

## DESENVOLVIMENTO DE IMUNÓGENO CONJUGADO DE LIPOPOLISSACARÍDEO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E TOXÓIDE TETÂNICO

Bruno Gavinho<sup>1</sup>, Rosangela Rodrigues dos Santos<sup>2</sup>, Luiz Felipe Caron<sup>1</sup>, Maria Rita Sierakowski<sup>1</sup>, Lucy Ono<sup>1</sup>

<sup>1</sup> UFPR

<sup>2</sup> CDME-SEAB-PR

Correspondência: Lucy Ono: lucy\_ono2003@yahoo.com.br

**RESUMO:** O lipopolissacarídeo (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa* foi conjugado ao toxóide tetânico (TT, toxina inativada do *Clostridium tetani*) utilizando a técnica de aminação redutiva direta, para o desenvolvimento de uma vacina conjugada (LPS-TT). Avaliou-se a resposta imune *in vivo* após aplicações intraperitoneais do imunógeno LPS-TT em camundongos Swiss, administrando-se 4 aplicações de LPS-TT com intervalos entre as doses de 14 dias. Avaliou-se o título de anticorpos anti-*Pseudomonas* produzidos pela técnica de soroaglutinação microscópica. Os grupos que foram imunizados com LPS-TT e com LPS+TT (não conjugado quimicamente) apresentaram resposta de anticorpos aglutinantes superior ao controle imunizado apenas com LPS, e a resposta após o reforço vacinal dos animais imunizados com o conjugado LPS-TT foi 567% superior ao dos animais imunizados com LPS.

**Palavras-chave:** aminação redutiva; imunização; soroaglutinação; vacina conjugada

## DEVELOPMENT OF A CONJUGATED IMMUNOGEN OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* LIPOPOLYSACCHARIDE AND TETANUS TOXOID

**ABSTRACT:** The lipopolysaccharide (LPS) from *Pseudomonas aeruginosa* was conjugated to tetanus toxoid (TT, inactivated toxin from *Clostridium tetani*) using the direct reductive amination technique, to develop a conjugate vaccine (LPS-TT). The immune response was evaluated *in vivo* after intraperitoneal injections of the immunogen LPS-TT in Swiss mice, by administration of 4 injections of LPS-TT with the time between applications being 14 days. The title of anti-*Pseudomonas* antibodies was evaluated by microscopic seroagglutination test. The groups which were immunized with LPS-TT and LPS+TT (non-chemically conjugated) presented a response of agglutinating antibodies higher than the control immunized with LPS only, and the booster response of the animals immunized with the conjugate LPS-TT was 567% higher than in the animals immunized with LPS.

**Key Words:** reductive amination; immunization; seroagglutination; conjugate vaccine

## INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa ubíqua, encontrada em águas frescas e no solo (Döring e Pier, 2008). Está apta a colonizar uma grande diversidade de nichos, e é uma das principais fontes de infecções nosocomiais, juntamente com os estafilococos coagulase-negativos, como *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. Contaminações ocorrem a partir de fontes comuns como respiradores, umidificadores, reservatórios de água e alimentos, assim como transmissões por contato direto nas Unidades de Tratamento Intensivo (Kerr e Snelling, 2009).

É um clássico patógeno oportunista, que normalmente não representa ameaça ao indivíduo imunocompetente, sendo eliminando através de opsonização e fagocitose. Porém, pacientes hospitalizados, como transplantados e pacientes com queimaduras extensas são um grupo altamente susceptível à infecção por *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2000).

Na saúde animal, a bactéria já foi identificada em diversas manifestações clínicas, em mamíferos e aves. Nos cães, *P. aeruginosa* é uma causa comum de pioderma, otites média e externa, e infecções do trato urinário (Gatoria *et al.*, 2006; Hariharam *et al.*, 2006; Hillier *et al.*, 2006). Hawkins *et al.* (2010) afirmam que clínicos de pequenos animais possuem pouco sucesso em casos de otite, até mesmo quando agentes antimicrobianos são sensíveis à estirpe. A espécie é um dos patógenos mais isolados de otoscópios após exames clínicos em cães, mesmo após o processo de desinfecção com amônias quaternárias. O instrumento comporta-se como vetor para transmissão em animais saudáveis (Kirby *et al.*, 2010). Westgate *et al.* (2011) estudaram as populações de patógenos isolados de feridas crônicas

de equinos, sendo a *P. aeruginosa* a espécie mais isolada de feridas cirúrgicas. Estes tecidos teriam difícil cicatrização, pela produção de biofilmes destes patógenos. Infecções já foram relatadas na avicultura, resultando em alta mortalidade e septicemia (Monotani *et al.*, 1995).

