UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Dissertação

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IgY CONTRA rLipL32 de *Leptospira interrogans*

Juliana Alcoforado Diniz

Pelotas, 2012

JULIANA ALCOFORADO DINIZ

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE IgY CONTRA rLipL32 de *Leptospira interrogans*

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

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

D585p Diniz, Juliana Alcoforado
Produção e caracterização de IgY contra rLipL32 de *Leptospira interrogans* / Juliana Alcoforado Diniz. – 66f. : il. color. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2012. – Orientador Éverton Fagonde da Silva.

1.Biotecnologia. 2.Imunoglobulina. 3.Anticorpos policlonais. 4.Diagnóstico. 5.Imunoterapia. 6. *Leptospira interrogans*. I.Silva, Éverton Fagonde da. II.Título.

CDD:614.56

Banca examinadora:

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Profa. Dra. Cláudia Pinho Hartleben

Dra. Flávia Aleixo Vasconcellos

A Deus

Aos meus pais Gilberto e Eliane
À minha irmã Tassiana

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar um curso de pós-graduação de qualidade, com laboratórios bem equipados e um corpo docente especializado.

A Deus, pelo dom da vida, força na caminhada, amparo nos momentos de dificuldade e presença constante em minha vida.

Aos meus pais, Gilberto e Eliane, que foram sempre o meu exemplo me ensinando desde matemática até os princípios que levo para minha vida pessoal e profissional. Além de serem meu porto seguro e principais incentivadores em todas as etapas acadêmicas da minha vida. E a minha irmã, Tassiana, que desde pequena é minha companheira, confidente e apoiadora.

Ao meu orientador, prof. Éverton Silva, que desde a minha graduação tem sido mais do que um mestre, um verdadeiro pai. Dedicando seu tempo e conhecimento para me orientar, sendo sempre compreensivo e apoiador. À Flávia, pela amizade desde o início e todo o apoio e atenção durante o mestrado.

Ao prof. Odir Dellagostin, pelos ensinamentos, oportunidade de trabalhar no seu laboratório, bem como pela ajuda e atenção dedicados a mim, principalmente no processo de seleção para o doutorado no exterior.

A todos os meus amigos e colegas do laboratório de Vacinologia pelo agradável convívio diário. Aos meus “irmãos” Amilton, André, Michel e Samuel. E as amigas, Ivânia, Karina, Thais, Carol, Fernanda e Mariana. À minha estagiária, Andréia, pela ajuda e companhia, principalmente, nos domingos no campus.

A todos os amigos do Centro de Biotecnologia, principalmente os do Laboratório 6, como a Neida e a Simone que foram sempre minhas amigas e companheiras durante a graduação e mesmo com a distância, durante o mestrado.

Aos funcionários do Biotério Central pela dedicação, disponibilidade e cuidados com os animais de experimentação; bem como, os funcionários do aviário do CAVG, principalmente ao prof. Marcus Anciuti.

A todos os meus amigos que tornaram meus dias mais felizes E ao meu namorado, Felipe, por ser um companheiro perfeito e meu melhor amigo, que me compreende e apoia em tudo, além de já saber mais de leptospirose do que eu.

A todos vocês, minha eterna gratidão!

RESUMO

DINIZ, Juliana Alcoforado. **Produção e caracterização de IgY contra rLipL32 de *Leptospira interrogans*.** 2012. 66f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A leptospirose é uma zoonose causada por bactérias do gênero *Leptospira*. Nos últimos anos, esforços para a identificação de componentes imunogênicos nas leptospiras resultaram na caracterização de várias lipoproteínas de membrana externa que são expressas durante a infecção. Anteriormente, nosso grupo havia produzido IgY contra *Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130 inteira, a qual foi usada em diferentes formatos de ELISA de captura. No presente estudo, objetivamos produzir e caracterizar anticorpos IgY contra a proteína LipL32 na forma recombinante (rLipL32), a lipoproteína mais abundante no proteoma das leptospiras patogênicas, com intuito de utilizá-los posteriormente, no diagnóstico e na imunoprofilaxia da leptospirose. Para isso, duas galinhas com 22 semanas de idade foram imunizadas no dia 0 com rLipL32 e adjuvante oleoso, através da via intramuscular. Três outras imunizações foram realizadas nos dias 14, 28 e 42 e os ovos coletados diariamente a partir do dia 45. Os anticorpos foram obitidos através do processamento das gemas, purificados com polietilenoglicol e monitorados por SDS-PAGE. A especificidade dos anticorpos foi avaliada através de ELISA indireto e *Western blot* (WB), ambos utilizando rLipL32 e Fiocruz L1-130 inteira. Após a padronização do primeiro lote de IgY, os anticorpos foram conjugados com peroxidase e fluoresceína (FITC), e avaliados em um ensaio de imunização passiva em hamsters, com desafio homólogo e heterólogo. O SDS-PAGE confirmou o sucesso de purificação, e um lote de IgY com a concentração de 13µg.µL^{-1} foi estocado a -20ºC até o uso. A IgY pura e conjugada com peroxidase reagiram com as proteínas recombinante e nativa no ELISA e no WB. Nesse estudo, produzimos e caracterizamos com sucesso IgY contra rLipL32. Embora esses anticorpos não tenham sido testados com amostras clínicas de humanos e animais, eles possuem potencial para compor ensaios que visem a detecção do antígeno no diagnóstico da leptospirose.

Palavras chaves: Imunoglobulina. Anticorpos policlonais. Diagnóstico. Imunoterapia.

ABSTRACT

DINIZ, Juliana Alcoforado. **Produção e caracterização de IgY contra rLipL32 de *Leptospira interrogans*.** 2012. 66f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Leptospirosis is a zoonosis caused by bacteria of the *Leptospira* genus. In recent years, efforts to identify immunogenic components of leptospires have resulted in the characterization of several outer membrane lipoproteins that are expressed during infection. Previously, our group had produced polyclonal IgY antibodies against whole-cell leptospires strain Fiocruz L1-130, which were used in different forms of capture ELISAs. In this study we produced and characterized IgY antibodies against LipL32 in recombinant form (rLipL32), the most abundant lipoprotein in the proteome of pathogenic leptospires, in order to use they in diagnostic assays and prophylaxis of leptospirosis. For this, two 22-week-old hens were immunized on day 0 with rLipL32 and oil adjuvant by intramuscular route. Three booster immunizations on days 14, 28 and 42 were held, and the eggs were collected daily from day 45. The yolks were processed and the antibodies purified with polyethylene glycol, and monitored by SDS-PAGE. Specificity of purified antibodies was assessed through indirect ELISA and Western blot (WB) using both rLipL32 and whole-cell Fiocruz L1-130. After standardization of the first batch of IgY, antibodies were conjugated with horseradish peroxidase and fluorescein (FITC). In addition, we conducted a passive immunoprotection assay in hamster model, using homologous and heterologous challenge. SDS-PAGE confirmed the successful purification of IgY and a batch with a concentration of 13µg.µL^{-1} was stored at -20ºC until use. Both IgY and IgY conjugated with horseradish peroxidase recognized the recombinant and native protein in ELISA and WB. In this study we produced and characterized successfully IgY against rLipL32. Although these antibodies have not been tested with clinical samples from humans or animals, they have antigen detecting potential for use in the diagnosis of leptospirosis.

Keywords: Immunoglobulin. Polyclonal antibodies. Diagnosis. Immunotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da membrana de *Leptospira*.....	25
Figura 2	Modelo de transferência de IgY do sangue para a gema (*Yolk*) durante a formação do ovo.....	28
Figura 3	Figura representativa da Imunoglobulina Y de aves e da Imunoglobulina G de mamíferos, demonstrando a região de dobradiça mais flexível de IgG se comparado com a IgY	29
Figura 4	Diagrama esquemático de extração de IgY usando precipitação com PEG, como proposto por POLSON (1980).....	38
Figura 5	Eletroforese em gel de acrilamida 12%, com as proteínas recombinantes rLigBNI e rLipL32	43
Figura 6	Reação da proteína recombinante com a IgY produzida, em *Western blot*	44
Figura 7	Especificidade da rLipL32 com o MAb 1D9 através da técnica de Dot blot	44
Figura 8	Em *Western blot* a reação do soro das galinhas com a proteína recombinante e dois diferentes extratos da *L. interrogans*	45
Figura 9	SDS-PAGE com a IgY purificada em condições redutoras	45
Figura 10	Reação por ELISA indireto com os dois lotes de IgY produzidos com a proteína recombinante (vermelho) e a nativa (azul)	46
Figura 11	Detecção de LipL32 em cepas patogênicas pelo anticorpo IgY anti-LipL32	47
Figura 12	Reação da IgY conjugada com peroxidase, frente a proteína recombinante e diferentes cepas de *Leptospira*	49
Figura 13	ELISA com a reação da IgY conjugada com peroxidase, frente a diferentes cepas de *Leptospira* (diluições 10^5 e 10^3)	50
Figura 14	Imunofluorescência direta com a IgY anti-rLipL32 conjugada a FITC	51

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Comparação entre IgY e IgG	31
Tabela 2	Delineamento experimental para a imunização passiva em hamsters	39
Tabela 3	Delineamento experimental para o segundo experimento de imunização	40
Tabela 4	Óbitos das fêmeas no experimento 1.....	47
Tabela 5	Óbitos de fêmeas e machos no experimento 2	48

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EMJH	Ellinghausen–McCullough modificado por Johnson–Harris
FITC	Isotiocinato de fluoresceína
g	Força g
h	Hora
IFD	Imunofluorecência direta
IgY	Imunoglobulina Y
IP	Intraperitonial
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
Kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LipL32	Lipoproteína de *Leptospira* de 32 kDa
LigA e B	*Leptospiral immunoglobulin-like* A e B
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MAb	Anticorpo monoclonal
MAT	Teste de soroaglutinação microscopic
MEC	Membrana celular externa
min	Minuto
mL	Mililitro

ON	*Overnight* (16h)
PBS	Tampão fosfato salino
PEG	Polietilenoglicol
pH	Potencial de Hidrogênio
PVDF	*Polyvinylidene fluoride*
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Sódio Dodecil Sulfato – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
WB	*Western blotting*
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
µm	Micrometro
ºC	Grau(s) Célcius

SUMÁRIO

1 **Introdução** 14

2 **Objetivos** 17
2.1 Objetivo geral 17
2.2 Objetivo específico 17

3 **Revisão de literatura** 18
3.1 Leptospirose 18
3.1.1 Resposta imune 20
3.1.2 Diagnóstico 20
3.2 *Leptospira* 22
3.2.1 Classificação 23
3.2.2 Proteínas de membrana externa 24
3.3 LipL32 26
3.4 Imunoglobulina Y 27
3.4.1 Estrutura da IgY 28
3.4.2 Vantagens no uso de IgY 30
3.4.3 Aplicações das IgY 32

4 **Material e Métodos** 34
4.1 Cepas, condições de cultivo e extração de DNA 34
4.2 Obtenção das proteínas recombinantes 34
4.3 Caracterização da proteína recombinante 34
4.4 Obtenção de anticorpos policlonais de galinha (IgY) 35
4.5 Purificação das IgY 36
4.6 Quantificação e Especificidade das IgY 37
4.7 Ensaio de imunização passiva dos hamsters 38
4.8 Conjugação com peroxidase 40
4.9 Conjugação com fluoresceína 41
4.10 Imunofluorescência direta 41
4.11 Aspectos éticos 42

5 **Resultados** 43
5.1 Produção e caracterização das proteínas recombinantes 43

5.2 Imunogenicidade do soro das galinhas 44
5.3 Purificação e caracterização das IgYs 45
5.4 Imunização passiva dos hamsters 47
5.5 Conjugação com peroxidase 48
5.6 Conjugação com FITC 50

6 **Discussão** 52

7 **Conclusões** 56

8 **Referências** 57

9 **Anexos** 66

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose direta com ampla distribuição no mundo. Nos últimos anos, ela tem sido considerada como um importante problema de saúde pública mundial, devido ao aumento na sua morbidade e mortalidade (HARTSKEERL et al., 2011). Esta doença infecciosa é causada por espécies patogênicas de bactérias do gênero *Leptospira*. Dentro das diferentes espécies foram descritos mais de 260 sorovares, distribuídos em 29 sorogrupos (CERQUEIRA et al., 2009).

O diagnóstico da leptospirose é dificultado pelo fato de que as manifestações clínicas da enfermidade são similares aos encontrados em outras doenças infecciosas. Além disso, a inexistência de um teste laboratorial com sensibilidade e especificidade confiáveis, impede o emprego de um tratamento rápido, principalmente para os grupos de risco (McBRIDE et al., 2005). O teste de soroaglutinação microscópica (MAT) é o método de referência para o diagnóstico sorológico da leptospirose, sendo amplamente utilizado. Esse teste apresenta sérias limitações, pois requer o uso de um amplo painel de antígenos vivos, amostras de soro pareadas, não possui boa sensibilidade na fase inicial da doença e a interpretação dos resultados é subjetiva (LEVETT, 2001).

Na última década, diferentes testes para a substituição do MAT foram propostos e alguns ensaios imunoquímicos, baseados no uso de antígenos totais de leptospiras, foram desenvolvidos. Porém, sua avaliação com amostras clínicas mostrou uma grande variação na sensibilidade (39 a 72%) na fase aguda da doença (FLANNERY et al., 2001; SEHGAL et al., 2003b; SMITS et al., 1999). Assim, a falta de um teste laboratorial adequado continua sendo uma barreira importante para o diagnóstico precoce e para o monitoramento epidemiológico da doença.

Nos últimos anos, esforços para a identificação de componentes imunogênicos nas leptospiras, com potencial para o desenvolvimento de vacinas e testes diagnósticos resultaram na caracterização de várias lipoproteínas que são expressas na membrana externa durante a infecção, sendo a LipL32 a mais abundante no seu proteoma (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004; HAAKE, 2000). Além disso, algumas adesinas têm despertado esse mesmo interesse para utilização em vacinas e em testes de diagnóstico. As proteínas LigANI e LigBNI, por exemplo, que possuem domínios semelhantes às imunoglobulinas (MATSUNAGA et al., 2003), têm a função de adesão aos componentes da matriz extracelular e ao fibrinogênio (CHOY et al., 2007), o que sugere o seu envolvimento nos estágios iniciais de colonização e disseminação da bactéria no momento da infecção.

Nosso grupo de pesquisas em colaboração com centros de pesquisas como a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) em Salvador e no Rio de Janeiro, utilizando informações disponíveis sobre o genoma da cepa Fiocruz L1-130, produziu e testou anticorpos monoclonais (MAbs) contra rLipL32 (COUTINHO et al., 2007; FERNANDES et al., 2007), desenvolveu vacinas com rLipL32 que estimularam uma significativa resposta humoral em camundongos (SEIXAS et al., 2007) e vacinas para hamsters, onde a proteína rLigANI conferiu proteção que variou de 67 a 100% (SILVA et al., 2007).

Resultados promissores foram obtidos através da imunização passiva com anticorpos IgY de galinha, nos últimos anos. Estratégias utilizadas para o controle experimental da cárie dentária (SMITH; KING; GODISKA, 2001), Estafilococose (LECLAIRE; HUNT; BAVARI, 2002) e Coccidiose (LEE et al., 2009) por exemplo, demonstraram que a utilização de anticorpos policlonais IgY de galinha podem apresentar uma série de vantagens quando comparados com a IgG de mamíferos. Além disso, anticorpos IgY são encontrados em grande quantidade na gema do ovo e o processo de obtenção é rápido e diário, não interferindo no bem-estar do animal, eliminando a necessidade de realizar a eutanásia destes, como em outros processos para a obtenção de anticorpos (DIAS DA; TAMBOURGI, 2010).

Recentemente, Vasconcellos et al (2010) produziram anticorpos policlonais (IgY) contra *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, a maior causadora da 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.

Utilizando uma estratégia semelhante a que foi descrita por Vasconcellos et al (2010), propomos neste estudo a produção de anticorpos policlonais IgY contra a proteína rLipL32, um importante fator de virulência das leptospiras. Após a produção e a caracterização dos anticorpos, esses foram conjugados com peroxidase e com o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína e testados em ensaios para verificar a imunoproteção passiva em hamsters, visando avaliar o seu potencial de uso tanto para o diagnóstico laboratorial e como na imunização contra a leptospirose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Produzir e caracterizar anticorpos IgY contra rLipL32, um fator de virulência de *Leptospira interrogans,* para servir de insumo no desenvolvimento de testes de diagnóstico e imunoprofilaxia contra a leptospirose.

