*, 2006).

A porção Ag-O do LPS da *P. aeruginosa* é responsável por conferir a especificidade dos sorogrupos que é definida por anticorpos específicos para as diferentes variantes do antígeno. Quimicamente os Ag-O possuem no mínimo 11 variantes estruturais, mas, dentre estas variantes existem diferenças mínimas entre estruturas parecidas, em características como os grupos substituintes, tipos de

ligações entre açúcares ou monossacarídeos de diferentes conformações, tornando-a a parte mais variável do LPS (STANISLAVSKY E LAM, 1997).

A ligação do monossacarídeo na primeira unidade repetida ao resíduo de ramnose na glicofórmula 2 da *outer-core* do LPS é usualmente um derivado 2-*N*-acetil de uma 6-deoxi-D-hexosamina, geralmente uma D-quinovosamina ou D-fucosamina. Esta conservação na ligação do Ag-O à porção core do LPS parece ser devida ao gene conservado que codifica a ligase do Ag-O chamada WaaL. A proteína WaaL catalisa a ligação do 6-deoxi-hexosamina ao resíduo terminal ramnose da glicofórmula 2 da *outer-core* e forma uma ligação  $\beta$  enquanto nas unidades repetidas que ocorrem no resto da cadeia O a ligação entre o 6-deoxi-hexosamina e o próximo monossacarídeo pode ser em ambas as configurações  $\alpha$  ou  $\beta$  (PIER, 2007).

Os açúcares encontrados no polissarídeo O do LPS de *P. aeruginosa* incluem diferentes derivados *N*-acil de glicosaminas e ramnose. E as estruturas de alguns desses monossacarídeos foram primeiro descritas no LPS da *P. aeruginosa* (BYSTROVA *et al.*, 2006). Os monossacarídeos são arranjados em unidades repetidas contendo de 3-4 monossacarídeos, exceto para o sorogrupo O7, o qual é uma subunidade dissacarídica repetida (PIER, 2007).

### 2.3.1 Resposta imune ao LPS

LPS é o principal componente pró-inflamatório do envelope bacteriano de bactérias Gram negativas e é reconhecido pelo TLR4 (*Toll-like receptor 4*), (TLR4)-MD-2 complexo receptor. A estrutura do Lipídio A é o princípio endotóxico que varia entre as diferentes espécies bacterianas e a *P. aeruginosa* pode modular a estrutura do seu LPS na invasão do tecido hospedeiro para não ser inativado pelo sistema imune inato e para manter a integridade da membrana externa (HAJJAR *et al.*, 2002 e BYSTROVA *et al.*, 2006).

O TLR4 é um receptor de reconhecimento essencial para Lipídio A do LPS e medeia tanto uma resistência efetiva do hospedeiro à infecção quanto alguns dos eventos associados à indução ao choque por LPS (PIER, 2007). Ele sinaliza a presença de LPS pela associação com o CD14 que por sua vez é o receptor de macrófago para o LPS. A proteína receptora CD14 se liga à LBP (*LPS Binding Protein* - Proteína ligadora de LPS) conectado ao LPS. O TLR4 por sua vez

acoplado ao complexo LPS:LBP:CD14, sinaliza ao núcleo para ativar os genes envolvidos na defesa contra o patógeno (FIGURA 3, p.21). O LPS, um antígeno T-independente do tipo 1, estimula tanto células B maduras quanto virgens dependendo da quantidade presente no organismo, e é chamado de mitógeno de células B pois pode estimular a expansão clonal destas células inespecíficas ao antígeno (JANEWAY *et al.*, 2002).

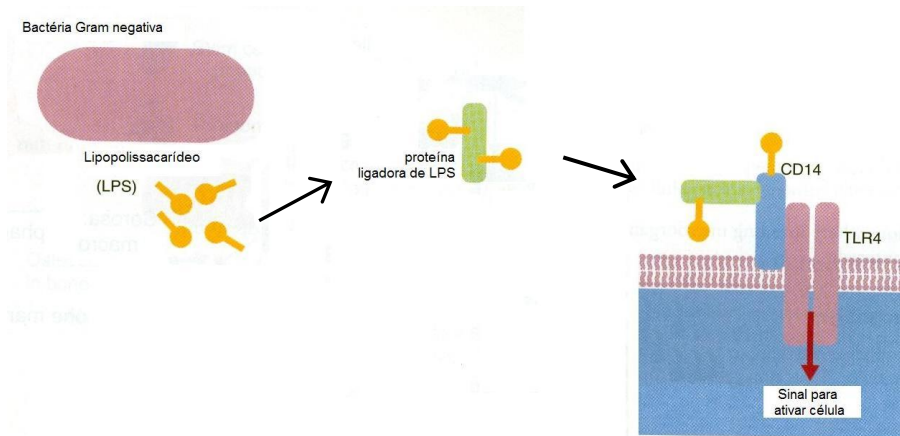


FIGURA 3: REPRESENTAÇÃO DO RECONHECIMENTO E RESPOSTA CONTRA O LPS DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS.

A ativação das células B sem recrutar células T auxiliares é um exemplo de resposta T-independente.

FONTE: ADAPTADO DE JANEWAY *et al.* (2002).

## 2.4 VACINAS E VACINAÇÕES

As vacinas são essenciais para manutenção da saúde pública. A erradicação de doenças como a Varíola só foi possível por existir uma vacina eficiente, segura e com um bom custo-benefício. A Poliomielite é outro exemplo que também está em vias de erradicação. Vacinas são eficientes em prevenir doenças e morte por doenças infecciosas. É mais barato prevenir uma doença com vacinação do que tratá-la. De acordo com uma análise norte-americana, para cada dólar gasto com vacinas, 21 dólares são economizados na saúde (NIAID, 2008).

O desenvolvimento de uma vacina efetiva para *P. aeruginosa* apesar de mais de 30 anos de pesquisa já realizados ainda não está eminente (PIER, 2003). O principal problema encontrado é que a porção antigênica mais efetiva da superfície celular é o Ag-O do LPS, que também é a porção mais variável e induz resposta espécie-específica, com algumas exceções de respostas cruzadas. As regiões

conservadas da *P. aeruginosa* assim como da maioria das bactérias Gram negativas não apresentam grande potencial para proteção eficaz.

Pesquisas já foram feitas em camundongos, camundongos queimados, em cobaias com infecções crônicas pulmonares nos estudos pré-clínicos, e também em humanos nas fases I, II e III. Na fase I determina-se dose, via de administração e efeitos colaterais; na fase II avalia-se a eficácia e segurança quanto à toxicidade e na fase III é quando se compara o novo medicamento com o já existente.

A Pseudogen®, vacina de subunidade composta por LPS de *P. aeruginosa* heptavalente (HANESSION *et al.*, 1971) provocou reações adversas em humanos apesar de bem tolerada nos experimentos animais. Chegou às fases II e III, testada em pacientes com Fibrose Cística, câncer, queimados e em tratamento intensivo. Mas foi retirada do mercado por suas altas taxas de reações adversas como por exemplo febre, em cerca de 30% dos pacientes, nos diferentes grupos testados (DÖRING E PIER, 2008).

Pseudogen® em pacientes com câncer ou queimados aumentou a sobrevivência com a diminuição de infecções fatais, mas com incidência alta de efeitos colaterais (ALEXANDER E FISHER, 1974; YOUNG, MEYER E ARMSTRONG, 1973). Nos testes em crianças com Leucemia não foi observado controle da infecção e em pacientes com Fibrose Cística apesar de apresentarem títulos altos de anticorpos não houve benefício clínico (PENNINGTON *et al.*, 1999)

#### 2.4.1 Vacinas conjugadas

O uso da vacina conjugada contorna um problema da imunização contra antígenos não-proteicos: a falta de memória imunológica. A vacina conjugada faz com que neonatos e crianças respondam à vacinação com um antígeno contra o qual naturalmente não têm capacidade de responder. Um exemplo de sucesso é a vacina mundialmente usada contra Hib (*Haemophilus influenzae* tipo B) que é composta pelo seu polissacarídeo capsular conjugado com toxóide tetânico (toxina tetânica inativada) (PEETERS *et al.*, 1992a). Vacinas contra *Neisseria meningitidis* Grupo C e contra sete sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* já foram licenciadas e muitas outras estão em desenvolvimento.

Os meios para aumentar a imunogenicidade de polissacarídeos foram primeiro descritos por AVERY E GOEBEL em 1929 (apud MIDWINTER *et al.*, 1994), que ligaram covalentemente carboidratos a proteínas antigênicas carreadoras, para formar um conjugado. Estes conjugados fornecem imunogenicidade celular T-dependente contra o polissacarídeo.

Com o envolvimento de células T, a memória imunológica é recrutada e uma mudança no isotipo de imunoglobulinas também ocorre (JONES, 2005). Enquanto polissacarídeos induzem resposta imunológica em adultos, em crianças são apenas pouco ou não imunogênicos.