Além disso, para os pacientes humanos portadores de fibrose cística, nos quais há uma mutação no gene *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) que codifica uma proteína transmembrana ligada a canais de cloro, há prejuízo do transporte de sais e água das células da via respiratória (Bobadilla *et al.*, 2002), o que resulta no acúmulo de muco espesso, dificultando a eliminação de bactérias dos pulmões. Episódios recorrentes de infecção e inflamação, como as causadas pela *P. aeruginosa* levam à destruição do tecido pulmonar.

*P. aeruginosa* possui resistência intrínseca a diversas classes de antibióticos, limitando as opções terapêuticas. A resistência a uma mesma classe de antibióticos pode ser mediada por vários mecanismos (Kerr e Snelling, 2009). Embora antibióticos estejam disponíveis, a capacidade da bactéria em desenvolver multirresistência a compostos químicos compromete o tratamento de pacientes. Como casos de multirresistência a drogas são cada vez mais relatados (Engels e Balachandran, 2009), isso indica a importância do desenvolvimento de vacinas eficazes. Leitner e Krifucks (2007) Sugerem que a vacinação de bovinos com produto inativado pode reduzir infecções por *P. aeruginosa*.

A indução de anticorpos contra estruturas de membrana da *P. aeruginosa* é T-independente, pelo fato dos antígenos induzirem a produção de anticorpos por uma via independente de linfócitos T-auxiliares, não ativando células B para geração de memória. Antígenos T-independentes são

geralmente moléculas grandes, com múltiplas repetições de subunidades, como os lipídeos e carboidratos da membrana externa de bactérias Gram-negativas. A geração de memória imunológica pode ser induzida quando antígenos são transformados em T-dependentes, pela sua conjugação com uma proteína. Esta resposta imune, que envolve o conjugado polissacarídeo-proteína, tem início no momento da captura deste complexo por células dendríticas. Estas células, ao dirigirem-se para os tecidos linfóides secundários, internalizam o conjugado, degradando-os em peptídeos, e expondo-os ao complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), para interação com células T específicas (Plotkin e Orenstein, 2003).

Baseando-se nas pesquisas com vacinas conjugadas, este trabalho avaliou a conjugação do lipopolissacarídeo de *Pseudomonas aeruginosa*, um antígeno T-independente com toxóide tetânico (neurotoxina quimicamente inativada de *Clostridium tetani*), um antígeno T-dependente, por meio de aminação redutiva direta, visando a obtenção de memória imunológica contra o lipopolissacarídeo de *P. aeruginosa*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção de *Pseudomonas aeruginosa*

Utilizou-se a *Pseudomonas aeruginosa*, cepa 27853. Para a confirmação da espécie, colônias foram semeadas em ágar Cetrimida e foram realizadas provas bioquímicas para identificação de bactérias Gram-negativas não-fermentadoras.

Para a produção de massa bacteriana (a ser utilizada para a extração de LPS), a bactéria foi cultivada em ágar Sangue, a 37°C, por 24 horas. Para tanto, cada placa de ágar utilizada para produção da bactéria

recebeu um inóculo de 1 mL do tubo 0,5 da escala de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia). Após o crescimento, foram realizadas suspensões (solução NaCl 0,85%) de cada meio, centrifugadas a 3220g, por 20 minutos, a 8°C. Após o procedimento, o conteúdo centrifugado passou por duas lavagens com água destilada, e foi novamente centrifugado.

Para a inativação química, uma suspensão das colônias em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada foi preparada e inativada com formaldeído 37%, 1:5000 (v/v), por 24 horas a 8°C. A confirmação da inativação foi observada pela ausência de crescimento quando uma amostra da suspensão foi semeada e incubada a 37°C por 24h.

### Extração de lipopolissacarídeo

A extração de LPS de *P. aeruginosa* foi realizada segundo protocolo adaptado de Westphal e Jann (1965). Para extração, foram utilizados 352 mg de *Pseudomonas aeruginosa* ( $336 \times 10^{13}$  UFC). A suspensão bacteriana foi misturada com solução de fenol a 90% e água destilada (350 mL, 65°C), sob agitação, por 15 minutos. Em seguida centrifugou-se a suspensão a 2630g, a 10°C, durante 40 minutos. Coletou-se o sobrenadante, tratando novamente as frações restantes com água quente, repetindo o processo mais duas vezes. Após extração, o sobrenadante coletado foi dialisado contra água destilada, realizando-se trocas periódicas, por 4 dias.