2.2 Objetivos específicos

- Obter a proteína de membrana externa LipL32 na forma recombinante, a partir da cepa Fiocruz L1-130;
- Comprovar a antigenicidade da proteína recombinante produzida através de *Western blot* e *Dot blot,* utilizando anticorpos monoclonais;
- Obter anticorpos IgY contra a proteína de membrana externa rLipL32;
- Comprovar a especificidade das IgY produzidas, através de ELISA e *Western blot,* com as proteínas recombinante e nativa;
- Realizar o processo de conjugação das IgY anti-rLipL32 com peroxidase e fluoresceína;
- Avaliar o processo de conjugação com peroxidase através de ELISA direto e *Western blot* com as proteínas recombinante e nativa;
- Avaliar o processo de conjugação com fluoresceína através de imunofluorescência direta;
- Testar a eficiência dos anticorpos IgY produzidos, em ensaios de imunização passiva através de teste de desafio com cepa homóloga e heteróloga em hamsters.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leptospirose

A leptospirose é uma doença negligenciada e emergente, a qual é um importante problema de saúde pública em regiões tropicais e subtropicais no mundo (VIJAYACHAR et al., 2008). A leptospirose é a zoonose mais difundida em todo o mundo (BHARTI et al., 2003), causando mais de 500.000 casos por ano, com uma taxa de mortalidade superior a 10%. Porém, essa estimativa é considerada subestimada, devido principalmente à falta de programas de vigilância coordenada e erros de diagnóstico (McBRIDE et al., 2005).

Os mamíferos, incluindo aquáticos e marsupiais, tem se mostrado hospedeiros de leptospiras patogênicas, os quais podem albergar as espiroquetas nos túbulos renais e eliminá-las para o ambiente através na urina. Essa urina pode assim, contaminar o solo ou a água, e a partir do contato direto ou indireto, penetrar na pele e mucosas de humanos e animais suscetíveis, e assim, causar a enfermidade. No meio urbano, o rato é a fonte de infecção mais comum para humanos e animais (FAINE et al., 1999). Os humanos, apesar de serem acometidos pela doença, são hospedeiros acidentais e não são considerados carreadores crônicos dessas bactérias (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

O inicio da doença em humanos é variável e as manifestações clínicas da doença são benignas e autolimitadas (LEVETT, 2001), não permitindo uma distinção entre a leptospirose e inúmeras outras síndromes febris e mialgias semelhantes. A doença, na maioria dos casos, se inicia abruptamente com febre, mal-estar e cefaleia. Os sintomas vão desde um estado febril moderado, com vômitos, dores de cabeça, musculares e abdominais, evoluindo em 5 a 15% dos casos para quadros clínicos severos como a doença de Weil, caracterizada por falhas renais e do fígado,

ou leptospirose pulmonar, que acarreta hemorragia pulmonar com uma taxa de mortalidade variável de 5 a 40%. A forma anictérica ocorre em 60% a 70% dos casos (FAINE et al., 1999; BHARTI et al., 2003).

Na pecuária, a ocorrência da leptospirose acarreta principalmente prejuízos econômicos. A doença pode se manifestar tanto na forma esporádica quanto na endêmica. Os mamíferos domésticos de produção, trabalho e companhia são suscetíveis e acometidos por leptospiras tanto nas áreas urbanas como rurais (ANDRE-FONTAINE, 2006; VASCONCELLOS; RIBEIRO, 1997). Nas espécies de interesse zootécnico (ovinos, bovinos, caprinos, equinos e suínos) a leptospirose está relacionada a distúrbios reprodutivos causando abortamentos, natimortalidade, esterilidade e queda de fertilidade. Além disso, pode ocasionar queda no ganho de peso e na produção de leite (FAINE et al., 1999).

Em países desenvolvidos, as atividades recreativas, tais como natação em lagos e rios, canoagem, ciclismo de pista, caça, e cada vez mais, viagens de aventura e competições de esportes náuticos, também estão associadas à transmissão da leptospirose (HAAKE; MATSUNAGA, 2002). Além disso, a enfermidade também acomete as pessoas que durante as atividades diárias mantêm contato com cães ou outros animais domésticos em áreas com a presença de roedores. Já em países em desenvolvimento, essa doença apresenta caráter endêmico, no qual muitos casos ocorrem em associação com condições de vida em favelas urbanas, as quais possuem precárias condições de saneamento básico e favorecem a transmissão da bactéria através da urina dos roedores que residem nos espaços peridomiciliares, principalmente em períodos de enchentes (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; REIS et al., 2008).

A incidência da infecção é maior em países com temperatura elevada do que em regiões temperadas, isso se deve tanto ao longo período de sobrevivência da bactéria em ambientes quentes e úmidos, quanto a maior oportunidade para a exposição humana e animal. Em regiões temperadas, a incidência de leptospirose é sazonal com picos no verão e no outono onde a temperatura é um fator limitante para a sobrevivência da bactéria; e já nas regiões quentes, ocorre durante as estações chuvosas, pois a rápida dissecação impediria a sobrevivência do micro-organismo no ambiente (LEVETT, 2001).

3.1.1 Resposta Imune

A imunidade em leptospirose é predominantemente mediada por resposta humoral nos humanos e na maioria das espécies animais. Evidências para isso são provenientes de vários achados mostrando que a imunidade pode ser transferida passivamente do soro de humanos e animais convalescentes, através de antissoros produzidos experimentalmente ou por anticorpos monoclonais contra fatores de virulência (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). Além disso, os anticorpos IgM e IgG são detectados em soros de pacientes que se recuperaram de leptospirose aguda, por longos períodos após a primeira infecção (CUMBERLAND et al., 2001).

Os anticorpos para imunização passiva são principalmente os produzidos contra o lipopolissacarídeo (LPS) de *Leptospira*. Anticorpos monoclonais contra o LPS produzidos em camundongos infectados conferiram proteção passiva contra infecção letal em cobaios, hamsters, caninos e primatas não humanos (JOST et al., 1986). A proteção desses MAbs está relacionada com a capacidade de aglutinação e opsonização desses anticorpos, bem como o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para a fagocitose. Além disso, os anticorpos podem auxiliar na lise da bactéria na presença do complemento (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

O LPS é antigênico, tanto na forma nativa na *Leptospira* inteira como na desintegrada, ou ainda, em formas quimicamente purificadas. Dessa forma, a imunização com LPS purificado ou com os seus componentes confere proteção imune (JOST; ADLER; FAINE, 1989; MASUZAWA; SUZUKI; YANAGIHARA, 1996; MIDWINTER; FAINE; ADLER, 1990). Entretanto, a imunidade mediada por anticorpos anti-LPS é limitada a sorovares homólogos, diferentemente das preparações com proteínas de *Leptospira* a qual demonstra proteção em desafio com sorovares homólogos e heterólogos (PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

3.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico precoce da leptospirose é essencial, já que o tratamento com antibióticos resulta em grandes benefícios quando administrados na fase inicial da doença (FAINE et al., 1999). A falta de um teste adequado é a principal barreira para

um correto diagnóstico e vigilância epidemiológica, uma vez que, essa doença pode ser facilmente confundida com outras doenças febris no seu estágio inicial (SEGURA et al., 2005). O diagnóstico laboratorial pode ser feito tanto por detecção do organismo na amostra, como por testes sorológicos para detectar anticorpos contra leptospiras (LEVETT, 2003). Alternativamente, os diferentes métodos utilizados podem ser classificados em bacteriológico, microscópico, sorológico ou molecular (VIJAYACHAR et al, 2008).

O isolamento do microorganismo de amostras clínicas é fundamental para a confirmação do diagnóstico. As leptospiras podem ser isoladas mais eficientemente do sangue durante os primeiros dias da doença, e da urina durante a segunda e terceira semana. Contudo, a cultura pode ser prejudicada pelo crescimento lento da bactéria, pelo longo período de incubação antes do isolado se estabelecer na cultura, além da necessidade de se inibir possíveis contaminações (LEVETT et al., 2001). Além disso, é necessário um período de incubação de no mínimo 10 semanas, com visualização semanal por microscopia até que a cultura possa ser descartada como negativa (LEVETT, 2003). Por essas razões que a cultura não é comumente utilizada em testes de rotina, mas segue importante na análise epidemiológica (McBRIDE et al. 2005).

O teste sorológico padrão recomendado pela Organização Mundial da Saúde é o teste de soroaglutinação microscópica (MAT), devido a sua sensibilidade e especificidade (CUMBERLAND; EVERARD; LEVETT, 1999). O MAT detecta anticorpos aglutinantes no soro de pacientes através da mistura com diluições de leptospiras vivas ou inativadas por formol, e tem a vantagem de ser específico para sorovares, ou pelo menos sorogrupos, porém não consegue discriminar entre anticorpos resultantes de infecção ou vacinação (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010). O ponto de corte para definir uma amostra como positiva depende da epidemiologia do local e da espécie analisada, variando de títulos de 1:100 até 1:800 (WHO, 2003).

Uma importante desvantagem do MAT é a necessidade do laboratório manter um grande painel de cepas patogênicas vivas, além de ser uma técnica demorada, laboriosa e necessitar de profissionais especializados (WHO, 2003). Além disso, foi reportado que o MAT tem uma sensibilidade de 41% na primeira semana da doença,

sobe para 82% durante a segunda semana e chega a 96% na quarta semana. Sendo assim, esse teste necessita de análise com soros pareada e de confirmação por outros métodos (SEHGAL et al., 1999).

Um substituto para demonstração direta de leptospiras nas amostras em humanos tem sido baseado na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Existem vários protocolos de PCR para a detecção de DNA leptospiral em material clínico, a maioria deles reportou uma sensibilidade promissora, os quais passaram a ser testados para diagnóstico (BROWN et al., 1995). Além disso, tem sido utilizadas técnicas de PCR quantitativo em tempo real para detectar a bactéria em amostras clínicas e ambientais, uma vez que essa técnica possui sensibilidade e pode diferenciar entre espécies patogênicas e não patogênicas, podendo auxiliar no diagnóstico precoce (TRUCCOLO et al., 2001).

A falta de ambientes especializados em laboratórios ou hospitais para se desenvolver técnicas de isolamento, MAT ou PCR, demonstrou a necessidade de se adotar testes simples e rápidos para o diagnóstico precoce, tais como: ELISA, Dipstick, Lateral flow, Hemaglutinação indireta, aglutinação em latex, testes de aglutinação com micro cápsula, entre outros (SEHGAL et al., 2003). O teste imunoenzimático (ELISA) tem sido realizado utilizando uma ampla variedade de preparações do antígeno, como por exemplo, as lipoproteínas recombinantes LipL32, LigA e OmpL1 e por isso não tem a necessidade de manter cepas vivas no laboratório. Contudo, algumas vezes a sensibilidade e especificidade não combinam com obtidas no MAT, e por isso não é recomendado realizar o diagnóstico baseado apenas em ELISA (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

3.2 *Leptospira*

As bactérias patogênicas do gênero *Leptospira* são o agente etiológico da leptospirose. Essas espiroquetas pertencem à família Leptospiraceae, ordem Spiroquetales e apresentam as suas extremidades em formato de gancho, o que as distinguem das demais (FAINE et al., 1999). As leptospiras são finas, helicoidais e altamente móveis, com normalmente 0,1µm de diâmetro por 6-20µm de comprimento. A motilidade dessas bactérias está relacionada com dois flagelos

periplasmáticos com inserções polares, os quais apresentam as proteínas FlaA e FlaB, responsáveis pela sua constituição (PICARDEAU; BRENOT; SAINT, I, 2001).

As leptospiras apresentam uma constituição de dupla membrana, dividindo características tanto com bactérias gram-negativas, como gram-positivas (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). A membrana citoplasmática está associada com uma parede de peptideoglicano, a qual está sobreposta por uma membrana externa. Os principais componentes dessa membrana são: fosfolipídios, proteínas de membrana externa e o LPS, o qual é relativamente não tóxico para células e animais se comparado com o LPS de outras bactérias gram-negativas (HAAKE, 2000).

Essas bactérias são organismos aeróbicos obrigatórios e têm um crescimento relativamente lento tanto em meio de cultura líquido como sólido. A temperatura ótima de crescimento ocorre entre 28 e 30°C em meios suplementados com ácidos graxos de cadeia longa, vitaminas B1 e B12 e sais de amônio (FAINE et al., 1999). Para o cultivo *in vitro* o meio mais utilizado é o Ellinghausen–McCullough/Johnson–Harris (EMJH) o qual contem ácido oléico, albumina de soro bovino e polisorbato. O crescimento de contaminantes no meio pode ser inibido por autoclavagem da água e da base para preparação do meio, bem como pela utilização de 5-fluoracil e de antibióticos, tais como: gentamicina, rifampicina e ácido nalidíxico (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

Algumas espécies patogênicas, como *L. interrogans*, podem sobreviver em ambientes com baixa quantidade de nutrientes, solo e água, por longos períodos, sendo a concentração de sal, pH e viscosidade os fatores críticos para que isso ocorra (TRUEBA et al., 2004). Contudo, a *L. borgpetersenii* não sobrevive por muito tempo no ambiente, além de perder genes necessários para a sua virulência (BULACH et al., 2006). Estudos também relatam que as leptospiras são capazes de se agregar para formar biofilme, o que seria um mecanismo empregado por essas bactérias para sobreviver em nichos ambientais (RISTOW et al., 2008).

3.2.1 Classificação

Atualmente, a classificação genética indica que existem 20 espécies descritas: as patogênicas *L. alexanderi, L. alstonii, L. borgpetersenii, L. inadai, L. interrogans, L. fainei, L. kirschneri, L. licerasie, L. weilli, L. noguchi, L. santarosai, L. wolffii, L. broomii,* e as saprófitas *L. kmetyi, L. wolbachii, L. meyeri, L. biflexa, L. vanthielii, L. terpstrae* e *L. yanagawae*,

identificadas através de analises da hibridização do DNA (CERQUEIRA; PICARDEAU, 2009).

Outro sistema de classificação conhecido é o sorológico. Esse sistema classifica as leptospiras em sorogrupos e sorovares baseando-se na variação dos componentes do LPS na parede celular. Nesse modelo, as cepas estão classificadas dentro de sorogrupos que contem sorovares antigenicamente relacionados, existem mais de 60 sorovares saprófitas e 260 patogênicos (LEVETT, 2001). Este sistema de classificação é de grande valor epidemiológico, coexistindo com a classificação genotípica. Os sorovares tendem a infectar hospedeiros específicos, como o sorovar Canicola os caninos, sorovar Pomona os suínos, sorovar Copenhageni os roedores e o sorovar Hardjo os ruminantes. Este fato pode facilitar a identificação de potenciais fontes de infecção em investigações de surtos (BHARTI et al., 2003).

3.2.2 Proteínas de membrana externa

Com o recente desenvolvimento de ferramentas moleculares para a manipulação genética das leptospiras, vários candidatos a fatores de virulência têm sido identificados. Destes, incluem o LPS, as hemolisinas, as proteínas de membrana externa e outras proteínas de superfície, bem como moléculas de adesão. Essa adesão das leptospiras nos componentes dos tecidos do hospedeiro é o primeiro e necessário passo para o estabelecimento da infecção e patogênese da doença (EVANGELISTA; COBURN, 2010).

Algumas proteínas testadas experimentalmente, tem se mostrado presentes na superfície das leptospiras. Neste contexto, já foram identificadas, aproximadamente, 12 proteínas de membrana externa, entre elas a OmpL1, LipL32, LigA, LigB, LenA e Loa22 (Fig.1). Contudo, o conhecimento acerca dessas proteínas ainda é limitado e requer o desenvolvimento de novas ferramentas para determinar a exata localização dessas proteínas (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

O primeiro fator de virulência geneticamente descrito foi a lipoproteína de membrana externa, Loa22. Essa apresenta um motivo semelhante a OmpA e é expressa durante a infecção aguda (RISTOW et al., 2007). Loa22 é também altamente conservada entre as espécies patogênicas, reafirmando o seu papel na virulência. Contudo ainda não se sabe a sua função, além dessa apresentar um homólogo em *L. biflexa* (PICARDEAU et al., 2008).