Para antígenos T-independentes, IgG3 e IgM são a maioria dos isotipos de anticorpos expressos em camundongos, mesmo depois da segunda imunização. Em contraste, para antígenos T-dependentes, a taxa de IgG e IgM aumenta depois da revacinação, sendo a maioria IgG1 em camundongos (CUELLO *et al.*, 2007).

A resposta da vacina conjugada é conferida pelo Reconhecimento Ligado (FIGURA 4). O reconhecimento ligado foi desvendado com estudos sobre a produção de anticorpos contra haptenos (substâncias pequenas que não desencadeiam resposta de anticorpos) acoplados a uma proteína transportadora. No reconhecimento ligado de uma vacina conjugada, a célula B reconhece e liga o carboidrato, internaliza e degrada todo o conjugado e então exibe os peptídeos derivados da proteína conjugada no MHC II na superfície da célula. As células T auxiliares geradas em resposta à vacinação anterior ou por contato com o antígeno protéico reconhecem o complexo na superfície da célula B e ativam as células B para produção de anticorpos tanto para o carboidrato quanto para proteína (JANEWAY *et al.*, 2002).

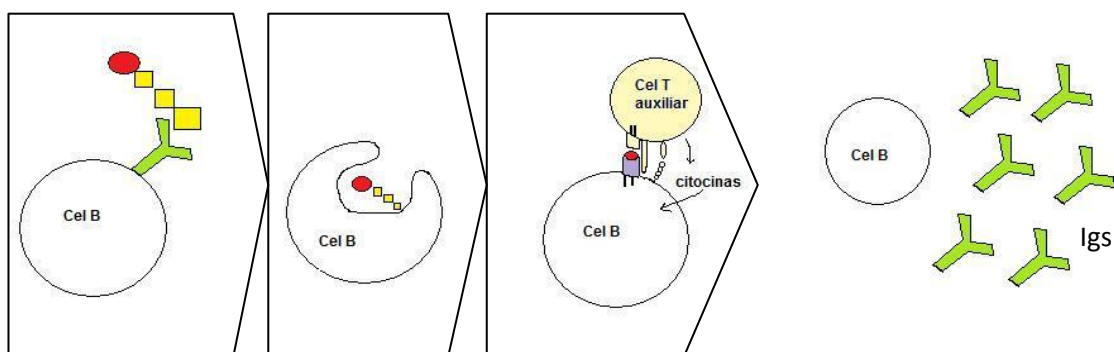


FIGURA 4: SEQUENCIA DO RECONHECIMENTO LIGADO DO CONJUGADO PROTEÍNA (EM VERMELHO) E LPS (AMARELO).

A cel. B com receptor de membrana para o LPS internaliza o imunoconjugado e o processa. Fragmentos da proteína são apresentados em MHC II que recruta cel. T auxiliares, estas pela interação com o MHC e CD40 ativa a cel. B por citocinas para que esta inicie a expansão clonal produzindo plasmócitos e imunoglobulinas e cel. B de memória.

FONTE: ADAPTADO DE JANEWAY *et al.* (2002).



Em 1989, CRYZ, SADOFF, CROSS E FURER desenvolveram uma vacina octavalente de Ag-O purificado de *P. aeruginosa* (37%) conjugado com exotoxina A (63%) da própria *Pseudomonas* sp., chamada Auregen®, de administração intramuscular que em camundongos garantiu proteção contra o desafio com os sorotipos utilizados como antígenos. Sua administração intranasal em camundongos obteve proteção efetiva, mas a vacinação por essa via em humanos ainda não é clara na geração de imunidade protetora (ZUECHER *et al.*, 2006).

As fases II e III com a Auregen® foram testadas em pacientes com Fibrose Cística não colonizados com *P. aeruginosa* (CRYZ *et al.*, 1997), mas foi interrompida em 2006 pelos fabricantes (Berna Biotech Ltda). Os resultados desse estudo ainda não foram publicados. Um dos fatos que pode explicar a falha na imunização de pacientes com Fibrose Cística é que a maioria das *Pseudomonas* isoladas destes pacientes são cepas com LPS na forma rugosa, as quais não produzem o polissacarídeo O (DÖRING E PIER, 2008).

Outro imunocombinado pesquisado é o alginato com a exotoxina A que induziu níveis elevados de anticorpos em coelhos (CRYZ, FURER E QUE, 1991). O alginato é uma estrutura bem menos variável do que o LPS, varia apenas em tamanho molecular dependendo do número de resíduos ligados ao polímero, mas isso também pode interferir na resposta imune. KASHEF *et al.* (2006) estudaram uma vacina de alginato conjugado com toxóide tetânico utilizando ácido adípico como espaçador e EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) para conjugação, e os resultados em camundongos mostraram proteção contra doses letais de *Pseudomonas* sp. do morfotipo mucóide que secretam alginato.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CULTIVO E INATIVAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* cepa ATCC 27853 (Newprov) foi cultivada em Ágar Sangue (Newprov), a 37°C, por 24h. Após o crescimento, uma suspensão das colônias em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada foi preparada e inativada com formaldeído 37% (1:50), por 12h a 8°C. A confirmação da inativação se dava com a ausência de crescimento quando uma amostra da suspensão era semeada e incubada a 37°C por 24h.

#### 3.2 CONTAGEM E LIOFILIZAÇÃO

Comprovada a inativação, a quantidade de bactérias foi estimada em unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) comparando-se uma diluição da suspensão com a escala de Mac Farland, por método turbidimétrico. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 2794g, a uma temperatura de 8°C durante 20 minutos e o precipitado lavado duas vezes com água destilada. Um volume conhecido foi congelado e liofilizado para se estimar o peso seco.

#### 3.3 EXTRAÇÃO DO LPS

O protocolo utilizado para extração de LPS de *P. aeruginosa* foi padronizado segundo a técnica de WESTPHAL & JANN (1965) que utiliza a mistura de fenol e água quente. Procedimento: 20g da bactéria foram solubilizados em 350mL de água previamente aquecida a 65-68°C; adicionaram-se 350mL de uma solução de fenol a 90%, também aquecida previamente a 65-68°C, à suspensão bacteriana, sob agitação, por 15 minutos. Em seguida centrifugou-se a suspensão a 2630g, em temperatura de 10°C, durante 40 minutos. Que foi dialisada contra água destilada por 4 dias.

### 3.3.1 Análises do LPS

Após a diálise foram dosados açúcar total e proteína total da fração aquosa, que será denominada de LPS. A dosagem de açúcar total (AT) foi realizada pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) com leitura em 490 nm. O princípio da técnica é dar uma cor amarelo-laranja quando os polissacarídeos são tratados com fenol e ácido sulfúrico concentrado.

A dosagem de proteína total (PT) pelo método de HARTREE (1972) com leitura em 650 nm, sob condições alcalinas ocorre a formação de complexos de proteínas pela reação com o tartarato de cobre e o reagente de Folin-Ciocalteu, o resultado são tons de azul conforme a concentração de proteínas da solução.

### 3.4 GEL-PERMEAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Uma amostra do LPS contendo 2 mg de AT foi aplicada em uma coluna de gel-permeação de sefarose (*Sepharose* CL-4B, Sigma) de 60,3 cm de altura com 2 cm de diâmetro, e, eluída com solução salina (NaCl 0,85%). Alíquotas de 2 mL foram coletadas para dosagens de AT e PT. Também foi aplicada uma solução na concentração de 2 mg da BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma) utilizada para conjugação com o LPS de *P. aeruginosa*. Alíquotas de 5 mL foram coletadas e dosadas quanto à concentração de PT.

### 3.5 CONJUGAÇÃO DOS ANTÍGENOS

O método de conjugação padronizado utilizando-se o meta-periodato de sódio como espaçador para a aminação reductiva direta foi adaptado de SHEN *et al.* (2001). Dissolveram-se 90 mg de LPS em 9 mL de água destilada e 4 mM de meta-Periodato de Sódio (NaIO<sub>4</sub>) sob agitação, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 1,5 h. Em seguida, adicionou-se etileno-glicol mantendo a solução por mais 30 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. O material foi então dialisado contra água destilada por 3 dias.

Após diálise foi adicionado Bicarbonato de Sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0,1 M e o pH ajustado para 8,5; em seguida solubilizaram-se 60,3 mg de BSA e finalmente adicionaram-se 20 mg/mL de Cianoborohidreto de Sódio ( $\text{NaCNBH}_4$ ) sob agitação leve, ao abrigo da luz, a temperatura de 37°C, por 5 dias. Após o tempo de incubação, 10 mg/mL de Borohidreto de Sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) foram solubilizados. Por final a solução foi dialisada contra água destilada por 4 dias.

### 3.5.1 Análises do imunoconjugado

Foram realizadas dosagens de AT pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) e de PT pelo método de HARTREE (1972) para determinar quantidade do conjugado a ser aplicada na coluna de gel-permeação e avaliar proporção LPS:BSA da conjugação.