### Conjugação do LPS ao toxóide tetânico

Para a conjugação do LPS de *P. aeruginosa* com o toxóide tetânico (TT), foi utilizada a técnica de aminação redutiva direta, adaptado de Shen *et al.* (2001), em que o meta-periodato de sódio produz grupamentos aldeídos. O reagente TT foi gentilmente cedido pelo TECPAR, Curitiba - PR. Dissolveram-se 10 mg de LPS em 20 ml de água destilada, adicionado de 4 mM de meta-

Periodato de Sódio ( $\text{NaIO}_4$ ) sob agitação, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, durante 1,5 h. Em seguida, foi adicionado etileno-glicol mantendo a solução por mais 30 minutos nas mesmas condições. O material foi então dialisado contra água destilada por 3 dias, em temperatura ambiente.

Após diálise foi adicionado bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) 0,1 M e o pH ajustado para 8,5; em seguida solubilizaram-se 3,9 mg de toxóide tetânico (TT), e finalmente adicionaram-se 20 mg/mL de cianoborohidreto de Sódio ( $\text{NaCNBH}_4$ ) sob agitação leve, ao abrigo da luz, a temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , por 5 dias. Após o tempo de incubação, 10 mg/mL de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) foram solubilizados e deixou-se a solução em temperatura ambiente por 18 h. Por final a solução foi dialisada contra água destilada por 4 dias, com duas trocas diárias de água.

#### **Análises do LPS, TT e do imunoconjugado LPS-TT**

As dosagens de açúcar (AT) e de proteína (PT) totais foram realizadas pelo método de Dubois *et al.* (1956) e pelo método de Bradford (1976), respectivamente. Para a avaliação da reação de conjugação, as amostras de LPS, TT e de imunoconjugado LPS-TT foram aplicadas separadamente em coluna de gel-permeação de Sepharose CL-4B, de 84 cm de altura com 1 cm de diâmetro, eluídas com solução salina ( $\text{NaCl}$  0,85%) e alíquotas de 3 mL foram coletadas para dosagens de AT e PT, construindo-se os perfis de eluição. A sefarose é uma matriz utilizada para produtos de massa molar de 60 – 20.000 kDa para proteína, e 30 – 5.000 kDa para açúcares. Utilizou-se o corante azul de dextrana para determinação de volume morto. Como controle, eluíram-se cinco soluções dextroses-padrões de 10 mg, variando a massa molar de 71,6 - 2.000 kDa.

#### **Avaliação da resposta imune por meio da imunização experimental em camundongos**

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, com idade entre 3 e 5 semanas. Os animais foram tratados com ração própria para camundongos e água filtrada *ad libitum*.

Os animais foram divididos em 4 grupos, com 6 camundongos cada, considerando o LPS como controle, e avaliou-se a resposta de LPS+TT (não conjugados), além do LPS-TT (imunógeno conjugado): Grupo 1 (controle solução  $\text{NaCl}$  0,85%); Grupo 2 (Controle LPS 20  $\mu\text{g}/\text{dose}$ ); Grupo 3 (LPS 20  $\mu\text{g}/\text{dose}$  + TT) e Grupo 4 (LPS-TT 20  $\mu\text{g}/\text{dose}$ ).

Todos os controles e amostras foram adjuvados com gel de hidróxido de alumínio 1,5%. O protocolo considerou aplicações com intervalos de duas semanas, totalizando quatro doses/animal, e quatro semanas após a última aplicação foram realizadas 7 coletas de sangue (via retro-orbital), em intervalos de ~4 semanas.

#### **Titulação de anticorpos**

A titulação dos anticorpos anti-*Pseudomonas* foi realizada pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM) em lâmina adaptada de Laborde e Fajardo (1969). O antígeno foi preparado com a suspensão de uma cultura de *P. aeruginosa* (cepa ATCC 27853) em solução salina ( $\text{NaCl}$  0,85%) até atingir opacidade equivalente na escala 10 de Mc Farland a  $3 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ .

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

a maior diluição da amostra onde ocorre reação positiva.

### Eutanásia

Todo procedimento de eutanásia foi realizado sob protocolo de anestesia com cloridrato de xilazina 2% e cloridrato de quetamina 10% (1:1) via intraperitoneal seguido de exossanguese ou injeção de cloreto de potássio 10%, via intracardíaca.