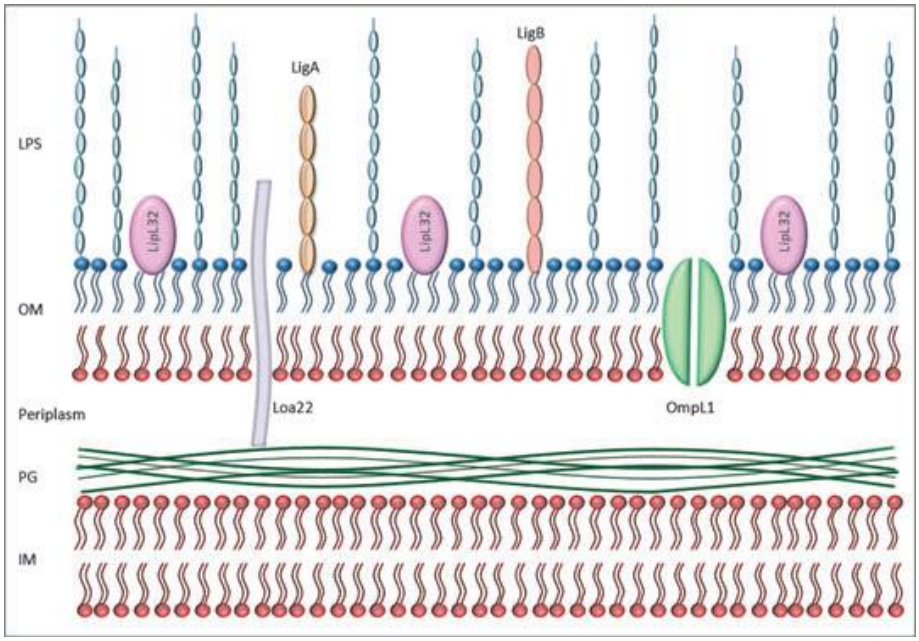


Figura 1 - Representação esquemática da membrana de *Leptospira*. A membrana interna associada com a parede de peptideoglicano, a qual é recoberta por uma membrana externa. Proteínas expostas na superfície (LipL32, LigA, LigB e Loa22), proteínas transmembranas (OmpL1), e lipopolissacarídeo (LPS) são os principais componentes da membrana externa.

Fonte: (FRAGA; BARBOSA; ISAAC, 2011).

Algumas proteínas de *L. interrogans* tem demonstrado a capacidade de se ligarem a laminina. Uma dessas proteínas já bem caracterizada é a Lsa24/LfhH ou LenA, essa proteína se liga ao Fator H do complemento, fibrinogênio e fibronectina (BARBOSA et al., 2006; STEVENSON et al., 2007). Existem ainda outras proteínas presentes na família Len (LenB, C, D, E, F), porém o papel dessas proteínas na patogênese segue indeterminada (ADLER; DE LA PENA MOCTEZUMA, 2010).

A lipoproteína de 32kDa (LipL32) é altamente conservada em espécies patogênicas e está ausente nas não patogênicas, sendo expressa durante a infecção em humanos (HAAKE et al., 2000). Essa proteína, porém, não está envolvida na fase de leptospirose aguda em hamsters e nem na colonização dos rins dos ratos (MURRAY et al., 2009). Além disso, um mutante para o gene *lipl32* não alterou a morfologia, crescimento e nem capacidade de adesão da bactéria (MURRAY et al., 2009).

Outra classe de proteínas de membrana externa que estão presentes apenas nas espécies patogênicas, são as proteínas LigA, LigB e LigC, as quais pertencem a superfamília de proteínas do tipo imunoglobulinas bacterianas (MATSUNAGA et al., 2003). Essas proteínas de alto peso molecular estão pelo menos parcialmente aderidas à membrana e são capazes de se ligar a componentes da matriz extrecelular, tais como: elastina, tropoelastina, colágenos I e IV, lamininas e especialmente fibronectina (LIN et al., 2009).

As leptospiras tem uma diminuição na expressão das Ligs quando são cultivadas durante várias passagens *in vitro* em laboratório (MATSUNAGA et al., 2007), porém a sua expressão é aumentada sob condições de osmolaridade fisiológica (CHOY et al., 2007). Além disso, elas são reconhecidas por soros de pacientes com leptospirose (CRODA et al., 2007). Entretanto, uma mutação em LigB de *L. interrogans* não afetou a habilidade da bactéria em causar leptospirose aguda em hamsters ou colonização persistente em ratos (CRODA et al., 2008). A presença de outras supostas adesinas com funções potencialmente redundantes em *Leptospira* pode ser a explicação para os fenótipos conferidos pelos mutantes em LipL32 e LigB (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

3.3 LipL32

A lipoproteína LipL32 é a principal proteína de membrana externa da *Leptospira*. Expressa em altos níveis durante o cultivo e infecções naturais, a LipL32 é o antígeno presente na superfície da membrana externa, mais abundante no perfil proteico dessa bactéria (HAAKE et al., 2000); além de ser altamente imunogênico com mais de 95% dos pacientes com leptospirose produzindo anticorpos contra LipL32 (GUERREIRO et al., 2001). Essa proteína é também altamente conservada em espécies patogênicas, não sendo observada nas saprófitas (PICARDEAU et al., 2008).

A lipoproteína de 32kDa está ancorada a membrana externa através da remoção de um peptídeo sinal N-terminal e modificação covalente do resíduo de cisteína amino-terminal (CULLEN et al., 2002). Estudos com *Immunobloting* indicaram que os domínios intermediários e C-terminal da LipL32 são reconhecidos por soro de pacientes. Além disso, uma resposta de IgM foi detectada contra a

porção C-terminal da proteína nas fases aguda e convalescente da doença (HAUK; CARVALHO; HO, 2011).

LipL32 se liga a proteínas da matriz extracelular. Já tendo sido reportado ligações específicas dessa proteína com colágeno I, V e VI, bem como laminina e fibronectina do plasma (HAUK et al., 2012). Contudo, estudos recentes mostraram que mutantes para LipL32 mantinham a capacidade de ligação com a MEC in vitro e a virulência em hamsters, sugerindo uma redundância na capacidade de ligação (MURRAY et al., 2009).

Devido as suas propriedades antigênicas, a LipL32 tem sido considerada um alvo promissor no desenvolvimento de vacinas, sendo o principal antígeno em vários ensaios de proteção. Em alguns, conferiu proteção parcial nos modelos animais (SEIXAS et al., 2007), enquanto em outros não protegeu (LUCAS et al., 2011). Segundo Dellagostin et al. (2011) a eficácia das construções vacinais utilizando LipL32 em Adenovírus, DNA ou BCG foi baixa (38-72%) e vacinas de subunidade não provocaram proteção significativa nos modelos animais.

Por causa da sua capacidade de induzir resposta imune e ser expressa durante a infecção, a LipL32 tem sido também amplamente utilizada em testes de diagnóstico laboratoriais mais específicos (BOONYOD et al., 2005). Antígenos recombinantes, tais como, rLipL32 também têm sido desenvolvidos como reagentes em diagnóstico (FLANNERY et al., 2001). A técnica de ELISA com rLipL32 propôs uma forma rápida de triagem para leptospirose (CHALAYON et al., 2011), demonstrando a capacidade de diferenciar pacientes com leptospirose de outros apresentando sintomas febris (DEY et al., 2008).

3.4 Imunoglobulina Y

A Imunoglobulina Y (IgY) é o principal anticorpo produzido em galinhas (*Gallus domesticus*), sendo funcionalmente equivalente a IgG em mamíferos (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). Esses anticorpos também são predominantes em aves não galiformes, répteis e anfíbios, e na fêmea são transferidos do soro para a gema, conferindo imunidade passiva para os embriões e neonatos (DAVIES et al., 1995). Por outro lado, são encontradas em galinhas as classes IgA e IgM, essas porém

estão presente apenas na clara do ovo, sendo indetectáveis na gema (CARLANDER; KOLLBERG; LARSSON, 2002).

A secreção de IgY nos pintos inicia 6 dias após a eclosão do ovo. O anticorpo é secretado por células B maduras e liberado direto na circulação. Durante a vida produtiva da galinha, a concentração de IgY no soro é mantida devido ao equilibro resultante do contínuo processo de síntese e transferência desse anticorpo (DAVIES et al., 1995). Na fase de formação do ovo, a imunoglobulina é seletivamente transferida para a gema através de um receptor na superfície da membrana da gema específico para a translocação da IgY e as demais classes ficam depositadas na clara do ovo (TESAR; CHEUNG; BJORKMAN, 2008) (Fig.2).

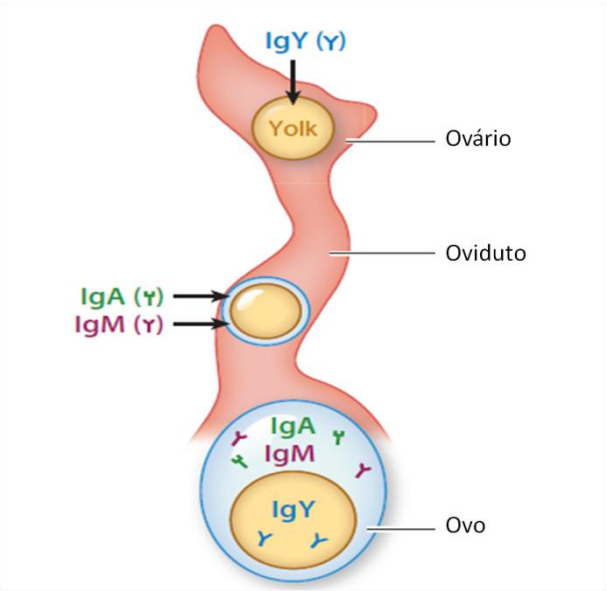


Figura 2 – Modelo de transferência de IgY do sangue para a gema (*Yolk*) durante a formação do ovo. IgA e IgM no oviduto são depositados na clara.

Fonte: Adaptado de KOVACS-NOLAN; MINE, 2012.

3.4.1 Estrutura da IgY

A IgY, apesar de ter funções biológicas semelhante a IgG, apresenta algumas diferenças em imunoreatividade e também em estrutura. A IgY apresenta na sua estrutura duas cadeia pesadas (H) e duas cadeias leves (L), idênticas entre si e ligadas por uma ponte de dissulfeto. A imunoglobulina tem o peso molecular de 180kDa, a cadeia leve apresenta 18kDa e a pesada 65kDa (SUN et al., 2001). A

cadeia L contém uma região variável (VL) e um domínio constante (CL), enquanto a cadeia H tem uma variável (VH) e quatro constantes (CH1, CH2, CH3, e CH4) (Fig.3).

Similar as IgG, as IgY apresentam regiões FAb, as quais contêm sítios de ligação ao antígeno e regiões Fc com domínios responsáveis por ativação do complemento, opsonização e sensibilização de mastócitos para reações anafiláticas (DIAS DA; TAMBOURGI, 2010). A região de dobradiça nas IgYs apresenta uma característica singular, com presença de prolina e glicina próximo a essa região, o que a torna menor e menos flexível (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995).

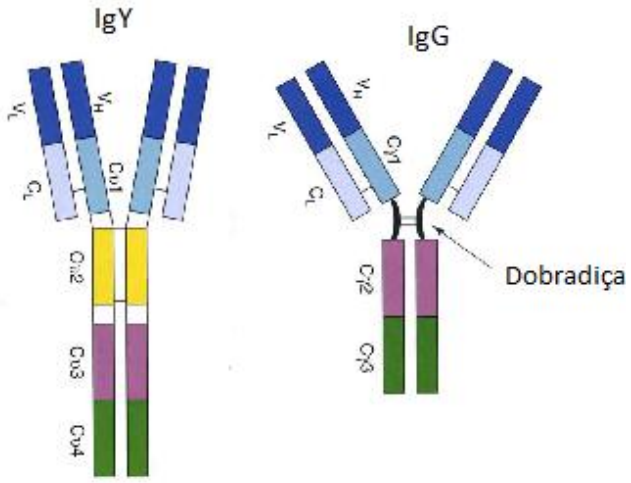


Figura 3 - Figura representativa da Imunoglobulina Y de aves e da Imunoglobulina G de mamíferos, demonstrando a região de dobradiça mais flexível de IgG se comparado com o IgY.

Fonte: Modificado de WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995.

O ponto isoelétrico das IgY varia de 5,7 a 7,6 e estima-se que a IgY seja mais hidrofóbica que a IgG, devido ao ambiente rico em lipídeo presente na gema. Além disso, a estabilidade da imunoglobulina de galinhas em vários processos e condições fisiológicas é uma importante característica para justificar o seu uso em imunoterapia (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

3.4.2 Vantagens no uso de IgY

Existe um grande número de vantagens no uso de galinhas tanto como modelo animal para imunização, como na utilização dos ovos como fonte para o isolamento de anticorpos (ZHANG, 2003), algumas dessas vantagens estão resumidas na Tab.1. Os anticorpos IgY são muito eficientes na neutralização de toxinas provenientes de animais venenosos (DE ALMEIDA et al., 2008), e no bloqueio de alguns fatores de virulência expressos por bactérias (DE ALMEIDA et al., 2003).

A utilização de galinhas também é vantajosa do ponto de vista econômico quando são necessárias grandes quantidades de anticorpos específicos (SCHADE et al., 2005). Uma galinha normalmente coloca 280 ovos por ano e cada ovo contem de 100 a 150mg de IgY, o que resulta em 28 a 42g de IgY por ano para cada galinha. Para se obter o equivalente a essas quantidades em IgG seria necessário uma quantidade muito grande de soro de mamíferos, o que torna essa técnica menos invasiva, uma vez que requer apenas a coleta diária de ovos (SCHADE; HLINAK, 1996).

Uma das principais vantagens no uso de IgY é o aumento na imunogenicidade contra proteínas conservadas em mamíferos devido a distância filogenética entre essas espécies, sendo necessários bem menos antígenos para desencadear uma resposta imune eficiente (GASSMANN et al., 1990). Além disso, as IgYs tendem a reconhecer a mesma proteína em várias espécies de mamíferos, tornando-os mais aplicáveis e reconhecem também diferentes epítopos, resultando em um repertório maior de anticorpos (CARLANDER; STALBERG; LARSSON, 1999). Os anticorpos de galinhas apresentam também uma alta avidez ($10^9 L.mol^{-1}$), enquanto para atingir uma avidez semelhante seriam necessários quatro reforços em cabras (WOOLEY; LANDON, 1995). Essas imunoglobulinas têm também uma alta afinidade e avidez por proteínas de humanos e contra bactérias (ZHANG, 2003).

Tabela 1 - Comparação entre IgY e IgG

Características	IgG	IgY
Animal	Mamíferos	Aves, répteis e anfíbios
Fonte	Plasma sanguíneo	Gema do ovo
Peso molecular (SDS-PAGE)	Inteira: 150kDa Cadeia leve: 22kDa Cadeia Pesada: 50kDa	Inteira: 180kDa Cadeia leve: 21kDa Cadeia Pesada: 70kDa
Diferenças na estrutura básica	Região de dobradiça flexível, porção Fc curta	Região de dobradiça curta e menos flexível, porção Fc comprida
Resposta imune a antígenos de mamíferos	Afetada pela homologia filogenética	Reforçada pela diferença filogenética
Rendimento (por animal/ por mês)	Miligramas, com 1-10% de Ac específicos	Gramas, com 2-10% de Ac específicos
Reação cruzada	Reação com Ig de mamíferos e fatores do complemento	Não tem reação com Ig de mamíferos e nem fatores do complemento
Isolamento	Remover vários componentes do plasma	Remover só resíduos de lipídeos da gema
Purificação por afinidade	Proteína A e G	----------
Estabilidade	Boa, pH 3-10, mais 70°C	Boa, pH 4-9, mais 65°C
Hidrofobicidade	Menos hidrofóbico	Região Fc hidrofóbica
Imunoprecipitação	Boa	Menos eficiente
Produtividade	Quantidade limitada, com rato ou coelho	Alta quantidade e longa duração
Etapas que podem impor sofrimento animal	Inoculação do antígeno, coleta e transfusão de sangue	Inoculação do antígeno
Diagnóstico	Amplamente utilizado	Útil em várias aplicações
Terapéutica	Amplamente utilizado	Alternativa a antibióticos

Fonte: Adaptado de Zhang, 2003

Em comparação com os anticorpos de mamíferos, as imunoglobulinas Y levam vantagem, pois não interage com os receptores Fc de mamíferos, o que poderia mediar respostas inflamatórias indesejáveis (DIAS DA; TAMBOURGI, 2010). Ademais, a resposta imune das aves é persistente, induzindo altos títulos de IgY nas gemas das galinhas imunizadas por longo período (IKEMORI et al., 1993). De igual modo, as IgYs não reagem com IgG ou IgM e nem com componentes do sistema complemento de mamíferos. Dessa forma, não acarreta em reações cruzadas que poderiam resultar em falso-positivo nos imunoensaios e reduz a interferência dos fatores do complemento em alguns testes (CARLANDER et al., 2000).