## 3.6 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, com idade entre 3 e 4 semanas. Autorização para utilização desses animais foi concedida pelo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (Anexo1, p.48). Os animais foram tratados com ração própria para camundongos e água filtrada *ad libitum*. Eram levados do biotério ao Laboratório de Microbiologia Yasuyoshi Hayashi para os procedimentos de pesagem, vacinação e colheita de sangue.

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

Inicialmente os animais foram divididos em 3 repetições quando completaram idade entre 6-7 semanas, cada repetição com 6 grupos de 5 camundongos. As vacinações foram realizadas pela via subcutânea, 3 doses de 100  $\mu\text{L}$ , com intervalo de 21 dias. Foi utilizado 10% de hidróxido de alumínio (Omega<sup>®</sup>) por dose como adjuvante. Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo 1, controle (solução salina e adjuvante vacinal hidróxido de alumínio - Al(OH)<sub>3</sub>).
- Grupo 2, vacina de subunidade experimental (vacina contendo 20 µg/dose LPS purificado de pseudomonas experimental adicionada de albumina 24 µg/dose e de adjuvante vacinal hidróxido de alumínio - Al(OH)<sub>3</sub>).
- Grupo 3, vacina de subunidade conjugada experimental – dose 1 (vacina conjugada LPS-BSA nas concentrações de 5 µg e 6 µg/dose respectivamente, adicionada de adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>).
- Grupo 4, vacina de subunidade conjugada experimental – dose 2 (vacina LPS-BSA contendo 10 e 12 µg/dose, adicionada de adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>).
- Grupo 5, vacina de subunidade conjugada experimental – dose 3 (vacina LPS-BSA contendo 20 e 24 µg/dose respectivamente, adicionada de adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>).
- Grupo 6, vacina de subunidade conjugada experimental – dose 4 (vacina LPS-BSA contendo 40 e 48 µg/dose respectivamente, adicionada de adjuvante Al(OH)<sub>3</sub>).

### 3.7 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA DA VACINA *IN VIVO*

#### 3.7.1 Desafio pós-vacinal

Para testar a resposta *in vivo* da vacina contra *P.aeruginosa*, os camundongos vacinados foram desafiados com uma suspensão do antígeno vivo na concentração de 5 x DL50 (Dose Letal 50%).

##### 3.7.1.1 Determinação da Dose Letal 50% - DL50

Para determinação da DL50, camundongos Swiss provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, foram divididos em 5 grupos com 5 animais cada, mantidos nas mesmas condições dos camundongos que receberam as

vacinas, foram inoculados via intraperitoneal na dose de 0,5mL com diluições de uma solução de *P. aeruginosa* viva e os camundongos ficaram em observação por cinco dias. Essas diluições variaram do tubo 1 da escala de Mac Farland, que equivale a  $3 \times 10^9$  UFC/mL, em  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ .

O cálculo de Reed & Muench (1938) quando aplicado nos resultados das observações dos grupos determina a DL50.

Os Grupos são descritos a seguir:

- Grupo 1: controle inoculado com solução salina;
- Grupo 2: inoculado com  $3 \times 10^{10}$  UFC/mL;
- Grupo 3: inoculado com  $3 \times 10^9$  UFC/mL;
- Grupo 4: inoculado com  $3 \times 10^8$  UFC/mL;
- Grupo 5: inoculado com  $3 \times 10^7$  UFC/mL;

A quantidade de bactérias na diluição foi confirmada por uma contagem em placa, em Ágar PCA (Plate Count Agar – Agar para Contagem). Diluições até  $10^{-8}$  foram feitas e 0,1 mL das diluições  $10^{-8}$  e  $10^{-7}$  foram plaqueadas, em triplicata, e incubadas a 37°C por 24h para então proceder à contagem. O número total de unidades formadoras de colônia por mililitro foi obtido pela seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ \text{ UFC/mL} = \text{média n}^\circ \text{ colônias} \times \text{diluição} \times 10$$

### 3.7.2 Titulação de anticorpos

O título de anticorpos aglutinantes foi determinado por soro-aglutinação em lâmina adaptado de LABORDE E DE FAJARDO (1969). O antígeno foi preparado com a suspensão de uma cultura de *P. aeruginosa* (cepa ATCC 27853 Newprov) em solução salina (NaCl 0,85%) até atingir opacidade equivalente ao tubo 10 da escala de McFarland.

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

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar se houve diferença significativa entre o título de anticorpos dos grupos, foi aplicado o teste  $t$  de Student, com um nível de significância de 0,05 para comparação das médias dos títulos aglutinantes entre os grupos vacinados e o desvio padrão dos títulos de anticorpos obtidos (BOLTON, 1990).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Envolvendo a pesquisa com vacinas conjugadas, o foco do projeto foi adaptar um protocolo de conjugação com metodologias simples, aplicáveis à nossa realidade de pesquisa, que pudesse servir como padrão para ser utilizado com outros antígenos. *Pseudomonas aeruginosa* foi escolhida para padronizar o protocolo por ser facilmente cultivável e por já existirem pesquisas desenvolvidas na linha de vacinas conjugadas com esta bactéria. Uma vacina contra *P. aeruginosa* teria seu uso direcionado para pacientes de risco, como os acometidos por Fibrose Cística, queimaduras ou câncer.

### 4.1 CULTIVO, LIOFILIZAÇÃO E EXTRAÇÃO DO LPS

Cada mililitro da suspensão bacteriana inativada pós-liofilização pesou 47,4 mg. Para extração do LPS foram utilizados 6,8 g de *Pseudomonas aeruginosa* conforme o protocolo de fenol-água quente descrito.

A extração de LPS de bactérias com fenol-água quente baseia-se no princípio de que misturas homogêneas de volumes iguais de fenol e água a 65-68°C desintegram rapidamente as células e uma grande parte (mais de 40%) dos componentes bacterianos passam para a solução. O fenol é um excelente solvente de muitas proteínas. Mas, polissacarídeos, mucopolissacarídeos, lipopolissacarídeos e ácidos nucleicos são insolúveis em fenol. Assim, ele provoca a dissociação do complexo antígeno somático (polissacarídeo O) da parede bacteriana de tal maneira que o tratamento subsequente com água permite a extração da maioria do polissacarídeo antigênico não degradado nesta solução (WESTPHAL & JANN, 1965).

Após centrifugação, 3 frações ficaram separadas: sobrenadante fração aquosa, intermediária fração residual e no fundo a fração fenólica (FIGURA 5, p.32). As frações aquosas coletadas misturadas somaram 200 mL, foram então centrifugadas novamente para retirar traços de material insolúvel e dialisadas contra água destilada para remover o fenol e pequenas quantidades de substâncias bacterianas de pequena massa molecular. A fração aquosa, após diálise, continha o LPS bacteriano livre de proteínas e o ácido nucleico.



A técnica para obtenção do LPS com fenol-água quente é simples e muito eficiente, o material após extração, na forma aquosa, também é vantajoso para aplicação de técnicas de conjugação.

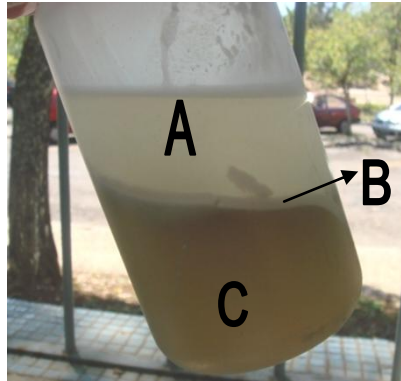


FIGURA 5 – FOTO DAS FRAÇÕES SEPARADAS APÓS CENTRIFUGAÇÃO NA EXTRAÇÃO DE LPS DE *P. aeruginosa*. “A” É A FRAÇÃO AQUOSA, “B” A RESIDUAL E “C” A FENÓLICA.  
FONTE: o autor (2007)

#### 4.1.1 Análises do LPS

A dosagem de AT pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) indicou uma concentração de 517,5 µg/mL e a quantidade de PT foi muito pequena, não sendo possível ser detectada pelo método de HARTREE (1972) (QUADRO 1, p. 33).

Com base em resultados reportados em estudos prévios, utilizou-se o LPS, por ser o componente mais imunogênico de bactérias Gram negativas, apesar de provocar efeitos colaterais e ser pirogênico dependendo da dose (HOLDER, 2004; PIER, 2003; STANISLAVSKY E LAM, 1997; GOLDBERG E PIER, 1996). Outro pesar é que o Ag-O é muito variável, a IATS (International Antigenic Typing Scheme, proposto por LIU *et al.*, 1983) define hoje 20 sorogrupos. Mas análises estruturais têm revelado que existe uma maior variabilidade química nos Ag-O de *P. aeruginosa* com, provavelmente, cerca de 30 estruturas sendo expressas comumente entre os isolados clínicos.

Linhagens pertencentes ao mesmo sorogrupo expressam estruturas químicas diferentes no Ag-O caracterizando a variação antigênica (PIER, 2003). No presente estudo, apenas uma linhagem bacteriana é utilizada, o ideal seria que essa vacina fosse multivalente, como a Auregen<sup>®</sup>, ou melhor, direcionada, incluindo apenas os sorotipos mais prevalentes em cada região.