### Análise estatística

Para avaliar a diferença significativa entre os títulos de anticorpos dos grupos teste e controle inoculado apenas com LPS  $\mu\text{g}/\text{dose}$  (grupo G2), foi aplicado o teste H não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn-Bonferroni, com  $P < 0,01$  para comparações múltiplas entre os grupos experimentais (2 a 2).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho, utilizou-se o lipopolissacarídeo (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa* para a síntese do imunocombinado carboidrato-proteína por ser o componente mais imunogênico de bactérias Gram-negativas, apesar de ser pirogênico dependendo da dose (Holder, 2004).

Para extração do LPS foram utilizados 352 mg de *Pseudomonas aeruginosa* ( $336 \times 10^{13}$  UFC), e, considerando o produto final da extração, a execução do protocolo adaptado de Shen *et al.* (2001) apresentou rendimento de 2,8%, comparável aos resultados já descritos por Santos *et al.* (2009), que extraíram LPS com rendimento de 1,5%. Al-Zeer *et al.* (2007) citam valores de rendimento de extração de LPS entre 2-4%. Cryz *et al.* (1986) conjugaram LPS a toxóide tetânico (TT), mas não citaram valores de rendimento. O princípio da extração de LPS de bactérias com o protocolo fenol-água quente utiliza a capacidade do fenol em desnaturar as proteínas das células, e assim romper a

ligação do lipopolissacarídeo com a membrana externa (dissociação do antígeno somático O). O LPS e os ácidos nucleicos preservados são coletados no sobrenadante de extração, após dissociação do complexo antígeno somático (polissacarídeo O) da parede bacteriana (Westphal e Jann, 1965).

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

Foram realizadas dosagens de açúcar (AT) e de proteína (PT) totais para a caracterização química inicial de LPS e do imunocombinado sintetizado LPS-TT, determinando-se para LPS as concentrações de AT: 549,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e PT: 40,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; para o imunocombinado LPS-TT de AT: 125,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e PT: 184,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Já a cromatografia de gel-permeação de LPS, TT e LPS-TT foi realizada para a comprovação da produção do imunocombinado LPS-TT após a reação de aminação redutiva, pois por esta técnica, as moléculas eluem em volumes diferentes por uma coluna contendo matriz apropriada, de acordo com sua massa molecular. Em relação à eluição do LPS, a Figura 1 permite identificar 2 picos de detecção maior, seguido de vários menores, sugerindo que a maior parte do LPS tenha sido eluída a ~ 10 e 50 mL. Sabe-se que o LPS de *Pseudomonas aeruginosa* pode apresentar diferentes massas moleculares, dependendo do número de porções sacarídeas no polissacarídeo O (Ag-O) (Goldberg e Pier, 1996). Portanto, é possível que os outros picos

sejam resultado da eluição de frações de LPS que sofreram hidrólise durante a extração, ou seja, porções de LPS com número reduzido de resíduos de açúcar, em comparação com as frações eluídas em volumes menores. O TT apresentou distribuição regular, com pico definido em ~ 40 mL, indicando boa homogeneidade da amostra.

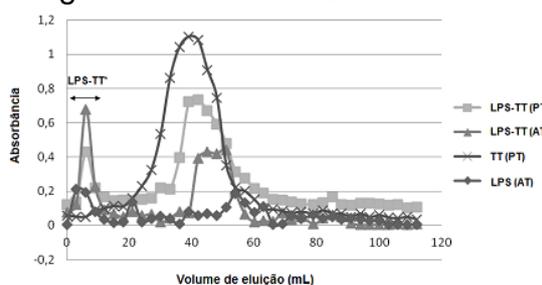


Figura 1 - Perfis de eluição de açúcar total (AT,  $\lambda = 490$  nm) e de proteína total (PT,  $\lambda = 540$  nm) do lipopolissacarídeo (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa*, do toxóide tetânico (TT) e do conjugado LPS-TT após aplicação em coluna de gel-permeação (Sephacrose Cl-4B, h: 84 cm,  $\varnothing = 1$  cm, eluente: NaCl 0,85%). O volume morto da coluna, desconsiderado para a construção do gráfico, foi de 22 mL. \*A seta indica a faixa de volume de eluição que provavelmente contém LPS e TT ligados covalentemente.