Apesar das IgY poderem ser isoladas do soro ou plasma, sem dúvida o mais indicado é o isolamento através da purificação da gema dos ovos, do qual pode ser obtido mais de 100mg por ovo (COVA, 2005). Como a gema só apresenta uma classe de imunoglobulina é possível o isolamento a partir de técnicas simples e de baixo custo. A separação do anticorpo de lipídios e outros materiais pode ser realizada através de diferentes formas de precipitação, tais como: polietilenoglicol, dextran, goma xantana, gel filtração entre outros processos nos quais varia a pureza, estabilidade, concentração e atividade do anticorpo (ZHANG, 2003).

Por fim, esses anticorpos das aves têm sido utilizados com sucesso em imunoensaios convencionais, tais como ELISA, WB, Imunoprecipitação, Imunohistoquímica, Imunoquimica e marcação de células e tecidos. (SCHADE; HLINAK, 1996). A qualidade desses ensaios usando IgY são muitos vezes melhores do que os usando IgG. Além disso, tem sido reportada a utilização desses anticorpos em outras aplicações tais como xenotransplante, diagnóstico e imunoterapia (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

3.4.3 Aplicações das IgY

O uso de IgY de galinha como alternativa a IgG de mamíferos, para detectar antígenos, certamente diminuirá os custos de testes clínicos e imunológicos. Além disso, anticorpos de galinhas não ativam o sistema complemento e nem interagem com receptores Fc de mamíferos (DIAS DA; TAMBOURGI, 2010). Dessa forma, além da utilização de IgY para diagnóstico, este também vem sendo usado em imunização passiva (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

Para diminuir o uso de antibióticos na agricultura, tem-se examinado também a utilização de IgY como aditivo alimentar para atingir patógenos específicos e aumentar o crescimento e eficiência alimentar. Como exemplo, pode-se citar em estudos com suínos, bovinos, aves, caninos e peixes (COOK; TROTT, 2010). Igualmente, o IgY tem se mostrado eficiente contra um grande número de doenças e patógenos em humanos, ambos *in vitro* e em estudos com animais de laboratório e no contexto clínico. A imunização passiva também tem sido aplicada na indústria de aquicultura, na qual doenças infecciosas podem resultar em significante perda econômica (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

Outra aplicação tem sido a produção de IgY direto a partir de sequências de DNA, sem a necessidade de expressão de proteínas e nem das etapas de purificação. Dessa forma, esses novos anticorpos podem ser uma ferramenta poderosa na descoberta de novos imunoterápicos (COVA, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas e condições de cultivo

Leptospira interrogans sorovar Copenhageni cepa Fiocruz L1-130 foi crescida em meio EMJH (Difco), enriquecido com 10% de suplemento comercial (Difco) e incubada em estufa bacteriológica a 29ºC. Para as técnicas de WB, ELISA e os testes de imunização passiva, as cepas *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, *L. interrogans* cepa Kito, *L. noguchii* cepa Bonito, *L. borgpetersenii* cepa 4E e *L. biflexa* cepa Patoc foram contadas usando a câmara de Petroff- Hauser e centrifugadas em 10.000×g, durante 10min a 4ºC. Após, o sedimento foram lavadas com PBS 0,01M, pH 7,2 e a concentração ajustada para 10^8 células.mL^{-1}, inativadas a 56ºC overnight e estocadas a -20ºC.

4.2 Obtenção das proteínas recombinantes

O vetor recombinante pAE/LipL32 previamente produzido por Seixas et al (2007) foi utilizado para transformar *E. coli* BL21 (DE3) Star™. A expressão da proteína recombinante foi induzida com 1mM de IPTG e a purificação realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni-Sepharose. A proteína purificada foi quantificada pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce) para posteriormente ser utilizada na inoculação de galinhas. A proteína recombinante foi caracterizada através de WB e *Dot blot*.

4.3 Caracterização da proteína recombinante

Para a caracterização através de WB, a proteína de membrana externa de leptospiras patogênicas produzidas na forma recombinante, rLipL32, foi aquecida a

100°C por 10 minutos em tampão de amostra (0,25M Tris-HCl, 10%SDS, 0,5% azul de bromofenol, 50% glicerol). A proteína na quantidade de 7,5µL por cavidade foi aplicada em um gel de acrilamida 12% na presença de SDS e separada eletroforeticamente. Ao término da eletroforese, a proteína foi transferida para uma membrana de PVDF (Amersham) em tampão de transferência (39mM glicina, 48mM Tris-base, 0,037% SDS, 20% metanol) por 1h30min com a fonte ajustada para DDP (diferença de potencial elétrico) = 100V e C (corrente) = 400mA. Após, a membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado em PBS, por 2h. Os soros de humano convalescente e sadio, cedidos pelo centro de pesquisa da Fiocruz em Salvador, e os de caninos obtidos do banco de soros do Grupo de Estudos em Doenças Transmitidas por Animais (GEDTA) foram diluídos (1:50) em PBS e incubados com a membrana. Os conjugados anti-IgG de humano e canino com peroxidase, foram utilizados diluídos (1:6000) em PBS. A revelação foi desenvolvida com solução substrato-cromógena (1% de cloronaftol e peróxido de hidrogênio pH 7,6). Cada período de incubação foi realizado por 1h a temperatura ambiente sob agitação. Ao término das incubações as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS, por 5 minutos cada vez. Já para a caracterização por *Dot blot* foi utilizado anticorpo monoclonal anti-LipL32 cedido pelo laboratório de Imunologia Aplicada do Núcleo de Biotecnologia da UFPel, foi utilizado como controle positivo rLipL32 já caracterizada previamente e como controle negativo a proteína rLigBNI.

4.4 Obtenção de anticorpos policlonais de galinha (IgY)

Foram utilizadas galinhas poedeiras de 22 semanas de idade, num total de duas aves da raça Leghorn obtidas no Conjunto Agrotécnico Visconde da Graça (CAVG/IFSUL). As aves foram selecionadas e alojadas em um cercado dentro da matriz no CAVG, compondo uma unidade experimental. As aves foram mantidas com umidade e ventilação controladas. O programa de luz seguiu o recomendado pelo manual da linhagem, não sendo ofertado menos que oito horas de escuro por dia. O fornecimento do alimento foi através de comedouro tipo calha, localizado dentro do cercado, com mais de 10cm/ave. As aves tiveram livre acesso à água através de dois bebedouros tipo nipple. A temperatura interna do galpão foi aferida diariamente. As aves foram imunizadas através da via intramuscular com 100µg de

rLipL32 de acordo com o protocolo de Vasconcellos et al (2010). A coleta de sangue foi realizada antes de cada imunização nos dias 0, 14, 28 e 42, sendo coletados 2 a 3mL de sangue por ave, através da punção da veia ulnar, com uso de seringas e agulhas descartáveis O sangue foi armazenado em microtubos de 1,5mL sem anticoagulante, para posterior centrifugação e separação do soro. Nas quatro imunizações, as proteínas foram emulsificadas com o mesmo volume de adjuvante oleoso (Montanide), com intervalo de 14 dias entre as imunizações. Antes de cada uma das imunizações, realizou-se um ELISA indireto com o soro da galinha e a proteína recombinante para avaliar a resposta das aves durante o período. Os ovos foram coletados a partir do terceiro dia após a quarta e última imunização (dia 45), por até trinta dias e foram estocados em 4ºC até o uso.

4.5 Purificação das IgY

A purificação das gemas foi realizada utilizando Polietilenoglicol segundo descrito por SCHADE e colaboradores (2005), essa técnica baseia-se na extração total de IgY da gema de ovo por procedimentos de precipitação (POLSON, 1980) conforme a Fig.4. O método envolve dois importantes passos. O primeiro é o de remover os lipídios e o segundo é a precipitação total de IgY do sobrenadante resultante. Depois de dialisar contra o tampão (normalmente PBS) o extrato de IgY pode ser estocado a -20°C por mais de 1 ano. Seguindo o protocolo, inicialmente, a casca do ovo foi quebrada e gema transferida para um separador de gemas, com o objetivo de remover a maior quantidade de clara possível. Após, a gema foi transferida para papel filtro para retirar a clara restante, a gema foi então coletada em um tubo falcon de 50mL. Essa gema foi homogeneizada com PBS e foram adicionados 3,5% de PEG 6000, seguido por uma homogeneização de 10 minutos em agitador rotativo de cilindros. Nessa etapa do processo, a parte lipídica foi separada da fase aquosa contendo IgY e proteínas. Os tubos foram então centrifugados por 20min a 4°C e o sobrenadante descartado. Foi então adicionado ao tubo 8,5% de PEG 6000 e seguido por mais uma etapa de homogeneização e centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet dissolvido em 1mL de PBS, a esse volume foi acrescentado 12% de PEG. Após passar pela última etapa de centrifugação o pellet foi dissolvido em 800 µL de PBS e acrescido mais

400µL, para completar o volume necessário para a diálise. O extrato foi dializado ON em solução de 0,1% salino, depois o volume foi substituído por PBS e dializado por mais 3 horas. As amostras foram estocadas a -20°C e monitoradas através de eletroforese em gel SDS-PAGE.

4.6 Quantificação e Especificidade das IgY

A concentração de IgY foi mensurada através de quantificação por método de Lowry modificado pelo kit comercial BCA Protein Assay (Thermo Scientific Pierce). A especificidade das IgY para leptospiras patogênicas foi avaliada através de ensaios de ELISA indireto e WB, com a cepa homóloga (Fiocruz L1-130), com as cepas heterólogas Kito, Bonito e 4E, e com rLipL32. No teste de ELISA foram utilizados como anticorpo primário a IgY na diluição de 1:800 e como secundário o conjugado anti-IgY de galinha e peroxidase diluído em PBS (1:2000). Já no WB as leptospiras virulentas tiveram sua concentração ajustada para 10^8células.mL^{-1}, inativadas a 56ºC ON e aquecidas a 100°C por 10 minutos em tampão de amostra. As cepas na concentração do extrato de 50µL, a rLipL32 na concentração de 0,2mg.mL^{-1}, juntamente com uma cepa de *E. coli* como controle negativo e um marcador de peso molecular foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 10% na presença de SDS e separadas eletroforeticamente. Após a eletroforese, realizou-se a transferência para uma membrana de PVDF, utilizando-se as mesmas diluições de IgY e de conjugado anti-IgY de galinha. A revelação foi desenvolvida com solução cromógena em ambas as reações.

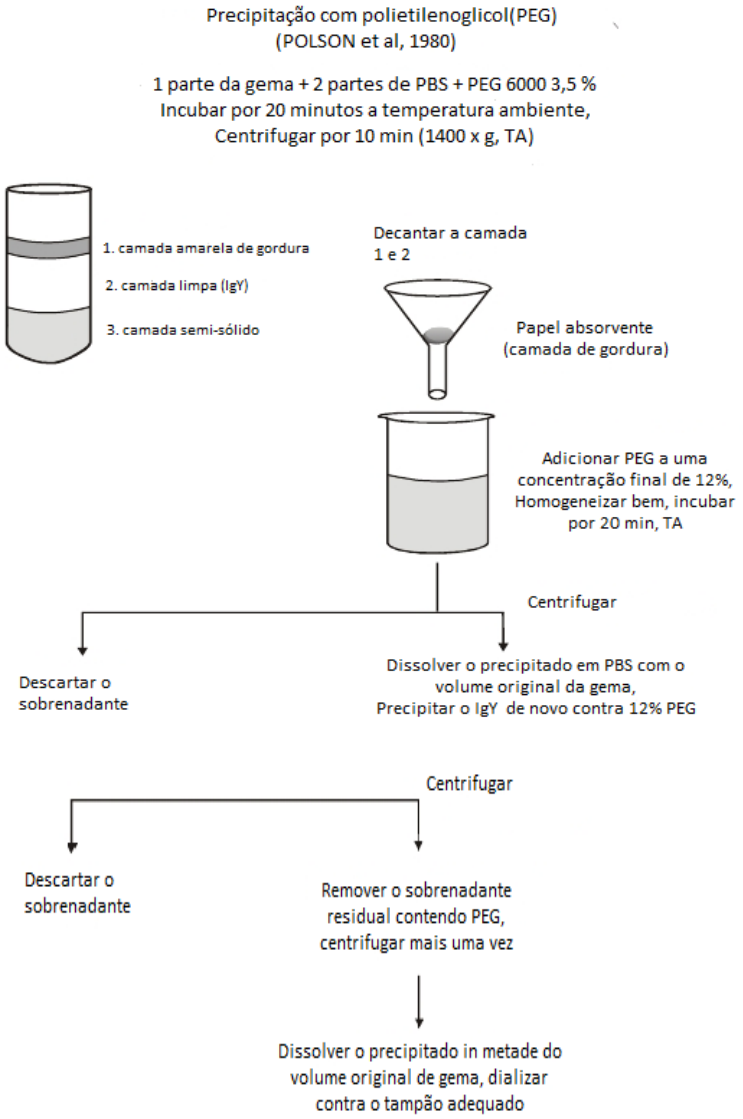


Figura 4 - Diagrama esquemático de extração de IgY usando precipitação com PEG, como proposto por (POLSON; VON WECHMAR; VAN REGENMORTEL, 1980).
Fonte: Traduzido de SCHADE, 2005

4.7 Ensaio de imunização passiva dos hamsters

Durante o período experimental, foram realizados dois ensaios de imunização passiva. Os hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram utilizados como modelo animal para os experimentos. No primeiro teste, vinte hamsters fêmeas, divididas em quatro grupos de cinco fêmeas, com nove semanas de idade foram imunizadas através da via intraperitonial (IP), com 500, 300 e 100µg de IgY contra rLipL32, sendo que um

grupo controle foi inoculado apenas com PBS (Tab.2). Após 24h, todos os animais foram desafiados com a dose letal da cepa Fiocruz L1-130 através da via IP (SILVA et al., 2007).

Tabela 2 - Delineamento experimental para a imunização passiva em hamsters.

Grupo	Dose imunização	Dose desafio
1	500µg IgY	500 leptospiras
2	300µg IgY	500 leptospiras
3	100µg IgY	500 leptospiras
4	0µg IgY	500 leptospiras

No segundo experimento 60 hamsters (*Mesocricetus auratus*), 30 fêmeas e 30 machos, com oito a nove semanas de idade foram imunizados através da via intraperitonial (IP) com 1mg de IgY contra rLipL32, sendo que um grupo controle para cada sexo foi inoculado apenas com PBS. Os animais foram divididos em cinco grupos de seis animais de acordo com o sexo. As fêmeas foram imunizadas e 24h depois desafiadas com 500 leptospiras da cepa homóloga *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, e das cepas heterólogas: *L. interrogans* cepa Kito, *L. noguchii* cepa Bonito e *L. borgpetersenii* cepa 4E. Já os machos, foram primeiramente desafiados com as mesmas cepas e após 24 h foram imunizados com IgY anti-rLipL32 (Tab.3). Durante os experimentos, uma avaliação clínica diária foi realizada em todos os animais. Ao final do experimento, um animal de cada grupo foi necropsiado e analisado quanto aos achados macroscópicos. Os rins, fígado e pulmão de cada animal foram utilizados para a técnica de *imprint* (CHAGAS-JUNIOR et al., 2009).