## 4.2 OBTENÇÃO E ANÁLISES DO CONJUGADO

Foram obtidos aproximadamente 94 mL de conjugado LPS-BSA (FIGURA 6), utilizado nos experimentos posteriores de vacinação. Após a diálise foram feitas dosagens de AT e PT do conjugado. A dosagem de AT pelo método de DUBOIS *et al.* (1956) indicou uma concentração de 373  $\mu\text{g/mL}$  e a dosagem de PT pelo método de HARTREE (1972) 463  $\mu\text{g/mL}$  (QUADRO 1). Com os resultados das dosagens foi possível estimar o rendimento da conjugação, dos 90 mg de LPS utilizados inicialmente obteve-se no produto final cerca de 40% dele, e uma concentração maior de proteína total por mililitro do que açúcar total.

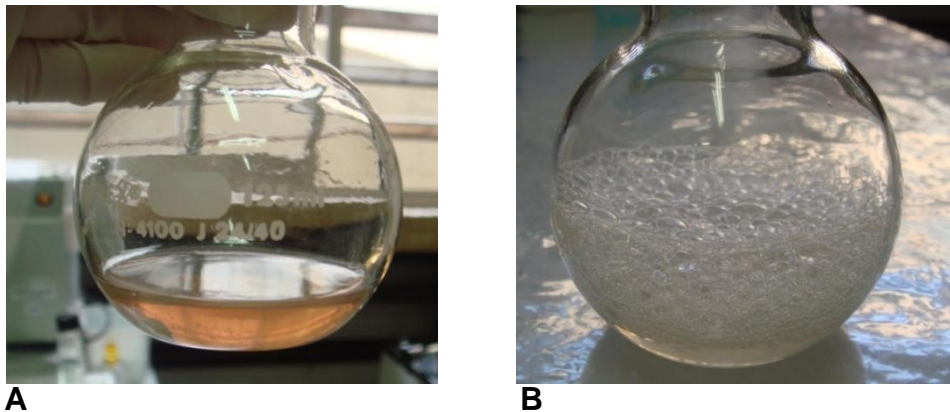


FIGURA 6 – REAÇÃO DE CONJUGAÇÃO, EM **A** ASPECTO DA SOLUÇÃO DE CONJUGAÇÃO DEPOIS DA AMINAÇÃO REDUTIVA E EM **B** 18h APÓS A ADIÇÃO DE  $\text{NaBH}_4$  E ANTES DA DIÁLISE.

FONTE: O AUTOR, 2007.

	[Açúcar Total]	[Proteína Total]
<b>LPS <i>P. aeruginosa</i></b>	517 $\mu\text{g/mL}$	-
<b>Conjugado LPS-BSA</b>	373 $\mu\text{g/mL}$	463 $\mu\text{g/mL}$

QUADRO 1: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO LPS EXTRAÍDO DE *P. aeruginosa* E DO CONJUGADO LPS-BSA.

O m-Periodato de Sódio foi utilizado como espaçador para a conjugação por aminação redutiva, ele oxida as hidroxilas do LPS a grupamentos aldeído reativos. A aminação ocorre quando existe o acoplamento dos grupamentos amina da BSA aos grupos aldeído reativos formando iminas. E o  $\text{NaCNBH}_4$  faz a redução dessas iminas para deslocar o equilíbrio da reação tornando-a irreversível (FIGURA 7, p.34).

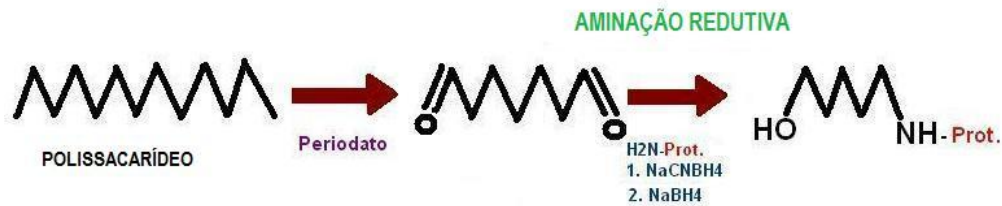


FIGURA 7: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA OXIDAÇÃO DO POLISSACARÍDEO PELO m-PERIODATO DE SÓDIO EM OLIGOSSACARÍDEOS COM GRUPAMENTOS ALDEÍDO REATIVOS CAPAZES DE SE LIGAREM AOS GRUPAMENTOS AMINA PROTEICOS.  
 FONTE: ADAPTADO DE JONES (2005)

#### 4.3 GEL PERMEAÇÃO DO LPS, DA BSA E DO CONJUGADO LPS-BSA

O perfil de eluição da BSA em coluna de sefarose (Sepharose CL-4B, Sigma), obtido por meio da dosagem de PT das alíquotas eluídas, está representado no GRÁFICO 1, apontando uma amostra homogênea pela observação de um pico definido (utilizamos uma albumina purificada de padrão eletroforético), eluindo entre 25 e 40 mL. Como esperado, a dosagem de AT do eluato de BSA foi nula. Todos os gráficos apresentados com os perfis de eluição desconsideram o volume morto da coluna de 20 mL.

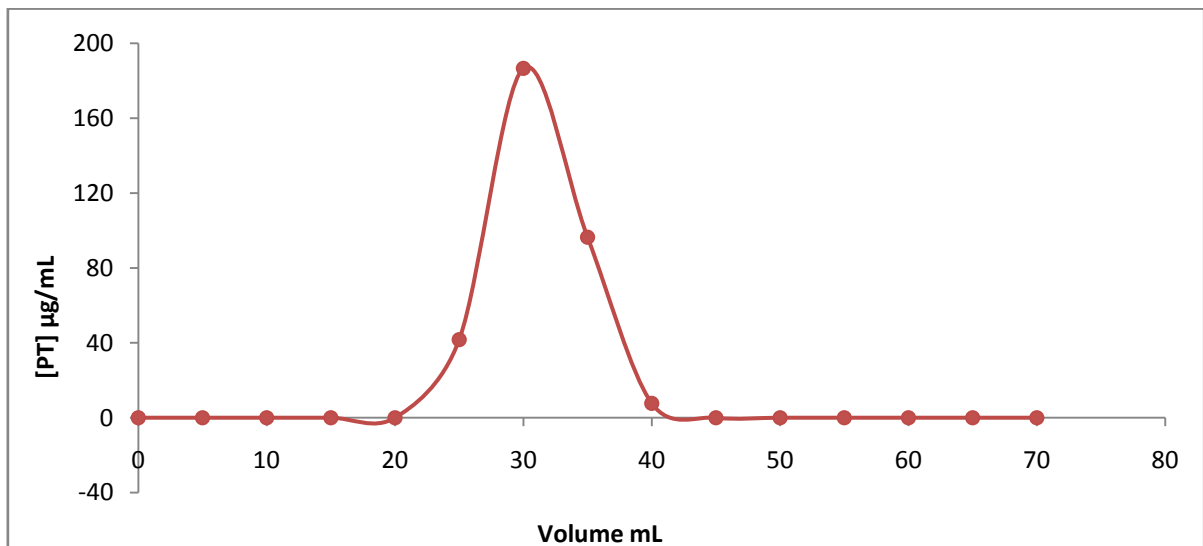


GRÁFICO 1 – PERFIL DE ELUIÇÃO DA BSA APÓS PASSAGEM POR COLUNA DE GEL PERMEAÇÃO (SEPHAROSE CL-4B, ELUENTE: NaCl 0,85%).

O GRÁFICO 2 (p. 35) mostra o perfil de eluição do LPS de *P. aeruginosa*, com observação de um pico de dosagem de açúcar entre 2 e 12 mL, indicando que seria necessário avaliar o perfil de eluição em colunas com limites de exclusão

diferentes da *Sepharose* CL-4B. Não se descarta a hipótese de que as moléculas de LPS pudessem estar agregadas, eluindo mais rapidamente, devido à concentração da amostra no rotaevaporador para passagem na coluna. Essa hipótese é reforçada pelo fato de que foram relatadas massas moleculares para as porções polissacarídicas do LPS de *P. aeruginosa* entre  $0,3 \times 10^{-5}$  e  $2,25 \times 10^{-5}$  g/mol (PIER *et al.*, 1981). Observa-se também uma cauda arrastada, após o pico em 4 mL, que se estende até a alíquota coletada correspondente ao tubo de 78 mL, o que pode ser um indicativo de amostra composta por fragmentos de diferentes massas moleculares, com um número menor de resíduos de açúcar à medida que o volume de eluição aumenta. O LPS pode apresentar diferentes tamanhos, dependendo do número de porções sacarídeas no polissacarídeo O (Ag-O) (GOLDBERG E PIER, 1996). Como esperado, não foi detectada proteína em nenhuma das frações eluídas de LPS. Os gráficos gerados com as leituras do LPS e BSA separados nos permitem diferenciá-los de quando conjugados.