A Figura 1 também mostra a eluição do açúcar e proteína totais do imunoconjugado LPS-TT. A sobreposição dos 2 perfis de eluição sugere que o primeiro pico do açúcar e da proteína totais, ambos em torno de 10 mL, representem a maior quantidade de LPS conjugado ao toxóide. Esta hipótese se baseia na diferença de volumes de eluição: o LPS-TT possui massa molar maior que o do TT e LPS separados, logo, acaba sendo eluído antes destes (o TT foi eluído aos 40 mL). Os demais picos de detecção de cada curva sugerem a eluição do TT ou do LPS. Também é possível que estes demais picos apresentem LPS conjugado, mas é possível também que representem LPS ou TT parcialmente degradados durante a reação de conjugação.

Em relação à imunização, todos os animais, com exceção do Grupo 1 (animais inoculados com o veículo NaCl 0,85%), apresentaram sinais de hipertermia e prostração dois dias após a aplicação dos imunógenos.

Houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,01$ ) entre o Grupo 2 (Controle LPS 20  $\mu\text{g}/\text{dose}$ ) e o Grupo 3 (Controle LPS 20  $\mu\text{g}/\text{dose}$  + 29,4  $\mu\text{g}/\text{dose}$  de TT), com o Grupo 3 apresentando título de anticorpos anti-*Pseudomonas aeruginosa* 177% superior ao do controle, bem como entre o Grupo 2 e o Grupo 4 (Conjugado LPS-TT 20  $\mu\text{g}/\text{dose}$ ), com o Grupo 4 apresentando título 362% superior ao do controle, na 16ª semana após a imunização, mantendo-se nas 23ª e 32ª semanas (Tab. 1 e 2, Fig. 2). Na 41ª semana (4 semanas após a aplicação do reforço vacinal), o Grupo 4, que representa o imunoconjugado apresentou título de soroaglutinação 567% superior ao Grupo 2.

Tabela 1 – Resultados do teste de Kruskal-Wallis para comparação dos valores médios dos títulos de soroaglutinação dos grupos independentes G2, G3 e G4 nas diferentes semanas após a imunização.

Nº de semanas após a imunização	Valor de P
4	0,8619
8	0,4478
16	0,0038*
23	0,0052*
32	0,0049*
36	1,0000
41	0,0080*

\*Diferença estatisticamente significativa;  $P < 0,01$ .

Tabela 2 – Resultados do teste de Dunn-Bonferroni para a comparação dos títulos médios de soroaglutinação dos grupos experimentais (G3 e G4) em relação ao controle (G2).

Nº de semanas após a imunização	Comparação (2 a 2)	d. ms. <sup>1</sup>	Intervalo de confiança de contraste (99%)	Significância
16	G2xG3	8,882717	(0,317283; 18,08272)	*
16	G2xG4	8,504554	(10,29545; 27,30455)	*
23	G2xG3	8,882717	(3,117283; 20,88272)	*
23	G2xG4	8,504554	(3,762112; 20,77122)	*
32	G2xG3	7,804966	(0,195034; 15,80497)	*
32	G2xG4	8,278417	(4,121583; 20,67842)	*
41	G2xG3	6,918363	(-6,918363; 6,918363)	d.n.s. <sup>2</sup>
41	G2xG4	7,472686	(37,86065; 52,80602)	*

<sup>1</sup>Diferença mínima significativa; \*Diferença estatisticamente significativa;  $P < 0,01$ ; <sup>2</sup>Diferença não significativa.

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

memória, mimetizando uma resposta imunológica a uma proteína (Frasch, 2009).

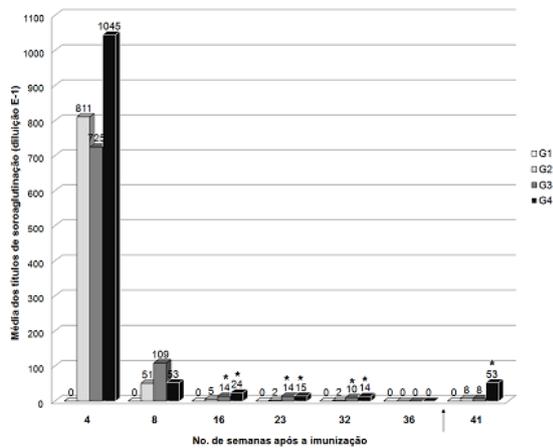


Figura 2 – Determinação dos títulos de soroaglutinação das amostras G1 (controle NaCl 0,85%), G2 (Controle LPS 20 µg/dose), G3 (Controle LPS 20 µg/dose + 29,4 µg/dose de TT) e G4 (Conjugado LPS-TT 20 µg/dose), todos adjuvados com gel de hidróxido de alumínio, coletados 4, 8, 16, 23, 32, 36 e 41 semanas após a imunização. A seta indica que o reforço vacinal foi aplicado na 37ª semana. \*Diferença estatisticamente significativa em relação a G2, P<0,01.