Todos os animais foram mantidos em microisoladores com as dimensões de 49×34×16cm, totalizando 1666cm^2 conforme recomendado no protocolo de Bem-Estar de hamster, sendo alojados em estantes ventiladas com umidade e ventilação controladas. O programa de luz seguiu o recomendado, não sendo ofertado menos que oito horas de escuro por dia. O fornecimento do alimento foi na forma de ração peletizada na própria grade da gaiola, num total de 8-12g/hamster. Os hamsters

tiveram livre acesso à água através de duas mamadeiras por gaiola. As trocas das caixas com as camas de maravalha foram realizadas três vezes por semana.

Tabela 3. Delineamento experimental para o segundo experimento de imunização

Grupo	Sexo	Dose imunização	Cepa desafio
1	Fêmea	1mg IgY	L1-130
2	Fêmea	1mg IgY	KITO
3	Fêmea	1mg IgY	BONITO
4	Fêmea	1mg IgY	4E
5	Fêmea	0mg IgY	L1-130
6	Macho	1mg IgY	L1-130
7	Macho	1mg IgY	KITO
8	Macho	1mg IgY	BONITO
9	Macho	1mg IgY	4E
10	Macho	0mg IgY	L1-130

4.8 Conjugação com peroxidase

Para a conjugação do anticorpo foi utilizado a metodologia proposta por WISDOM, 2005. Primeiramente, foi dissolvido 2mg da enzima peroxidase (Horseradish peroxidase) em 500µL de água ultra-pura, essa enzima foi modificada com periodato de sódio e dializada contra acetato de sódio overnight a 4°C. Após foi acrescentado 4mg de IgY anti-LipL32 e foi ajustado o pH da enzima dializada para 9,5, a mistura foi homogeneizada por 2h em temperatura ambiente. Por fim, foi acrescentado o reagente tetraborato de sódio e homogeneizado por mais 2h. O anticorpo conjugado foi então estocado a 4°C até o uso. A eficiência da conjugação foi testada através de ensaios de ELISA direto e WB. No ELISA a placa foi sensibilizada com 5µg da proteína rLipL32 e a reação foi testada em diferentes diluições do conjugado, também foi testado um ELISA direto com a placa sensibilizada com Poli-L-Lisina e diferentes cepas de *Leptospira* na diluição 10^3

reagindo contra diferentes titulações do conjugado. Para o WB, utilizou-se o conjugado na diluição de 1:50 para reagir com a proteína rLipL32 e *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, e as cepas heterólogas: *L. interrogans* cepa Kito, *L. noguchii* cepa Bonito, *L. borgpetersenii* cepa 4E inativadas. Um extrato de *E. coli* foi utilizado como controle negativo.

4.9 Conjugação com fluoresceína

Para a conjugação do anticorpo com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi realizado uma adaptação da metodologia proposta por WISDOM, 2005. A técnica consistiu em diluir o anticorpo IgY anti-rLipL32 na concentração de 13mg.mL^{-1} em tampão carbonato-bicarbonato (50mM, pH 8,3) esse anticorpo foi então colocado em uma membrana de diálise e essa foi emersa em um solução de isotiocianato de fluoresceina (Sigma® Life Science) dissolvido no mesmo tampão. Após incubação por 18h sob agitação a 4°C, a membrana de diálise foi retirada do tampão contendo o fluoróforo e passada em sucessivas diálises com PBS, para retirar o excesso de FITC. Por fim, o anticorpo conjugado foi estocado em alíquotas em -20°C protegido da luz. Para testar a eficiência da conjugação foi realizada uma imunofluorescência direta (IFD).

4.10 Imunofluorescência direta

Inicialmente, as lâminas previamente limpas foram imersas em solução de 50mL de poli-L-Lisina e 450mL de água destilada contida em um berço de plástico por 5 minutos. Após a secagem da lâmina, foi aplicado 10uL de cultura de *L. interrogans* (10^8 bactérias.mL^{-1}) em cada círculo da lâmina, e incubado a 30ºC durante 1h até secar a gota. Depois se cobriu a lâmina com metanol, armazenando em freezer -20ºC durante 10 minutos e seguido por lavagem com uma solução de PBS contendo soro fetal bovino. Foi adicionado então, 10µL do conjugado em diferentes diluições (1:50, 1:100 e 1:200) e incubou-se por mais 1h em câmara úmida a 30°C. Após mais uma lavagem foi colocado em cada círculo da lâmina um solução de coloração de Hoestch e depois de 30min em câmara úmida as lâminas foram montadas com glicerol 10% e as lamínulas sobrepostas. Como controle positivo foi utilizado um soro policlonal anti-coelho conjugado com FITC, gentilmente cedido

pelo laboratório 10 do centro de biotecnologia da UFPel e como controle negativo foi utilizado a cepa saprófita Patoc para sensibilizar a placa. Por fim, as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX 51).

4.11 Aspectos Éticos

Esta dissertação faz parte de um projeto cadastrado no COCEPE/UFPel sob o número 5.00.00.020 e analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPel, processo nº 23110.004657/2010-84 (Anexo A). Os animais utilizados neste trabalho foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Além disso, o laboratório de Biologia Molecular (CDTec) possui Certificado de Qualidade em Biossegurança nº0081/98. Este projeto foi financiado pelo CNPq (Universal 2011, Faixa A, Processo 482180/2011-0) e a bolsa de mestrado financiada pela CAPES.

5 RESULTADOS

5.1 Produção e caracterização das proteínas recombinantes

A cepa de *E. coli* BL21foi transformada com o plasmídeo pAE/lipL32 e as colônias transformadas foram utilizadas para inocular meio líquido. Na fase de crescimento logarítmico procedeu-se a indução da expressão da proteína recombinante através da adição de IPTG. Amostras coletadas após 4 horas de indução revelaram que a proteína rLipL32 foi expressa pela cepa de *E. coli* TOP10F (Fig.5).

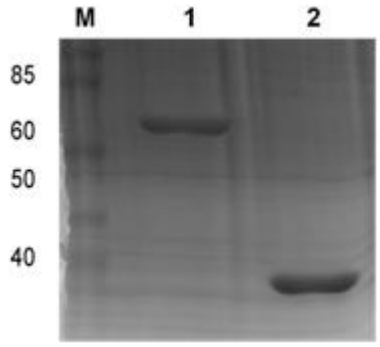


Figura 5 - Eletroforese em gel de acrilamida 12%, com as proteínas recombinantes rLigBNI e rLipL32, onde M= marcador de peso molecular em KDa; 1= rLigBNI (controle); 2= rLipL32.

A proteína LipL32 recombinante foi quantificada pelo método de Lowry modificado, tendo como resultado a concentração de 0,5µg.µL^{-1}. A antigenicidade de rLipL32 pode ser evidenciada através da técnica de WB, tanto em soro humano quanto em soro canino convalescente. Conforme esperado, não foi possível visualizar bandas quando reagidas com o soro humano sadio.

Na Fig. 6, é possível visualizar bandas reativas de LipL32, LigBNI e LigANI quando reagidas com soros positivos. A proteína LipL32 não foi reconhecida pelo soro canino utilizado, contrariando os resultados observados em outros testes (dados não apresentados). Em todas as reações as quais utilizou soros de humano e canino sadios, não houve o reconhecimento de nenhuma das proteínas.

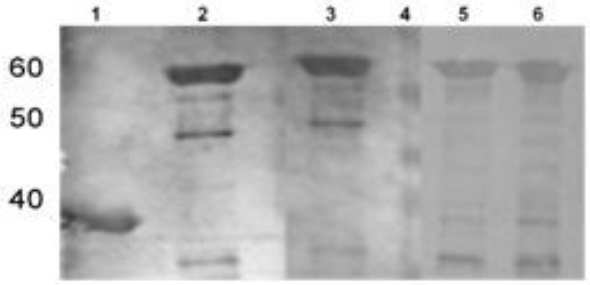


Figura 6 - Reação da proteína recombinante com a IgY produzida, em *Western blot.* 1=LipL32 (soro humano); 2=LigBNI (soro humano); 3=LigBNI (soro canino); 4= marcador; 5=LigANI (soro humano); 6=LigANI (soro canino).

A proteína também foi testada pela técnica de *Dot-blot* na qual é possível visualizar reação forte da proteína rLipL32 quando reagida com anticorpos monoclonais (MAb) produzidos contra essas bactérias (FERNANDES et al. 2007), como é possível observar na Fig.7.

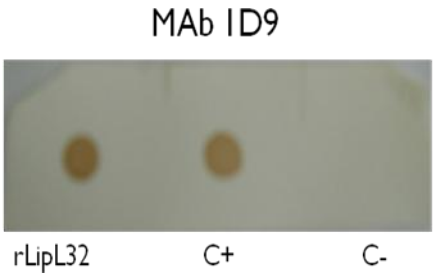


Figura 7 - Especificidade da rLipL32 com o MAb 1D9 através da técnica de Dot blot. Sendo usado como controle positivo a proteína rLipL32 previamente caracterizada e como controle negativo a proteína rLigBNI.

5.2 Imunogenicidade do soro das galinhas

As imunizações foram realizadas seguindo o protocolo experimental e as coletas de sangue antes de cada imunização permitiram acompanhar a

imunogenicidade através do ELISA indireto. No dia 48, procedeu-se a coleta diária dos ovos das duas galinhas até o dia 78. Foi também realizado um WB para verificar se o soro das galinhas reagia com a proteína na forma tanto recombinante como nativa (Fig.8).

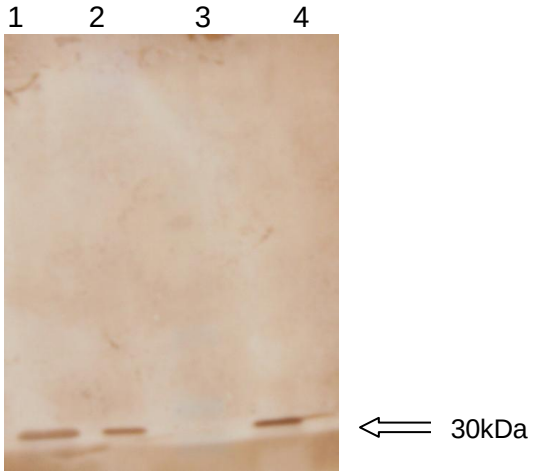


Figura 8 - Em *Western blot* a reação do soro das galinhas com a proteína recombinante e dois diferentes extratos da *L. interrogans.* 1=rLipL32, 2=20µL da bactéria, 3=Marcador e 4= 50µL da bactéria

5.3 Purificação e caracterização das IgY

Após a coleta dos primeiros 20 ovos, procedeu-se o início do processo de purificação das IgY das gemas. Para analisar a pureza dos anticorpos produzidos foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida com um tampão redutor o que possibilitou observar duas bandas, uma de cadeia leve (25kDa) e outra pesada (67kDa) do IgY, como demonstrado na Fig.9. Na quantificação por BCA foram obtidos para os IgY purificados a concentração de 13mg.mL^{-1}.

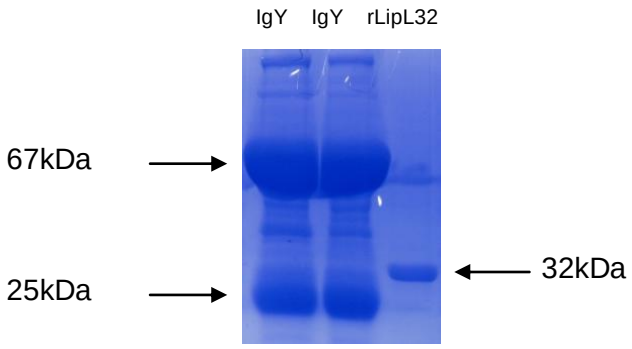


Figura 9 - SDS-PAGE com a IgY purificada em condições redutoras

Na Fig.10, o ELISA indireto com os dois lotes de IgY produzidos, com reações com a *Leptospira* L1-130 e com a proteína recombinante. Nos dois lotes os resultados foram similares, tendo a proteína recombinante o dobro de reação que a cepa patogênica, porém ambas apresentaram bons títulos até a diluição de 1:6400.

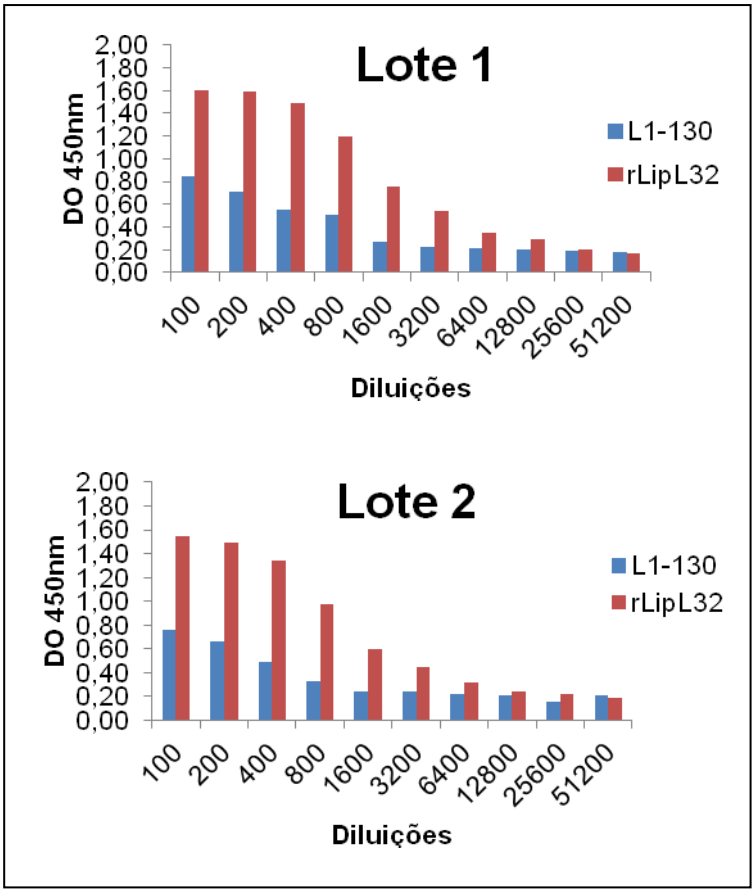


Figura 10 – Reação por ELISA indireto com os dois lotes de IgY produzidos com a proteína recombinante (vermelho) e a nativa (azul).

Através da técnica de WB foi possível visualizar a reação da IgY anti-rLipL32 com as quatro cepas utilizadas neste estudo, demonstrando a detecção da proteína nativa em importantes cepas de *Leptospira* causadoras de doença grave em humanos e animais e não reagiram com o controle negativo *E. coli* (Fig.11).

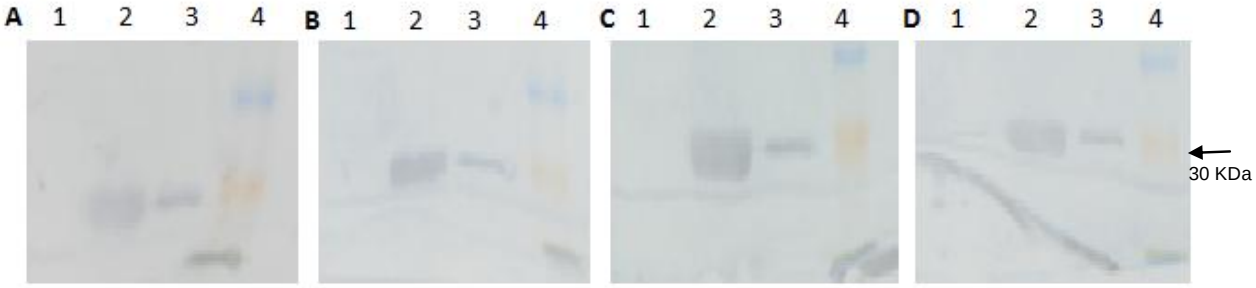


Figura 11 – Detecção de LipL32 em cepas patogênicas pelo anticorpo IgY anti-LipL32. Sendo as reação com: A L1-130, B 4E, C Bonito e D Kito. Enquanto os números indicam: 1-*E. coli,* 2- rLipL32, 3- cepa e 4- marcador.

5.4 Imunização passiva dos hamsters

A imunização dos hamsters com a preparação contendo IgY anti-rLipL32 não conferiram proteção no modelo animal contra o desafio homólogo com dose letal (Tab.4).