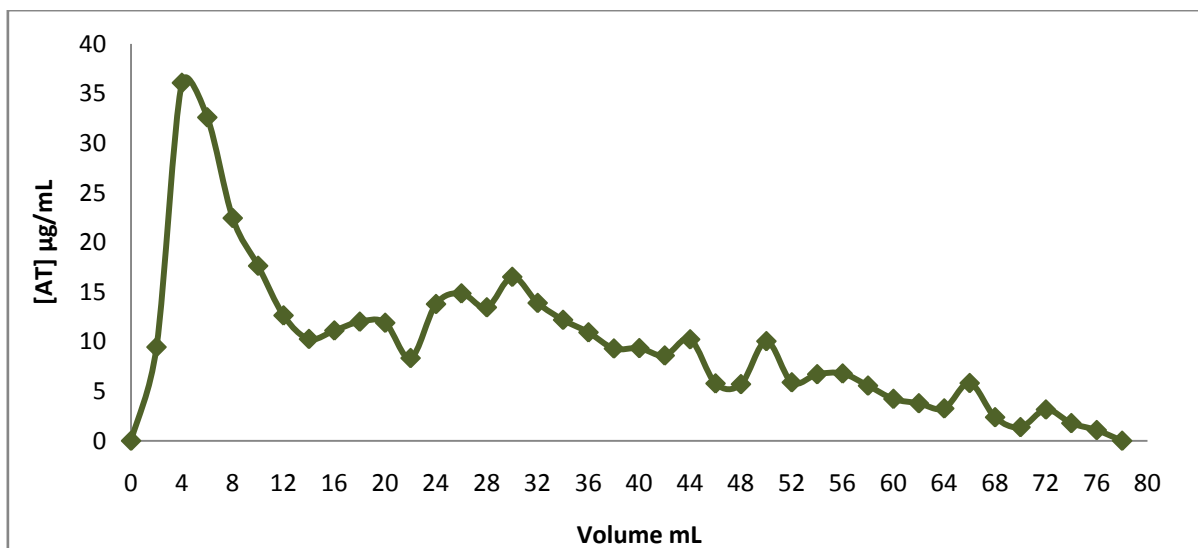


GRÁFICO 2 – PERFIL DE ELUIÇÃO DO LPS DE *P. aeruginosa* NÃO CONJUGADO EM COLUNA DE GEL PERMEAÇÃO (SEPHAROSE CL-4B, ELUENTE: NaCl 0,85%)

O perfil de eluição do conjugado LPS-BSA gerou o GRÁFICO 3 (p. 36) pelas dosagens de AT e PT das alíquotas coletadas. O perfil de eluição obtido pela dosagem de AT mostra um primeiro pico, pequeno, em torno de 2 mL que provavelmente representa o LPS não conjugado, e, possivelmente, uma fração de conjugado LPS-BSA de maior massa molecular, pois observando o perfil de eluição de PT, há detecção de albumina em torno de 2 mL também. Outra possibilidade

existente é a formação de proteínas com tamanhos maiores com a conjugação proteína-proteína.

O maior pico observado no GRÁFICO 3, tanto para dosagem de AT como de PT, encontra-se em torno de 20 mL, onde provavelmente contém o conjugado LPS-BSA, pois há total sobreposição da dosagem de AT e de PT; além disso, houve um aumento no tamanho da BSA em decorrência da conjugação com LPS, levando a eluição da proteína conjugada em volumes inferiores à da BSA sem conjugar, como observado no GRÁFICO 1 (p. 34). Já o LPS passa a ser eluído em volume mais alto, indicando que uma possível agregação molecular na amostra sem conjugar (GRÁFICO 2, p. 35) seria desfeita durante as etapas da reação de conjugação.

No terceiro pico do GRÁFICO 3 estaria a BSA livre, não conjugada, com indicativo de degradação protéica e geração de moléculas de tamanho menor, pois há eluição em volumes mais altos que o observado no perfil de BSA antes da reação de conjugação (GRÁFICO 1, p.34).

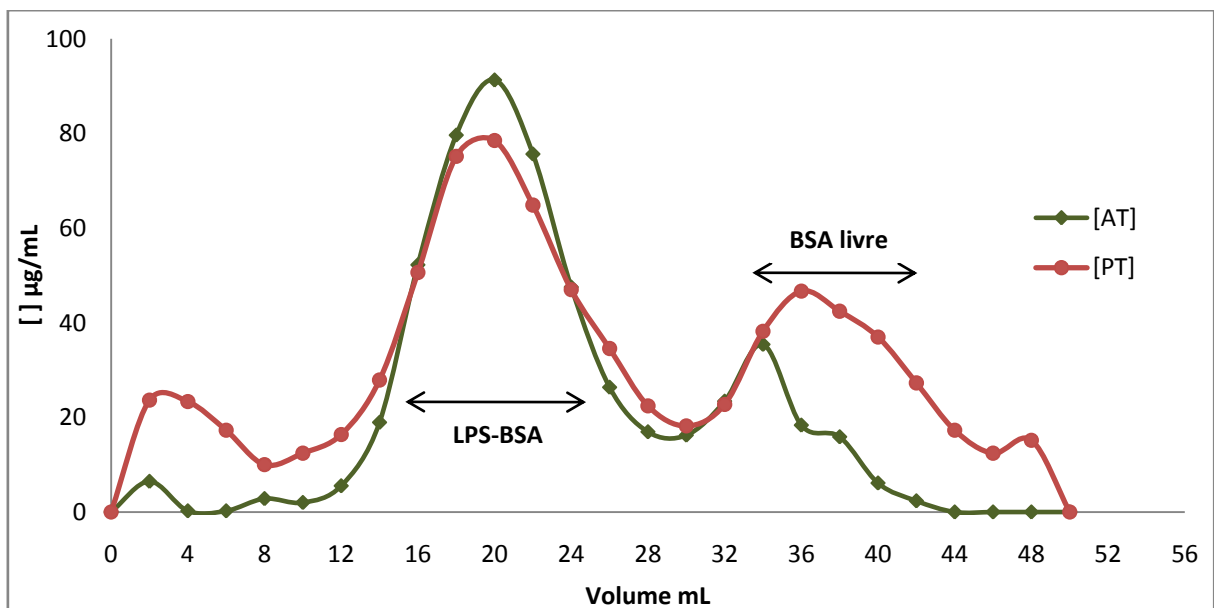


GRÁFICO 3 – PERFIL DE ELUIÇÃO (SEPHAROSE CL-4B, ELUENTE: NaCl 0,85%) DO IMUNOCONJUGADO LPS-BSA.

#### 4.4 CONFIRMAÇÃO DA CONJUGAÇÃO

O método utilizado para confirmação da conjugação foi a gel permeação. Comparando-se os gráficos de gel permeação do LPS e da BSA com o do conjugado, LPS-BSA, é possível confirmar se o açúcar está saindo junto com a

proteína, ou seja, indica que houve conjugação. Também foram feitas tentativas de eletroforese em gel de poliacrilamida com coloração por prata e azul de coomassie, das amostras totais, de amostras eluídas na coluna de gel permeação e de estas dialisadas também; mas por essa técnica não foi possível ver a separação nítida de bandas na amostra contendo LPS ou LPS-BSA havendo a formação de um arraste (dados não apresentados), indicando que a técnica deve ser melhorada e que também outro método, como *Western Blot*, deve ser aplicado, assim seria possível utilizar anticorpos marcados anti- BSA e anti- LPS para se confirmar a presença do imunoconjugado.

O método de conjugação adaptado de SHEN *et al.* (2001) mostrou-se simples e não requer muitos aparelhos, mas é custoso em tempo e necessita de sucessivas etapas de diálise. O conjugado também resultou em um material adequado para ser liofilizado ou para vacinação: uma solução líquida, sem grumos e translúcida que permite visualização de precipitação ou contaminação.

A intenção foi demonstrar consistência no processo de fabricação do conjugado para que, quantas forem as produções sucessivas, elas apresentem repetibilidade. Para isso, os seguintes pontos abaixo enumerados foram observados:

- 1- Identificação do LPS usado na composição da vacina e confirmação de sua presença no produto final. Isso foi alcançado comparando-se a gel-permeação do LPS livre com a do LPS-BSA, além da resposta *in vivo*, se a soro-aglutinação ocorreu, foi pelo reconhecimento do antígeno pelo anticorpo produzido pela resposta imune. Outras técnicas como o *Western Blot* ou a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) poderiam ser utilizadas em próximos experimentos para confirmar a presença ou ausência do LPS no conjugado.
- 2- Identificação e confirmação da presença da proteína carreadora utilizada. Pelas dosagens de proteína total e também pela gel-permeação, a presença da BSA foi confirmada no conjugado final.
- 3- A proporção LPS-BSA. Analisando apenas os tubos da gel-permeação correspondentes ao pico conjugado, a quantidade foi de quase 1:1 em  $\mu\text{g/mL}$  (Anexo 2, p.50). Uma baixa proporção sacarídeo-proteína requer uma imunização com quantidades desnecessárias de proteínas, uma vez que o foco é resposta a porção sacarídea. Mas, a proteólise da proteína carreadora é requerida para gerar peptídeos para serem apresentados pelo

MHC, e uma alta proporção sacarídeo-proteína pode interferir nesse processo, vacinas assim têm sua imunogenicidade reduzida. A proporção ideal tem que ser determinada pelos experimentos pré-clínicos ou clínicos (JONES, 2005; EGAN, FRASCH E ANTONY, 1995).