Tabela 4 - Óbitos das fêmeas no experimento 1

Grupos	Dias para óbito (pós inoculação)
PBS	8, 9, 9, 10, 10
100µg IgY	9, 9, 10, 11, 12
300µg IgY	8, 9, 9, 9, 10
500µg IgY	9, 10, 10, 11, 13

Igualmente no segundo experimento, no qual se testou duas formas diferentes de imunização, uma antes do desafio e a outra 24h após, além de desafio com cepas heterólogas juntamente com a homóloga, também não conferiram proteção (Tab.5).

Tabela 5 - Óbitos de fêmeas e machos no experimento 2

Grupos fêmeas	Cepas	Dias para óbito	Grupos machos	Cepas	Dias para óbito
1	PBS	8,9,10,10,10,10	6	PBS	9,9,9,10,10,11
2	L1-130	9,9,9,9,10 (17)*	7	L1-130	10,10,10,10,11,11
3	KITO	12,13,19 (21,21,21)*	8	KITO	12,17,19 (17,21,21)*
4	BONITO	10,12,12,13,13,13	9	BONITO	11,11,12,12,13 (15)*
5	4E	10,12,12,12,14,14	10	4E	10,11,11,11,12 (15)*

*animais eutanasiados por apresentarem perda de peso vivo maior que 10%

Ao final do experimento dois, um animal de cada grupo foi necropsiado e analisado quanto aos achados macroscópicos. Os rins, fígado e pulmão de cada animal foram utilizados na técnica de *imprint* para posterior análise. Durante a necropsia, na análise macroscópica, pode-se perceber a presença de lesões como hemorragia em pulmões, congestão de órgãos e icterícia nas mucosas além de sangramento nasal.

Quanto a avaliação clínica, observou-se que os animais que morreram durante os experimentos apresentavam sinais da leptospirose como prostração, apatia, desidratação e isolamento. Enquanto, os animais que permaneceram mais tempo vivos durante o experimento não apresentavam mais esses sinais.

5.5 Conjugação com peroxidase

Para testar a conjugação do IgY anti-rLipL32 produzido foi realizado um ELISA e um WB testando o conjugado com a proteína recombinante e as cepas *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, *L. interrogans* cepa Kito, *L. noguchii* cepa Bonito, *L. borgpetersenii* cepa 4E e *L. biflexa* cepa Patoc.

No WB foi possível visualizar bandas reagindo fortemente contra a proteína recombinante e em todas as cepas, com exceção da espécie saprófita que serviu como controle negativo nesse experimento. O anticorpo conjugado com peroxidase foi aplicado na diluição 1:100 (Fig.12).

Para a análise da capacidade de reconhecimento e sinalização pelo conjugado a utilização de um *checkerboard titration* para a otimização do ELISA direto, foi fundamental. Nesta padronização, obteve-se a melhor diluição dos antígenos para a sensibilização das placas e a melhor diluição do conjugado a serem testados. Com isso, utilizaram-se diluições de 10^8 até 10^3 das cepas patogênicas testadas no estudo, não apresentando diferença entre essas diluições. Além disso, a melhor diluição do conjugado IgY anti-rLipL32 foi de 1:6000 nas diferentes cepas (Fig.13).

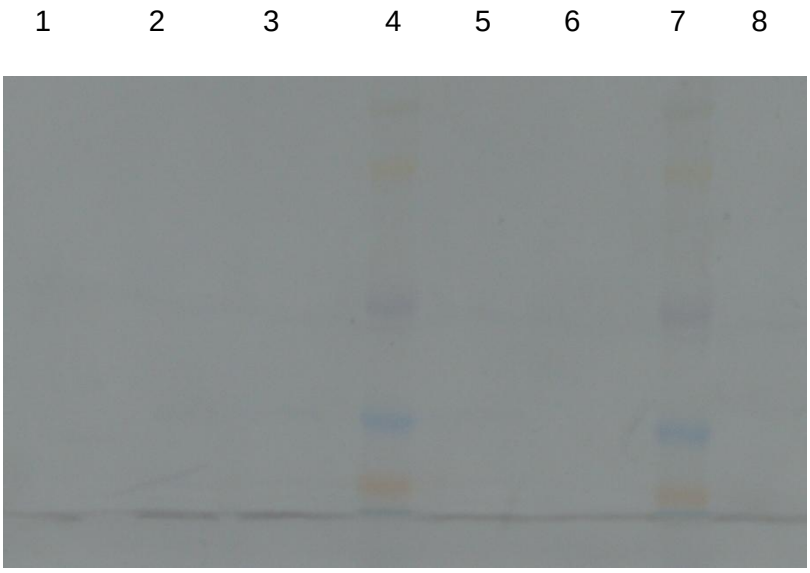


Figura 12 – Reação da IgY conjugada com peroxidase, frente a proteína recombinante e diferentes cepas de *Leptospira.* 1= *L. biflexa* cepa Patoc, 2= *L. borgpetersenii* cepa 4E, 3= *L. noguchii* cepa Bonito, 4= Marcador de peso molecular, 5= *L. interrogans* cepa Kito, 6= *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, 7= Marcador de peso molecular e 8= rLipL32.

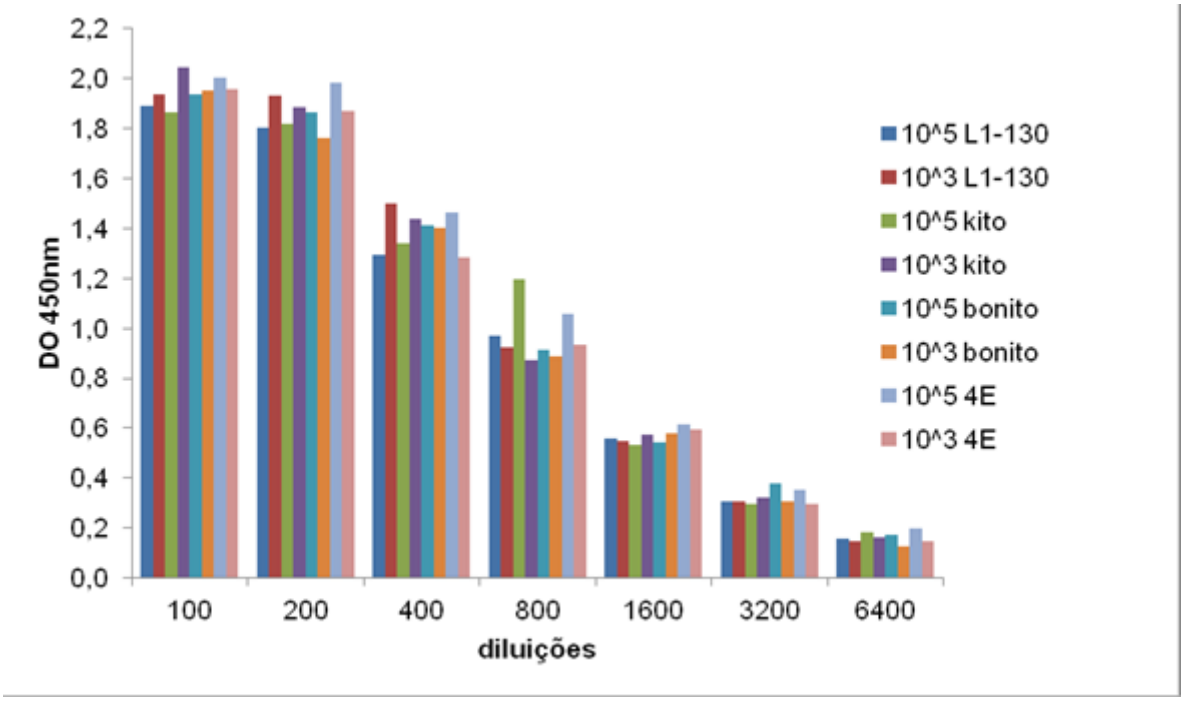


Figura 13 – ELISA com a reação da IgY conjugada com peroxidase, frente a diferentes cepas de *Leptospira* (diluições 10^5 e 10^3). Azul escuro e vermelho = *L. interrogans* cepa Fiocruz L1-130, Verde e roxo = *L. interrogans* cepa Kito, Azul e laranja = *L. noguchii* cepa Bonito e Azul claro e salmão = *L. borgpetersenii* cepa 4E.

5.6 Conjugação com FITC

Na imunofluorescência direta realizada para testar a conjugação do anticorpo com FITC não foi possível observar uma fluorescência forte nas diferentes diluições do conjugado. Apesar de se ter células na lâmina como prova o controle com o corante de DNA (Hoestch). Contudo, no controle positivo com o uso de PAb conjugado houve reação e no controle negativo com a lâmina sensibilizada com a cepa Patoc não houve reação (Fig.14).

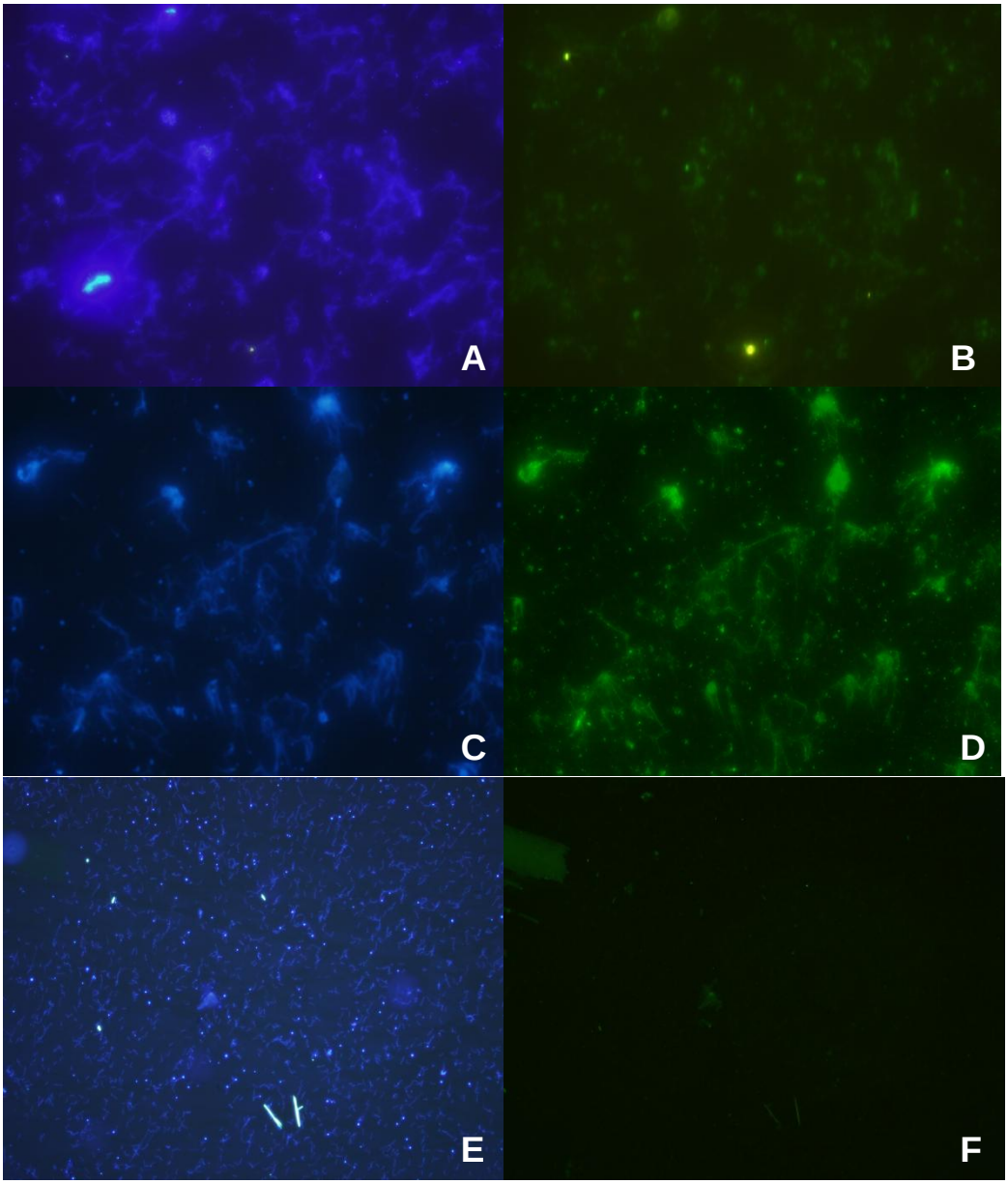


Figura 14 - Imunofluorescência direta com a IgY anti-rLipL32 conjugada a FITC. Sendo A e B a *Leptospira interrogans* cepa Fiocruz L1-130 reagindo com o IgY na diluição 1:100, C e D o controle positivo com o PAb 1D9 e E e F o controle negativo com Patoc, todos marcado com FITC e Hoestch, com o aumento de 100x.

6 DISCUSSÃO

A leptospirose é uma antrozooponose de distribuição mundial com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10% (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009). No mundo a incidência da leptospirose humana varia de 0,1 a 1 caso por 100 mil habitantes/ano em regiões onde o clima é temperado, mais de 10 casos por 100 mil habitantes/ano em regiões onde o clima é tropical úmido e mais de 100 casos por 100 mil habitantes/ano em regiões endêmicas afetadas por surtos (WHO, 2003). Assim, a leptospirose pode ser considerada uma das enfermidades no topo da lista de doenças tropicais negligenciadas (HARTSKEERL, et al. 2011).

O diagnóstico clínico da doença é dificultado, uma vez que as leptospiras podem afetar uma grande variedade de órgãos, acarretando em formas de apresentação que variam desde infecções sub-clínicas até falha renal aguda e hemorragia pulmonar (FAINE, et al., 1999). Além disso, a sintomatologia clínica é muito semelhante a outras doenças o que faz o diagnóstico laboratorial da leptospirose de extrema importância, especialmente na fase inicial da doença, para que se inicie o mais cedo possível o tratamento com antibiótico específico que assegure um prognóstico favorável (MCBRIDE et al., 2007).

Proteínas de membrana externa com atividade de adesão e hemólise são antígenos promissores para compor uma vacina protetora e de amplo espectro e serem utilizadas em testes diagnósticos, pois são reconhecidas pelo sistema imune e desempenham um papel importante na patogênese desta doença (CULLEN; HAAKE; ADLER, 2004). A proteína LipL32, a qual foi utilizada neste estudo na forma recombinante, vem sendo empregada em testes diagnósticos e vacinas experimentais por diferentes grupos de pesquisa no mundo, entretanto, até o

momento, não existiram avanços para um produto recombinante para o uso em humanos e animais.

Vasconcellos et al. (2010) testaram três formatos distintos de ELISA de captura de antígeno para detecção de leptospiras em soro humano experimentalmente contaminado. Para esses testes foi utilizado um anticorpo policlonal IgY obtido a partir de galinhas imunizadas com uma cepa virulenta de *L. interrogans* sorovar Copenhageni. Além da utilização de MAbs na captura e IgY biotinilada na detecção juntamente com um conjugado estreptavidina-peroxidase para aumentar a quantidade de enzima no complexo antígeno-anticorpo e, assim, amplificar o sinal do produto da reação enzimática.

Atualmente, estudos para a obtenção de insumos que possam ser empregados no desenvolvimento de testes para a captura de antígeno, e que detectem os diversos sorovares patogênicos de *Leptospira*, bem como, a produção de imunógenos que protejam o modelo animal em testes de desafio com cepa homóloga e heteróloga, são o alvo de diversos grupos de pesquisa. Neste contexto, o presente trabalho abordou a produção e caracterização de um anticorpo policlonal IgY contra a proteína recombinante LipL32, a mais abundante no proteoma de leptospiras patogênicas, o qual poderá ser uma alternativa com potencial para ser usado em testes de imunodiagnóstico e imunoprofilaxia.