- 4- A presença de LPS livre. LPS não conjugado reduz a imunogenicidade da vacina, possivelmente por competição pelas imunoglobulinas (JONES, 2005). A quantidade de sacarídeo e proteína carreadora livres são especificações chaves no controle de qualidade da vacina (PEETERS *et al.*, 1992b). Identificamos a presença de LPS e BSA livres, mas não os separamos do conjugado, esse é um ponto que deve ser desenvolvido e melhorado.
- 5- Massa molecular do conjugado é uma maneira simples e efetiva de modular a viscosidade e consistência física do conjugado final (PARISI E VON HUNOLSTEIN, 1999). Esse é outro ponto que deve ser concluído ainda com novas tentativas de eletroforese.

A pureza do produto de conjugação poderá ser melhorada utilizando apenas os tubos contendo as frações de eluato correspondentes ao pico de produto conjugado obtido por gel-permeação, assim se obtém o antígeno mais homogêneo, isento de LPS ou proteínas livres sem conjugar, como fizeram CRYZ *et al.* (1989), KASHEF *et al.* (2006) e CUELLO *et al.* (2007), obtendo-se uma concentração maior de conjugado por dose. Testes variando o tempo de oxidação do LPS e o tempo de conjugação na tentativa de melhorar o rendimento também devem ser feitos.

Uma vez estabelecido o método de conjugação, a modificação que deverá ser feita posteriormente é na proteína carreadora. Somente o toxóide tetânico e o toxóide diftérico têm sido usados para preparação de vacinas conjugadas que foram licenciadas para o uso em humanos ou estão em desenvolvimento na prática (KASHEF *et al.*, 2006; JONES, 2005). Nas próximas conjugações a anatoxina tetânica monomérica purificada será utilizada.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% - DL50

Passadas 24 horas da inoculação, todos os camundongos dos Grupos 2 e 3 estavam mortos e todos os camundongos dos Grupos 1, 4 e 5 sobreviveram. Os dos

grupos 4 e 5 apresentavam sinais de desidratação, febre e diarreia, enquanto os do grupo 1 estavam sem sinais, todos ativos. Nesse caso, a dose que mataria 50% dos camundongos seria de  $3 \times 10^{8,5}$  UFC/mL, a DL50 estaria exatamente entre a diluição do Grupo 4 e a do Grupo 3 (GRÁFICO 4). Não foi necessário o uso do cálculo de Reed & Muench (1938).

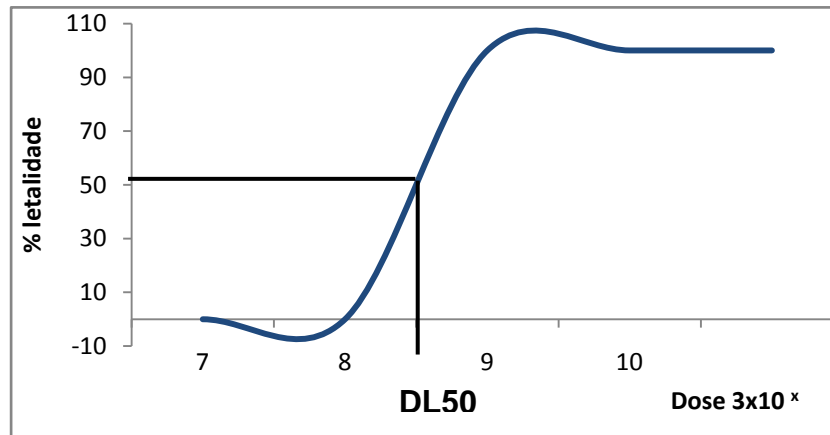


GRÁFICO 4: DETERMINAÇÃO DA DL50.

No eixo x descrevemos as potências das doses aplicadas nos grupos, a letalidade em 50% dos camundongos corresponde a  $3 \times 10^{8,5}$  UFC/mL.

#### 4.6 DESAFIO PÓS-VACINAL

Após 15 dias da última dose da vacina os camundongos foram inoculados via intraperitoneal com uma suspensão de *P. aeruginosa* viva na concentração de  $5 \times$  DL50. Como a Repetição 1 começou o calendário de vacinação uma semana antes das Repetições 2 e 3, esta foi desafiada uma semana antes também. Mas, o que ocorreu é que em menos de 24 horas após o desafio, todos os camundongos morreram, exceto um do Grupo 6. Então, os camundongos da Repetição 2 foram desafiados com  $2,5 \times$  DL50 apenas, mas novamente todos morreram após 24h.

Para a Repetição 3 o protocolo de hiperimunização (LABORDE E DE FAJARDO, 1969) foi testado, no qual os camundongos foram vacinados 3 vezes por semana por 3 semanas e na quarta semana diariamente. A vacina foi a mesma utilizada anteriormente para cada grupo, tanto o volume como as concentrações. O sangue foi colhido 15 dias após a última dose da vacina e depois mensalmente.

Na 14ª semana depois da hiperimunização uma dose de reforço foi administrada em todos os grupos para podermos observar um possível efeito



*booster* na titulação de anticorpos duas semanas depois. Essa revacinação foi com uma bacterina de *P. aeruginosa*, da mesma linhagem utilizada para extração de LPS, na concentração de  $10^7$  bactérias por dose com adjuvante hidróxido de alumínio (Omega<sup>®</sup>).

Com relação à resposta *in vivo*, depois da administração de 3 doses da vacina e com os camundongos das repetições 1 e 2 não sobrevivendo ao desafio, a utilização de um protocolo de hiperimunização foi necessário, justamente para ajudar a traçar uma direção em qual sentido deveria ser melhorada a concentração da dose.

#### 4.7 TESTES SOROLÓGICOS

O sangue dos camundongos vacinados da Repetição 3, colhido via periorbital, foi titulado segundo protocolo de LABORDE E DE FAJARDO (1969). A primeira colheita foi após 15 dias da última vacinação e as seguintes mensalmente para acompanhar a curva de anticorpos aglutinantes. Todos os grupos, exceto o Grupo 1, apresentaram algum título na soro-aglutinação, os grupos 2 e 6 foram os que maiores títulos alcançaram.

Os resultados das titulações estão demonstrados no QUADRO 2 (p.41). A titulação na 16<sup>a</sup> semana aumenta nos grupos devido à revacinação na 14<sup>a</sup> semana. Para facilitar a visualização dos resultados das titulações o GRÁFICO 5 (p. 41) demonstra as médias dos grupos em cada semana, e no GRÁFICO 6 (p. 42) a curva de titulação de anticorpos de cada grupo separadamente.

Comparando as médias entre os grupos vacinados com o conjugado (Grupos 3-6) com o grupo vacinado apenas com LPS (Grupo 2) pelo teste *t* com um valor de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ) podemos afirmar que as médias não são iguais ao nível de significância estabelecido na maioria das titulações. Em média, as titulações entre os grupos são diferentes, sendo que o Grupo 2, vacinado apenas com LPS, apresentou em termos práticos maiores titulações nas soro-aglutinações. O Grupo 6 apresentou diferença entre as médias com o Grupo 2 apenas em duas titulações, as da semanas 10 e 14, nas outras não houve diferença estatística considerando  $p=0,950$ .

Semanas após vacinação	Variação da titulação em cada grupo vacinado ( $\mu\text{g}/\text{dose LPS}$ )					
	G1 (controle)	G2 (20 $\mu\text{g}$ )	G3 (5 $\mu\text{g}^*$ )	G4 (10 $\mu\text{g}^*$ )	G5 (20 $\mu\text{g}^*$ )	G6 (40 $\mu\text{g}^*$ )
2	0	32-256	32-128	32-64	32-64	64-128
6	0	128-256	2-32	32-256	32-128	128-1024
10	0	128-256	16-64	16-128	16-64	16-64
14	0	32-128	4-16	2-16	2-16	8-64
16	0	128-512	16-64	16-128	16-128	64-128

\*Grupos vacinados com vacina conjugada, o equivalente em proteína por dose é de 6, 12, 24 e 48 $\mu\text{g}$  respectivamente.

QUADRO 2 – TÍTULOS MÍNIMOS E MÁXIMOS DAS SORO-AGLUTINAÇÕES DOS CAMUNDONGOS VACINADOS SEGUNDO O PROTOCOLO DE LABORDE E DE FAJARDO (1969).