O uso de IgY de galinhas no lugar de anticorpos IgG de mamíferos para detectar antígenos próprios e não próprios, certamente poderá ajudar a diminuir os custos de testes imunológicos. Além disso, os anticorpos de galinhas não ativam o sistema complemento de mamíferos nem interagem com fatores reumatóides, bacterianos ou receptores Fc de humanos (DIAS DA; TAMBOURGI, 2010). Outras vantagens incluem: redução no uso de animais, já que galinhas produzem maiores quantidades de anticorpos que outros animais de laboratório; procedimentos menos invasivos; utilização em vários testes imunológicos mais estáveis. Ademais, centros especializados em estudos alternativos ao uso de animais em experimentação e na produção de fármacos, indicam que o uso de IgY é um interessante avanço para a promoção e manutenção do bem-estar animal, quando comparados com as imunoglobulinas de mamíferos, os quais quase que na totalidade são eutanasiados ao final dos experimentos (SCHADE et al., 2005)

As galinhas podem ser imunizadas através de diferentes rotas dependendo do protocolo de imunização (DIAS DA; TAMBOURGI, 2010). Nesse estudo, as galinhas foram imunizadas através da via intramuscular o que segundo WOOLEY & LANDON (1995) resulta em altos níveis de anticorpos 28 dias após a imunização, e o anticorpo resultante pode apresentar uma especificidade 10 vezes maior quando comparado com galinhas imunizadas com o mesmo antígeno pela via sub-cutânea. Além disso, galinhas imunizadas pela via intramuscular continuam produzindo anticorpos específicos durante mais de 200 dias (HORTON et al., 1984). De igual modo, galinhas podem tolerar o uso de adjuvantes imunológicos comuns (AKITA; NAKAI, 1993), como o adjuvante oleoso utilizado nesse estudo.

A imunidade ativa refere-se ao processo de expor o indivíduo ao antígeno para gerar resposta imune adaptativa. Essa resposta requer dias ou até semanas para ser obtida, a qual gera uma memória que poderá ser duradoura. Por outro lado, a imunidade passiva refere-se ao processo de fornecer anticorpos para proteger contra infecções, essa resposta é imediata, porém, a duração não é maior do que algumas semanas. A imunidade passiva adquirida envolve a obtenção de anticorpos antígeno-específicos de outra fonte administrado para proteger indivíduos suscetíveis (BAXTER, 2007). Os anticorpos IgYs têm sido amplamente utilizados para imunização passiva em animais e humanos (KOVACS-NOLAN; MINE, 2012). Além de substituir os antibióticos, que muitas vezes causam resistência bacteriana, podem ser usados como aditivos alimentares para atingir alvos específicos e aumentar o crescimento dos rebanhos (COOK; TROTT, 2010).

No presente trabalho, foi testado pela primeira vez o uso de imunoglobulina Y contra a proteína recombinante LipL32 para imunização de hamsters desafiados com diferentes cepas de *Leptospira*. Embora os resultados tenham mostrado a mortalidade dos animais, evidenciou-se um percentual de animais que sobreviveram mais de duas semanas após o desafio, sendo eutanasiados por apresentarem um quadro clínico típico de doença crônica. Ao revisarmos a literatura, não existem parâmetros padronizados para o inoculo a ser utilizado em experimentos de imunização passiva. A utilização de uma dose de 500 leptospiras pode ser considerada elevada para os parâmetros naturais de exposição ao antígeno, esse fato pode ter mascarado uma diferença na abordagem experimental utilizada com a

imunização antes e depois do desafio. Novos estudos que envolvam dose-resposta e análise de parâmetros secundários de infecção necessitam ser realizados.

Outro fator importante a ser estudado é a utilização da via intraperitoneal para a imunização. Em diferentes trabalhos, os anticorpos foram administrados pela via oral, como mostrado no estudo com suínos infectados com *E. coli* e *Salmonella typhimirium* que foram alimentados com uma dieta suplementada com IgY e demonstrou que a administração oral pode regular o sistema imune e reduzir o stress de infecções microbianas (PARK et al., 2011).

Por possuir inúmeras vantagens e ser uma abordagem promissora para o desenvolvimento de insumos que possam ter ampla utilização na prevenção e no diagnóstico da leptospirose, novos estudos serão planejados para dar continuidade ao trabalho realizado..

7 CONCLUSÕES

– A proteína recombinante LipL32 produzida neste estudo é antigênica quando testada com soro humano convalescente de leptospirose.

– A Imunoglobulina Y anti-rLipL32 produzida nesse estudo tem alta concentração e bom rendimento.

– A IgY anti-rLipL32 caracterizada reconhece a proteína LipL32 nativa nas cepas patogênicas e virulentas pertencentes aos principais sorogrupos causadores de doença grave e óbito em humanos e animais no Brasil e no mundo.

– A IgY anti-rLipL32 não confere proteção nos hamsters através de imunização passiva nos formatos utilizados.

REFERÊNCIAS

ADLER, B.; DE LA PENA MOCTEZUMA. A. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.287-296, 2010.

AKITA, E. M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, v.160, n.2, p.207-214, 1993.

ANDRE-FONTAINE, G. Canine leptospirosis--do we have a problem? **Veterinary Microbiology***,* v.117, n.1, p.19-24, 2006.

BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity***,* v.74, n.11, p.6356-6364, 2006.

BAXTER, D. Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. Occup.Med.(Lond), v.57, n.8, p.552-556, 2007.

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. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases.***,* v.3, n.12, p.757-771, 2003.

BOONYOD, D.; POOVORAWAN, Y.; BHATTARAKOSOL, P.; CHIRATHAWORN, C. LipL32, an outer membrane protein of *Leptospira*, as an antigen in a dipstick assay for diagnosis of leptospirosis. **Asian Pacific Journal of Allergy & Immunology,** v.23, n.2-3, p.133-141, 2005.

BROWN, P. D.; GRAVEKAMP, C.; CARRINGTON, D. G.; VAN DE KEMP, H.; HARTSKEERL, R. A.; EDWARDS, C. N.; EVERARD, C. O.; TERPSTRA, W. J.; LEVETT, P. N. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology***,* v.43, n.2, p.110-114, 1995.

BULACH, D. M.; ZUERNER, R. L.; WILSON, P.; SEEMANN, T.; MCGRATH, A.; CULLEN, P. A.; DAVIS, J.; JOHNSON, M.; KUCZEK, E.; ALT, D. P.; PETERSON-BURCH, B.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; DAVIES, J. K.; ADLER, B. Genome reduction in *Leptospira borgpetersenii* reflects limited transmission potential.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,* v.103, n.39, p.14560-14565, 2006.

BURNS, Robert et al. **Immunochemical Protocols. 3 ed.** Totowa, New Jersey: Humana Press, 2005, 317p.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. **BioDrugs***,* v.16, n.6, p.433-437, 2002.

CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJAKER, P. E.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic Research.***,* v.21, n.1, p.1-6, 2000.

CARLANDER, D.; STALBERG, J.; LARSSON, A. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Upsala Journal of Medical Sciences .***,* v.104, n.3, p.179-189, 1999.

CERQUEIRA, G. M.; MCBRIDE, A. J.; PICARDEAU, M.; RIBEIRO, S. G.; MOREIRA, A. N.; MOREL, V.; REIS, M. G.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A. Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of ligB to typing leptospiral isolates. **Journal of Medicine and Microbiology***,* v.58, n.Pt 9, p.1173-1181, 2009.

CERQUEIRA, G. M.; PICARDEAU, M. A century of *Leptospira* strain typing. **Infection, Genetics and Evolution.***,* v.9, n.5, p.760-768, 2009.

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. An imprint method for detecting leptospires in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**., v.58, n.Pt 12, p.1632-1637, 2009.

CHALAYON, P.; CHANKET, P.; BOONCHAWALIT, T.; CHATTANADEE, S.; SRIMANOTE, P.; KALAMBAHETI, T. Leptospirosis serodiagnosis by ELISA based on recombinant outer membrane protein. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene***,* v.105, n.5, p.289-297, 2011.

CHOY, H. A.; KELLEY, M. M.; CHEN, T. L.; MOLLER, A. K.; MATSUNAGA, J.; HAAKE, D. A. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infection and Immunity .***,* v.75, n.5, p.2441-2450, 2007.

COOK, M.E.; TROTT, D.L.. IgY: immune components of eggs as a source of passive immunity for animals and humans. **World's Poultry Science Journal** v. 66, p.215–25. 2010

COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; FERNANDES, C. P.; SEYFFERT, N.; SEIXAS, F. K.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. Evaluation of the anti-LipL32 monoclonal antibodies potential for use in leptospirosis immunodiagnostic tests. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry***,* v.28, n.3, p.279-288, 2007.

COVA, L. DNA-designed avian IgY antibodies: novel tools for research, diagnostics and therapy. **Journal of Clinical Virology** *,* v.34 Suppl 1, p.S70-S74, 2005.

CRODA, J.; FIGUEIRA, C. P.; WUNDER, E. A., JR.; SANTOS, C. S.; REIS, M. G.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. Targeted mutagenesis in pathogenic *Leptospira* species: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity***,* v.76, n.12, p.5826-5833, 2008.

CRODA, J.; RAMOS, J. G.; MATSUNAGA, J.; QUEIROZ, A.; HOMMA, A.; RILEY, L. W.; HAAKE, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. *Leptospira* immunoglobulin-like proteins as a serodiagnostic marker for acute leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology***,* v.45, n.5, p.1528-1534, 2007.

CULLEN, P. A.; CORDWELL, S. J.; BULACH, D. M.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Global analysis of outer membrane proteins from *Leptospira interrogans* serovar Lai. **Infection and Immunity***,* v.70, n.5, p.2311-2318, 2002.

CULLEN, P. A.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Outer membrane proteins of pathogenic spirochetes. **FEMS Microbiology Reviews***,* v.28, n.3, p.291-318, 2004.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O.; LEVETT, P. N. Assessment of the efficacy of an IgM-elisa and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygine.***,* v.61, n.5, p.731-734, 1999.

CUMBERLAND, P.; EVERARD, C. O.; WHEELER, J. G.; LEVETT, P. N. Persistence of anti-leptospiral IgM, IgG and agglutinating antibodies in patients presenting with acute febrile illness in Barbados 1979-1989. **European Journal of Epidemiology***,* v.17, n.7, p.601-608, 2001.

DAVIES, E. L.; SMITH, J. S.; BIRKETT, C. R.; MANSER, J. M.; ANDERSON-DEAR, D. V.; YOUNG, J. R. Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. **Journal of Immunological Methods***,* v.186, n.1, p.125-135, 1995.

DE ALMEIDA, C. M.; DA SILVA, C. L.; COUTO, H. P.; ESCOCARD, R. C.; DA ROCHA, D. G.; SENTINELLI, L. P.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon***,* v.52, n.2, p.293-301, 2008.

DE ALMEIDA, C. M.; QUINTANA-FLORES, V. M.; MEDINA-ACOSTA, E.; SCHRIEFER, A.; BARRAL-NETTO, M.; DIAS DA, S. W. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic *Escherichia coli*. **Scandinavian Journal of Immunology,** v.57, n.6, p.573-582, 2003.

DELLAGOSTIN, O. A.; GRASSMANN, A. A.; HARTWIG, D. D.; FELIX, S. R.; DA SILVA, E. F.; MCBRIDE, A. J. Recombinant vaccines against leptospirosis. **Human Vaccine**, v.7, n.11, p.in press, 2011.

DEY, S.; MOHAN, C. M.; RAMADASS, P.; NACHIMUTHU, K. Diagnosis of leptospirosis by recombinant antigen based single serum dilution ELISA. **Indian Journal of Medical Research***,* v.128, n.2, p.172-177, 2008.

DIAS DA, S. W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology***,* v.135, n.3-4, p.173-180, 2010.

EVANGELISTA, K. V.; COBURN, J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. **Future Microbiology***,* v.5, n.9, p.1413-1425, 2010.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. Leptospira and Leptospirosis. 2.ed., Melbourne , Austrália: MedSci, 1999, 272p.

FERNANDES, C. P.; SEIXAS, F. K.; COUTINHO, M. L.; VASCONCELLOS, F. A.; SEYFFERT, N.; CRODA, J.; MCBRIDE, A. J.; KO, A. I.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. Monoclonal antibodies against LipL32, the major outer membrane protein of pathogenic *Leptospira*: production, characterization, and testing in diagnostic applications. **Hybridoma (Larchmt.)***,* v.26, n.1, p.35-41, 2007.

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. Evaluation of recombinant *Leptospira* antigen-based enzyme-linked immunosorbent assays for the serodiagnosis of leptospirosis. **Journal of Clinical Microbiology***,* v.39, n.9, p.3303-3310, 2001.

FRAGA, T. R.; BARBOSA, A. S.; ISAAC, L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. **Scandinavian Journal of Immunology***,* v.73, n.5, p.408-419, 2011.

GASSMANN, M.; THOMMES, P.; WEISER, T.; HUBSCHER, U. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **FASEB Journal***,* v.4, n.8, p.2528-2532, 1990.

GUERREIRO, H.; CRODA, J.; FLANNERY, B.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; GALVAO, R. M.; LEVETT, P. N.; KO, A. I.; HAAKE, D. A. Leptospiral proteins recognized during the humoral immune response to leptospirosis in humans. **Infection and Immunity***,* v.69, n.8, p.4958-4968, 2001.

HAAKE, D. A. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. **Microbiology***,* v.146 (Pt 7), p.1491-1504, 2000.

HAAKE, D. A.; CHAO, G.; ZUERNER, R. L.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; MAZEL, M.; MATSUNAGA, J.; LEVETT, P. N.; BOLIN, C. A. The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity.***,* v.68, n.4, p.2276-2285, 2000.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infection and Immunity.**, v.70, n.9, p.4936-4945, 2002.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: Dynamics of infection in the changing world. **Clinical Microbiology and Infection** , v.17, n.4, p.494-501, 2011.

HAUK, P.; BARBOSA, A. S.; HO, P. L.; FARAH, C. S. Calcium binding to *Leptospira* outer membrane antigen LipL32 is not necessary for its interaction with plasma fibronectin, collagen type IV, and plasminogen. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, n.7, p.4826-4834, 2012.

HAUK, P.; CARVALHO, E.; HO, P. L. Expression and purification of the non-tagged LipL32 of pathogenic *Leptospira*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** , v.44, n.4, p.297-302, 2011.

HORTON, J.; HOLDEN, C.; WARD, P.; MACDONALD, D.; SANDERSON, A. Exploitation of phylogenetic distance in cell surface immune labeling studies with b2-microglobulin **Journal of Investigative Dermatology**. v. 85, p. 96–99, 1984

IKEMORI, Y.; PERALTA, R. C.; KUROKI, M.; YOKOYAMA, H.; KODAMA, Y. Research note: avidity of chicken yolk antibodies to enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae. **Poultry Science,** v.72, n.12, p.2361-2365, 1993.

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

JOST, B. H.; ADLER, B.; VINH, T.; FAINE, S. A monoclonal antibody reacting with a determinant on leptospiral lipopolysaccharide protects guinea pigs against leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.22, n.3, p.269-275, 1986.

KO, A. I.; GOARANT, C.; PICARDEAU, M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Review in Microbiology**, v.7, n.10, p.736-747, 2009.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review Food Science Technology**, v.3, p.163-182, 2012.

LeCLAIRE, R. D.; HUNT, R. E.; BAVARI, S. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. **Infection and Immunity.**, v.70, n.5, p.2278-2281, 2002.

LEE, K.; KIM, H.; SHIN, E.; KIM, Y.; CHANG, S.; CHOI, J. Validity of measles immunization certificates submitted upon enrollment in an elementary school in Korea. **Jornal of Preventive Medicine and Public Health**, v.42, n.2, p.104-108, 2009.

LEVETT, P. N. Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews,**v.14, n.2, p.296-326, 2001.

LEVETT, P. N. Usefulness of serologic analysis as a predictor of the infecting serovar in patients with severe leptospirosis. **Clinical Infectious Diseases.***,* v.36, n.4, p.447-452, 2003.

LEVETT, P. N.; BRANCH, S. L.; WHITTINGTON, C. U.; EDWARDS, C. N.; PAXTON, H. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** *,* v.8, n.2, p.349-351, 2001.

LIN, Y. P.; LEE, D. W.; MCDONOUGH, S. P.; NICHOLSON, L. K.; SHARMA, Y.; CHANG, Y. F. Repeated domains of *Leptospira* immunoglobulin-like proteins interact with elastin and tropoelastin. **Journal of Biological Chemistry** *,* v.284, n.29, p.19380-19391, 2009.

LUCAS, D. S.; CULLEN, P. A.; LO, M.; SRIKRAM, A.; SERMSWAN, R. W.; ADLER, B. Recombinant LipL32 and LigA from *Leptospira* are unable to stimulate protective immunity against leptospirosis in the hamster model. **Vaccine***,* v.29, n.18, p.3413-3418, 2011.