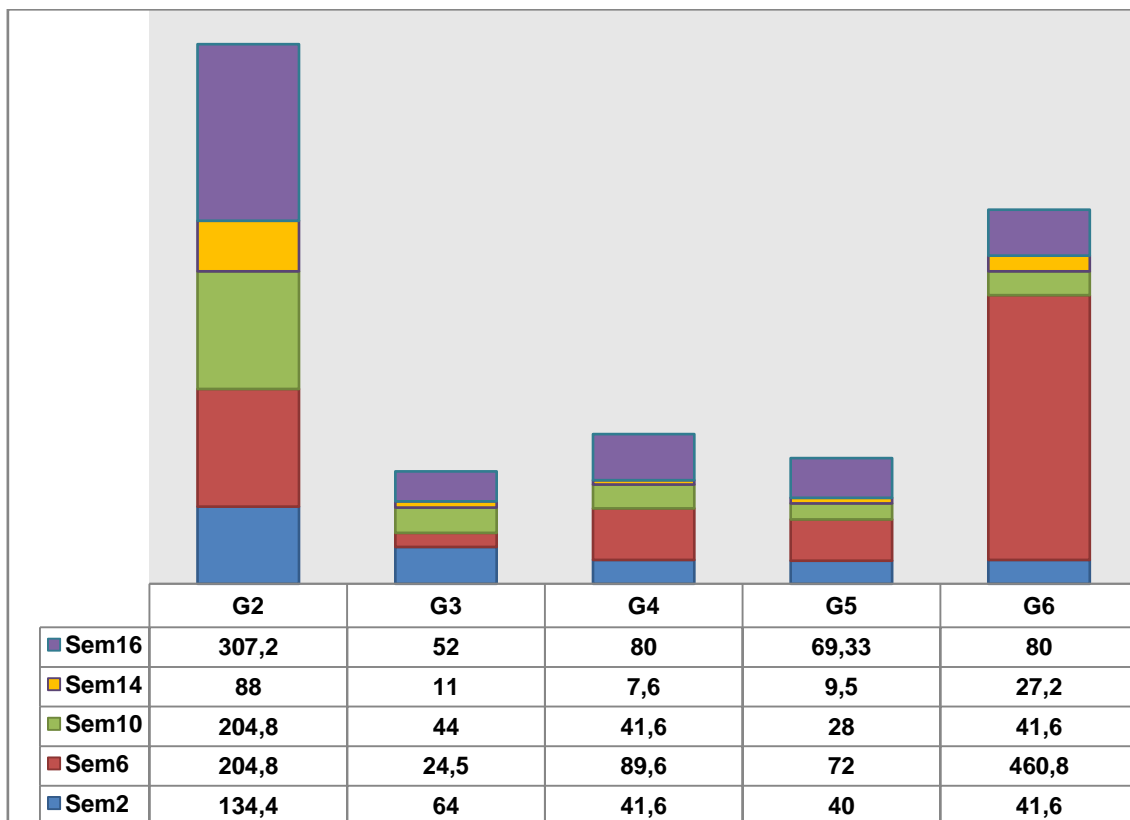


GRÁFICO 5: MÉDIAS DAS TITULAÇÕES DOS GRUPOS.

Cada cor representa a média da sorologia na semana por grupo, as quais constam na legenda.

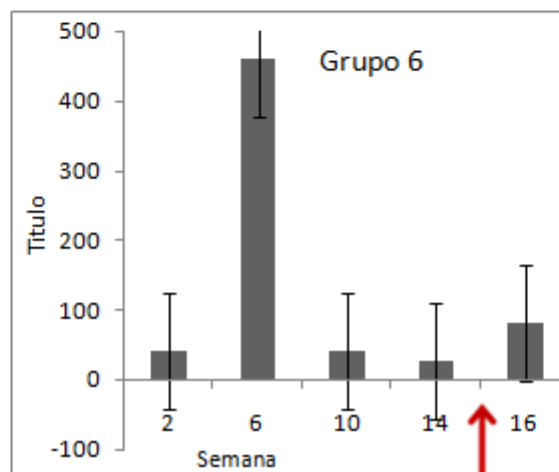
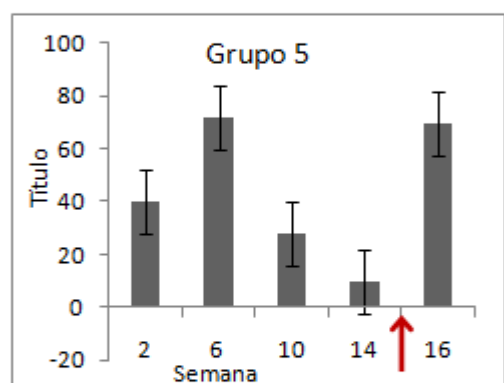
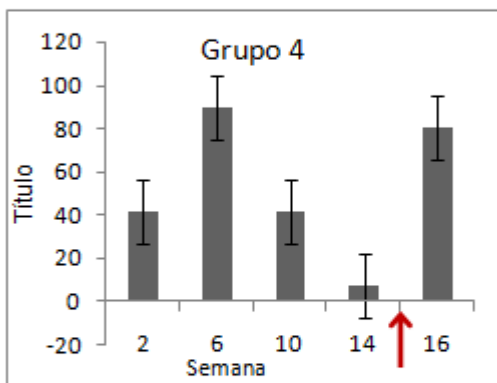
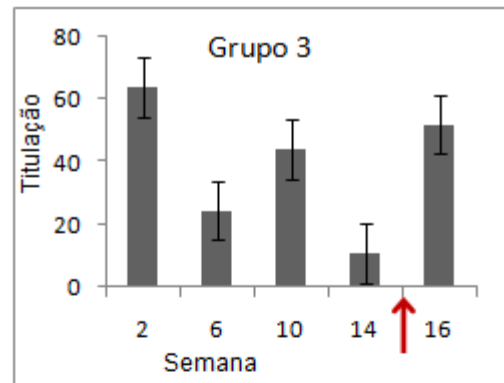
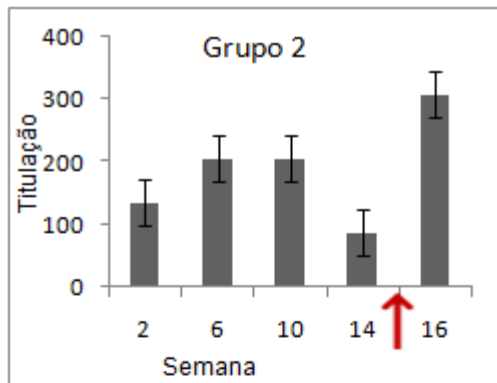


GRÁFICO 6: TÍTULO MEDIO DO GRUPO EM CADA COLHEITA DE SANGUE. GRUPO 2: VACINA DE LPS (20 $\mu$ g), GRUPO 3: VACINA DE LPS-BSA (5 $\mu$ g), GRUPO 4: VACINA DE LPS-BSA (10 $\mu$ g), GRUPO 5: VACINA DE LPS-BSA (20 $\mu$ g), GRUPO 6: VACINA DE LPS-BSA (40 $\mu$ g).

\*A seta vermelha indica quando foi aplicada a dose de reforço.

O resultado da hiperminunização nos mostra que é preciso melhorar a qualidade do conjugado. Por gel-permeação foi possível comprovar a ligação LPS-BSA, mas na imunização a resposta foi menor que o controle LPS sem conjugado. Não há uma definição de quais seriam os níveis de corte para avaliar a resposta sorológica para a vacina, mas todos os camundongos responderam à vacinação.

A hipótese de reconhecimento ligado e geração de memória ainda não foi confirmada, a ideia da revacinação foi para tentar avaliar a diferença nas respostas, mas como a titulação não tinha zerado ainda, e a resposta não foi tão intensa como esperávamos utilizando esse protocolo, não foi possível avaliar o estabelecimento de memória imunológica. A resposta alta inicial com queda rápida foi provavelmente devido à resposta das IgM de vida curta. Um teste para tentar diferenciar e quantificar IgM e IgG poderá futuramente nos dar resposta a essa hipótese. Se a vacina conjugada estiver mesmo tendo um reconhecimento ligado, e recrutando uma resposta T-dependente, depois da revacinação o título aumentaria devido a uma troca no isotipo de imunoglobulinas, com uma resposta maior de IgG.

## 5 CONCLUSÕES

A conjugação do LPS de *Pseudomonas aeruginosa* com a proteína carreadora BSA foi possível pela adaptação do protocolo de SHEN *et al.* (2001). Tanto o LPS quanto a BSA foram identificadas no conjugado final, em uma proporção de 1:1, por técnica de cromatografia de gel-permeação. Um método de purificação deve ser estudado para aumentar concentração e proporção do conjugado.

A imunização de camundongos com a vacina conjugada LPS-BSA garantiu resposta de anticorpos aglutinantes mesmo sendo em média menor que a vacina de LPS sozinho, sendo os títulos de aglutinação da 16ª semana de 1:80 (para a maior dose testada do conjugado) e 1:307, respectivamente. Uma dose efetiva deverá ser estudada.

Investigações futuras quanto aos efeitos colaterais desta vacina e sua habilidade para proteger em longo prazo contra a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* são necessárias.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.W. E FISHER, M.W. Immunization against *Pseudomonas* in infection after thermal injury. **Journal of Infection Disease**, n.130, p.152-158, 1974.
- AVERY, O.T. E GOEBEL, W.F. Chemo-immunological studies on conjugated carbohydrate proteins. II. Immunological specificity of synthetic sugar-protein antigens. **Journal of Experimental Medicine**, v.50, p.533-550, 1929.
- BASU, A.; RANGANI, K. AND SHRIVASTAV, T.G. Periodate method for the preparation of steroid enzyme conjugate for enzyme immunoassays. **Health and Population-Perspectives and Issues**, v.28, n.4, p.205-214, 2005.
- BOLTON, S. **Pharmaceutical Statistics – Practical and Clinical Applications**. New York:Marcel Dekker, 645p., 1990.
- BYSTROVA, O.V.; KNIREL, Y.A.; KOCHAROVA, N.A. *et al.* Structures of the core oligosaccharide and O-units in the R-and SR-type lipopolysaccharides of reference strains of *Pseudomonas aeruginosa* O-serogroups. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.46, p.85-99, 2006.
- CRYZ, JR.S.J.; SADOFF, J.C.; CROSS, A.S. E FURER, E. Safety and immunogenicity of a polyvalent *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 50 polysaccharide-toxin A conjugate vaccine effect of a booster dose on antibody levels in humans. **Infection Immunology**, v.56, p.1829-1830, 1989.
- CRYZ, JR.S.J., FURER, E. E QUE, J.U. Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-toxin A conjugate vaccine. **Infection Immunology**, v.59, p.45-50, 1991.
- CRYZ, JR.S.J.; LANG, A.; WEDGWOOD, J.; QUE, J.U.; FURER, E.; SCHAAD, U. Immunization of cystic fibrosis patients with a *Pseudomonas aeruginosa* O-polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. **Behring Institute Mitteilungen**, n.98, p.345-349, 1997.
- CUELLO, M.; CABRERA, O.; MARTINEZ, I. *et al.* New meningococcal C polysaccharide-tetanus toxoide conjugate. Physico-chemical and immunological characterization. **Vaccine**, v.25, p.1798-1805, 2007.
- DÖRING, G. E PIER, G.B. Vaccines and immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v.26, p.1011-1024, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A E SMITH, F. Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- EGAN, W.; FRASCH, C.E. E ANTONY, B.F. Lot release criteria, post-licensure quality control and the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. **Journal of the American Medical Association**, v.237, p.888-889, 1995.

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

HAJJAR, A.M.; ERNST, R.K.; TSAI, J.H.; WILSON, C.B. E MILLER, S.I. Human Toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. **Nature Immunology**, v.3, n.4, p.354-359, 2002.

HANNESSIAN, S.; REGAN, W.; WATSON, D. E HASKELL, T.H. Isolation and characterization of antigenic components of a new heptavalent *Pseudomonas* vaccine. **Nature**, v.229, p.209-210, 1971.

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

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry Method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p.422-427, 1972.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.J. O reconhecimento do antígeno pelos receptores de células B e células T. In:\_\_\_\_\_. **Imunobiologia – O sistema imune na saúde e na doença**. 5ªed. Porto Alegre:Artmed, p. 116-144, 2002.

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

JONES, C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.77, n.2, p. 293-324, 2005.

KASHEF, N.; BENZADIAN-NEJAD, Q.; NAJAR-PEERAYEH, S. *et al.* Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1441-1446, 2006.

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

LIU, P.V.; MATSUMOTO, H.; KUSAMA, H. E BERGAN, T. Survey of heat-stable major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.33, p.256-264, 1983.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M. E PARKER, J. The outer membrane of Gram-negative bacteria. In: \_\_\_\_\_. **Brock Biology of Microorganisms**, 8ªed., New Jersey:Prentice Hall, p.75-76, 1997.

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

NIAID – NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES. **Understanding Vaccines, what they are, how they work.** U.S. Department of health and human diseases. NIH Publication n°08-4219, 2008. Disponível em: <[www.niaid.nih.gov](http://www.niaid.nih.gov)> Acesso em 26 dez. 2008.

PARIZI, L. E VON HUNOLSTEIN, C. Determination of the molecular size distribution of *Haemophilus influenzae* type b-tetanus toxoid conjugate vaccines by size-exclusion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.847, p.209-211, 1999.

PEETERS, C.C.A.M.; EVENBERG, D.; HOOGHERHOUT, P. *et al.* Synthetic trimer and tetramer of 3-β-D-ribose-(1-1)-D-ribitol-5-phosphate conjugated to protein induce antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide in mice and monkeys. **Infection and Immunity**, v.60, n.5, p.1826-1833, 1992a.

PEETERS, C.C.A.M.; TENBERGEN-MEEKES, A.M.; POOLMAN, J.T.; ZEGERS, B.J E RIJKERS, G.T. Immunogenicity os a *Streptococcus pneumoniae* type 4 polysaccharide-protein conjugate vaccine is decreased by admixture of high doses of free saccharide. **Vaccine**, v.10, n.12, p.833-840, 1992b.

PENNINGTON, J.E.; REYNOLDS, H.; WOOD, R.; ROBINSON, R.J.; LEVINE, A. Use of *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in patients with acute leukemia and cystic fibrosis. **American Journal of Medicine**, v.58, p.629-636, 1999.

PIER, G.B. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: A major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. **International Journal of Medical Microbiology**, v.297, n.7-8, p.641-660, 2007.

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

PIER, G.B.; SIDBERRY, H.F. E SADOFF, J.C. High-Molecular-Weight Polisaccharide Antigen from *Pseudomonas aeruginosa* Immunotype 2. **Infection and Immunity**, v.34, n2, p.461-468, 1981.

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

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, v. 27, n. 39, p. 493-497, 1938.

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

STANISLAVSKY, E.S. E LAM, J.S. *Pseudomonas aeruginosa* antigens as potential vaccines. **FEMS Microbiology Reviews**, v.21, p. 243-277, 1997.



TODER, D.S. *Pseudomonas aeruginosa*: um patógeno ubíquo. In: SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I. *et al.* **Microbiologia**, Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 177-181, 2002.

YOUNG, L.S.; MEYER, R.D.; ARMSTRONG, D. *Pseudomonas aeruginosa* vaccine in cancer patients. **Annals of Internal Medicine**, v.79, p.518-527, 1973.

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

WIN, Jr. W. *et al.* **Koneman's Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology**. 6nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 316-326.

WHO – World Health Organization. General Immunology. In: **The Immunological Basis for Immunization series**, Global Program for Vaccines and Immunization – expanded programme on immunization (EPI), WHO – Geneva, 1993. Disponível em: <<http://www.who.ch/programmes/gpv>> Acesso em 05 nov. 2005.

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

## ANEXOS

**ANEXO 1:** Autorização do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA - UFPR) para utilização de camundongos nos experimento.



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



**CERTIFICADO N.º 252**

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

**APROVADO.**

**PROCESSO:** 23075.030887/2007-77


RO 07/2007- 28/08/2007

**TÍTULO:** Desenvolvimento e estudo *in vivo* de uma vacina conjugada experimental contra *Pseudomonas aeruginosa*

**AUTORES:** Lucy Ono, Rosângela Rodrigues dos Santos, Luiz Felipe Caron, Silvio Marques Zanata, Maria Rita Sierakowski, Carla Elizabeth de Oliveira Ferreira

**DEPARTAMENTO:** Patologia Básica

Curitiba, 30 de agosto de 2007.

  
Prof.ª Ana Maria Caliman Filadelfi  
Coordenadora do CEEA

**ANEXO 2:** Valores de dosagens de açúcar e de proteína totais na análise do conjugado LPS-BSA gelpermeado em coluna de Sepharose CL-4B, utilizando NaCl 0,85% como eluente.

Volume (mL)	Açúcar Total (µg/mL)	Proteína Total (µg/mL)
0	0	0
2	6,470588	23,63636
4	0,235294	23,33333
6	0,235294	17,27273
8	2,823529	10
10	2	12,42424
12	5,529412	16,36364
<b>14</b>	<b>18,94118</b>	<b>27,87879</b>
<b>16</b>	<b>52,23529</b>	<b>50,60606</b>
<b>18</b>	<b>79,64706</b>	<b>75,15152</b>
<b>20</b>	<b>91,29412</b>	<b>78,48485</b>
<b>22</b>	<b>75,64706</b>	<b>64,84848</b>
<b>24</b>	<b>47,52941</b>	<b>46,9697</b>
<b>26</b>	<b>26,35294</b>	<b>34,54545</b>
<b>28</b>	<b>16,94118</b>	<b>22,42424</b>
<b>30</b>	<b>16,23529</b>	<b>18,18182</b>
32	23,41176	22,72727
34	35,41176	38,18182
36	18,35294	46,66667
38	15,88235	42,42424
40	6,117647	36,9697
42	2,352941	27,27273
44	0	17,27273
46	0	12,42424
48	0	15,15152
50	0	0

NOTA: Em vermelho - pico da gel permeação caracterizando o imunoc conjugado.