MASUZAWA, T.; SUZUKI, R.; YANAGIHARA, Y. Protective activity of rabbit polyclonal anti-idiotype antibody against *Leptospira interrogans* infection in hamsters. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** *,* v.19, n.4, p.613-615, 1996.

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. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology***,* v.49, n.4, p.929-945, 2003.

MATSUNAGA, J.; MEDEIROS, M. A.; SANCHEZ, Y.; WERNEID, K. F.; KO, A. I. Osmotic regulation of expression of two extracellular matrix-binding proteins and a haemolysin of *Leptospira interrogans*: differential effects on LigA and Sph2 extracellular release. **Microbiology***,* v.153, n.Pt 10, p.3390-3398, 2007.

McBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, D. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases***,* v.18, n.5, p.376-386, 2005.

McBRIDE, A. J.; SANTOS, B. L.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; HARTSKEERL, R. A.; REIS, M. G.; KO, A. I. Evaluation of four whole-cell *Leptospira*-based serological tests for diagnosis of urban leptospirosis. **Clinical and Vaccine Immunology** *,* v.14, n.9, p.1245-1248, 2007.

MIDWINTER, A.; FAINE, S.; ADLER, B. Vaccination of mice with lipopolysaccharide (LPS) and LPS-derived immuno-conjugates from *Leptospira interrogans*. **Journal of Medical Microbiology***,* v.33, n.3, p.199-204, 1990.

MURRAY, G. L.; SRIKRAM, A.; HOKE, D. E.; WUNDER, E. A., JR.; HENRY, R.; LO, M.; ZHANG, K.; SERMSWAN, R. W.; KO, A. I.; ADLER, B. Major surface protein

LipL32 is not required for either acute or chronic infection with *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity***,* v.77, n.3, p.952-958, 2009.

PALANIAPPAN, R. U.; RAMANUJAM, S.; CHANG, Y. F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. **Current Opinion in Infectious Diseases.***,* v.20, n.3, p.284-292, 2007.

PARK, H. S.; PARK, K. I.; NAGAPPAN, A.; LEE, D. H.; KANG, S. R.; KIM, J. A.; KIM, E. H.; HAN, D. Y.; KIM, G. S. Proteomic analysis of effects on natural herb additive containing immunoglobulin Yolksac (IgY) in pigs. **The American Journal of Chinese Medicine** ., v.39, n.3, p.477-488, 2011.

PICARDEAU, M.; BRENOT, A.; SAINT, G., I. First evidence for gene replacement in *Leptospira* spp. Inactivation of *L. biflexa* flaB results in non-motile mutants deficient in endoflagella. **Molecular Microbiology***,* v.40, n.1, p.189-199, 2001.

PICARDEAU, M.; BULACH, D. M.; BOUCHIER, C.; ZUERNER, R. L.; ZIDANE, N.; WILSON, P. J.; CRENO, S.; KUCZEK, E. S.; BOMMEZZADRI, S.; DAVIS, J. C.; MCGRATH, A.; JOHNSON, M. J.; BOURSAUX-EUDE, C.; SEEMANN, T.; ROUY, Z.; COPPEL, R. L.; ROOD, J. I.; LAJUS, A.; DAVIES, J. K.; MEDIGUE, C.; ADLER, B. Genome sequence of the saprophyte *Leptospira biflexa* provides insights into the evolution of *Leptospira* and the pathogenesis of leptospirosis. **PLoS One.***,* v.3, n.2, p.e1607, 2008.

POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; VAN REGENMORTEL, M. H. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. **Immunology Communication***,* v.9, n.5, p.475-493, 1980.

REIS, R. B.; RIBEIRO, G. S.; FELZEMBURGH, R. D.; SANTANA, F. S.; MOHR, S.; MELENDEZ, A. X.; QUEIROZ, A.; SANTOS, A. C.; RAVINES, R. R.; TASSINARI, W. S.; CARVALHO, M. S.; REIS, M. G.; KO, A. I. Impact of environment and social gradient on *Leptospira* infection in urban slums. **PLoS.NeglectTropical Disease.***,* v.2, n.4, p.e228, 2008.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; DA CRUZ MCBRIDE, F. W.; FIGUEIRA, C. P.; HUERRE, M.; AVE, P.; GIRONS, I. S.; KO, A. I.; PICARDEAU, M. The OmpA-like protein Loa22 is essential for leptospiral virulence. **PLoS Pathogens***,* v.3, n.7, p.e97, 2007.

RISTOW, P.; BOURHY, P.; KERNEIS, S.; SCHMITT, C.; PREVOST, M. C.; LILENBAUM, W.; PICARDEAU, M. Biofilm formation by saprophytic and pathogenic leptospires. **Microbiology***,* v.154, n.Pt 5, p.1309-1317, 2008.

SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R. 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** *,* v.33, n.2, p.129-154, 2005.

SCHADE, R.; HLINAK, A. Egg Yolk Antibodies, State of the Art and Future Prospects. **ALTEX.***,* v.13, n.5, p.5-9, 1996.

SEGURA, E. R.; GANOZA, C. A.; CAMPOS, K.; RICALDI, J. N.; TORRES, S.; SILVA, H.; CESPEDES, M. J.; MATTHIAS, M. A.; SWANCUTT, M. A.; LOPEZ, L. R.; GOTUZZO, E.; GUERRA, H.; GILMAN, R. H.; VINETZ, J. M. Clinical spectrum of pulmonary involvement in leptospirosis in a region of endemicity, with quantification of leptospiral burden. **Clinical Infectious Diseases.**, v.40, n.3, p.343-351, 2005.

SEHGAL, S. C.; BISWAS, D.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; ROY, S. Molecular tools in leptospirosis diagnosis and characterization of isolates. **Southeast Asian Journal of Tropical Medice and Public Health**, v.34 Suppl 2, p.163-169, 2003a.

SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SHARMA, S.; SUGUNAN, A. P. LEPTO Dipstick: a rapid and simple method for serodiagnosis of acute leptospirosis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** v.93, n.2, p.161-164, 1999.

SEHGAL, S. C.; VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; UMAPATHI, T. Field application of Lepto lateral flow for rapid diagnosis of leptospirosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, n.10, p.897-901, 2003b.

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

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

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

SMITS, H. L.; ANANYINA, Y. V.; CHERESHSKY, A.; DANCEL, L.; LAI, A. F. R.; CHEE, H. D.; LEVETT, P. N.; MASUZAWA, T.; YANAGIHARA, Y.; MUTHUSETHUPATHI, M. A.; SANDERS, E. J.; SASAKI, D. M.; DOMEN, H.; YERSIN, C.; AYE, T.; BRAGG, S. L.; GUSSENHOVEN, G. C.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A. International multicenter evaluation of the clinical utility of a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human serum specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.9, p.2904-2909, 1999.

STEVENSON, B.; CHOY, H. A.; PINNE, M.; ROTONDI, M. L.; MILLER, M. C.; DEMOLL, E.; KRAICZY, P.; COOLEY, A. E.; CREAMER, T. P.; SUCHARD, M. A.; BRISSETTE, C. A.; VERMA, A.; HAAKE, D. A. *Leptospira interrogans* endostatin-like outer membrane proteins bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS One.**, v.2, n.11, p.e1188, 2007.

SUN, S.; MO, W.; JI, Y.; LIU, S. Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** *,* v.15, n.9, p.708-712, 2001.

TESAR, D. B.; CHEUNG, E. J.; BJORKMAN, P. J. The chicken yolk sac IgY receptor, a mammalian mannose receptor family member, transcytoses IgY across polarized epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell** *,* v.19, n.4, p.1587-1593, 2008.

TRUCCOLO, J.; SERAIS, O.; MERIEN, F.; PEROLAT, P. Following the course of human leptospirosis: evidence of a critical threshold for the vital prognosis using a quantitative PCR assay. **FEMS Microbiology Letters.***,* v.204, n.2, p.317-321, 2001.

TRUEBA, G.; ZAPATA, S.; MADRID, K.; CULLEN, P.; HAAKE, D. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International Microbiology***,* v.7, n.1, p.35-40, 2004.

VASCONCELLOS, F. A.; COUTINHO, M. L.; DA SILVA, E. F.; FERNANDES, C. P.; MONTE, L. G.; SEYFFERT, N.; DELLAGOSTIN, O. A.; ALEIXO, J. A. Testing different antigen capture ELISA formats for detection of Leptospira spp. in human blood serum. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.104, n.4, p.259-264, 2010.

VASCONCELLOS, L. C.; RIBEIRO, F. S. [Epidemiological research, operational planning, and intervention measures in workers' health]. **Cadernos de Saude Publica***,* v.13, n.2, p.269-275, 1997.

VIJAYACHARI, P.; SUGUNAN, A. P.; SHRIRAM, A. N. Leptospirosis: An emerging global public health problem**. Journal of Biosciences**, v.33, n.4, p.557-569, 2008.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today***,* v.16, n.8, p.392-398, 1995.

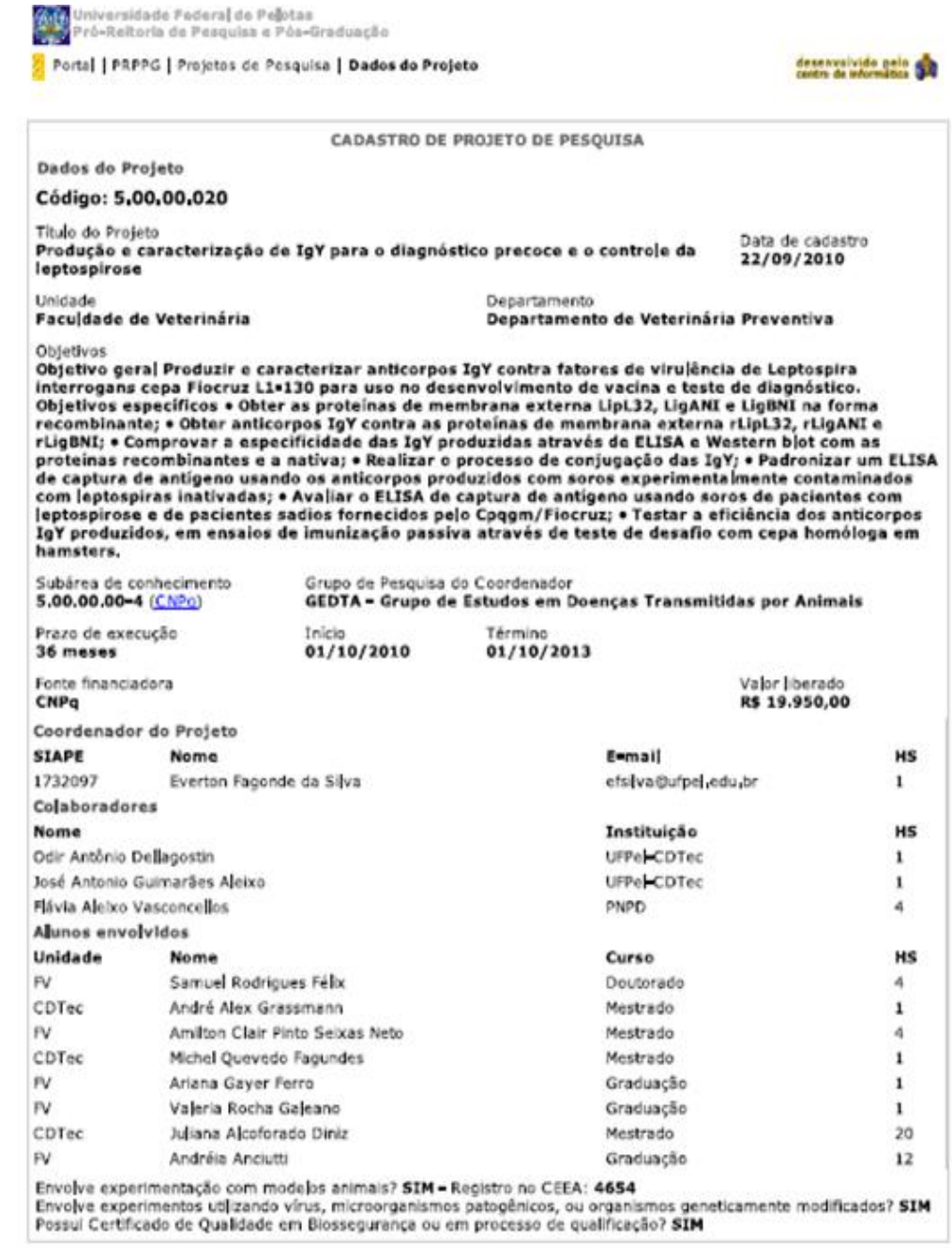
WOOLEY, J.A., LANDON, J.,. Comparison of antibody production to human interleukine-6 (I-L6) by sheep and chickens. **Journal of Immunological Methods** v. 178, p.253–265, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. **WHO Library Cataloguing-in-Publication.** Malta, 2003. 122p.

ZHANG, W. W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today***,* v.8, n.8, p.364-371, 2003.

ANEXOS

Anexo A – Número de cadastro do projeto no COCEPE e código da CEEA



Universidade Federal de Pelotas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Portal | PRPPG | Projetos de Pesquisa | **Dados do Projeto**

desenvolvido pelo centro de informática

CADASTRO DE PROJETO DE PESQUISA

Dados do Projeto

Código: 5.00.00.020

Título do Projeto
Produção e caracterização de IgY para o diagnóstico precoce e o controle da leptospirose

Data de cadastro
22/09/2010

Unidade
Faculdade de Veterinária

Departamento
Departamento de Veterinária Preventiva

Objetivos
Objetivo geral Produzir e caracterizar anticorpos IgY contra fatores de virulência de Leptospira interrogans cepa Fiocruz L1-130 para uso no desenvolvimento de vacina e teste de diagnóstico. Objetivos específicos • Obter as proteínas de membrana externa LipL32, LigANI e LigBNI na forma recombinante; • Obter anticorpos IgY contra as proteínas de membrana externa rLipL32, rLigANI e rLigBNI; • Comprovar a especificidade das IgY produzidas através de ELISA e Western blot com as proteínas recombinantes e a nativa; • Realizar o processo de conjugação das IgY; • Padronizar um ELISA de captura de antígeno usando os anticorpos produzidos com soros experimentalmente contaminados com leptospiras inativadas; • Avaliar o ELISA de captura de antígeno usando soros de pacientes com leptospirose e de pacientes sadios fornecidos pelo Cpqgm/Fiocruz; • Testar a eficiência dos anticorpos IgY produzidos, em ensaios de imunização passiva através de teste de desafio com cepa homóloga em hamsters.

Subárea de conhecimento
5.00.00.00-4 (CNPq)

Grupo de Pesquisa do Coordenador
GEDTA – Grupo de Estudos em Doenças Transmitidas por Animais

Prazo de execução
36 meses

Início
01/10/2010

Término
01/10/2013

Fonte financiadora
CNPq

Valor liberado
R$ 19.950,00

Coordenador do Projeto

SIAPE	Nome	E-mail	HS
1732097	Everton Fagonde da Silva	efsilva@ufpel.edu.br	1

Colaboradores

Nome	Instituição	HS
Odir Antônio Dellagostin	UFPel-CDTec	1
José Antonio Guimarães Aleixo	UFPel-CDTec	1
Flávia Aleixo Vasconcellos	PNPD	4

Alunos envolvidos

Unidade	Nome	Curso	HS
FV	Samuel Rodrigues Félix	Doutorado	4
CDTec	André Alex Grassmann	Mestrado	1
FV	Amilton Clair Pinto Seixas Neto	Mestrado	4
CDTec	Michel Quevedo Fagundes	Mestrado	1
FV	Ariana Gayer Ferro	Graduação	1
FV	Valeria Rocha Galeano	Graduação	1
CDTec	Juliana Alcoforado Diniz	Mestrado	20
FV	Andréia Anciutti	Graduação	12

Envolve experimentação com modelos animais? **SIM** – Registro no CEEA: **4654**
Envolve experimentos utilizando vírus, microorganismos patogênicos, ou organismos geneticamente modificados? **SIM**
Possui Certificado de Qualidade em Biossegurança ou em processo de qualificação? **SIM**