Considerando a resposta pós-reforço vacinal de LPS-TT, as diferenças de títulos de soroaglutinação obtidos indicam a presença de resposta anamnésica (resposta imune maior e mais rápida), sugerindo que as moléculas foram aderidas ao MHC-II, para reagirem com linfócitos T. Provavelmente, isto só seria possível se o LPS estivesse covalentemente ligado a um carreador proteico. Algumas hipóteses poderiam justificar por que o título de soroaglutinação pós-reforço vacinal não foi elevado, como uma baixa proporção açúcar-proteína, diminuindo a exposição destes antígenos ao MHC-II. Devido a vários picos de menor amplitude após a eluição do LPS, a Figura 1 sugere presença de moléculas de LPS degradado.

Vários métodos foram estudados para prevenção de infecções por *P. aeruginosa*, incluindo imunização passiva, com anticorpos policlonais e monoclonais, e imunização ativa, através de vacinas. Reconhecida como uma excelente alternativa à antibioticoterapia, pesquisas envolvendo

vacinas são desenvolvidas para prevenção das infecções. Vacinas para *P. aeruginosa* são estudadas há mais de 30 anos, embora o progresso seja lento. De acordo com Döring (2010), diversas razões justificam a falta de progresso no desenvolvimento de uma vacina adequada para a espécie: 1) dificuldade em testar um produto em pacientes que utilizam um pesado protocolo de antibioticoterapia, 2) mecanismos defectivos na imunidade de portadores de fibrose cística e 3) pequena população de portadores de fibrose cística, tornando esses estudos de difícil realização.

Pesquisas envolvendo o uso de vacinas conjugadas já foram realizadas para *P. aeruginosa*, embora nenhum produto encontre-se disponível para uso. Cryz *et al.* (1986) conjugaram o antígeno alginato da espécie com exotoxina A. Este conjugado induziu alta resposta de anticorpos contra alginato e exotoxina A em coelhos. As imunoglobulinas promoveram opsonização e neutralização de cepas mucóides de *P. aeruginosa*, com resposta de neutrófilos. Kashef *et al.* (2006) conjugaram alginato ao toxóide tetânico, conferindo proteção em camundongos contra uma dose letal de *P. aeruginosa*. Cryz *et al.* (1989) desenvolveram um conjugado octavalente do Antígeno O (envolvendo os oito sorotipos mais frequentes) à exotoxina A. Esta vacina, chamada Aerugen<sup>TM1</sup>, conferiu proteção significativa após aplicação intramuscular em animais. Após a aplicação, estes foram desafiados com cepas de *P. aeruginosa* contidas na vacina. Também houve desafio intranasal com o conjugado, porém não se admitiu maior proteção por esta via. A vacina entrou em testes clínicos (fase 2), mas em 2006 os testes duplo-cegos

<sup>1</sup>Fabricante Crucell NV, Leiden – Holanda.

foram finalizados, porque Aerugen™ não demonstrou diferença significativa entre o grupo imunizado e um grupo controle (Döring e Pier, 2008).

Em 2009, SANTOS *et al.* produziram um imunógeno da bactéria levando em consideração seu LPS, conjugado à albumina bovina (BSA). Seguindo um protocolo de hiperimunização, o estudo não observou maior titulação do grupo conjugado em relação ao controle. O protocolo de hiperimunização consistiu em 3 vacinações por semana, por 3 semanas, e vacinações diárias na quarta semana. É possível que o contato excessivo com o antígeno tenha provocado tolerância imunológica. Provavelmente o uso de albumina como carreadora contribuiu para o resultado, pois esta proteína possui regiões assinatura comuns a várias espécies de mamíferos. É possível que esta molécula tenha sido reconhecida como própria pelo modelo animal.

O toxóide tetânico, proteína utilizada neste trabalho, é uma proteína favorável para uso em vacinas conjugadas, devido às propriedades inflamatórias e imunogênicas. É um composto derivado da neurotoxina quimicamente inativada de *Clostridium tetani* que se comportaria como proteína carreadora, sem comprometer a resposta imune ou causar efeitos adversos (Plotkin e Orenstein, 2003).

## CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo conjugar o toxóide tetânico com o lipopolissacarídeo de *Pseudomonas aeruginosa*, um dos antígenos de maior interesse no desenvolvimento de vacinas contra essa bactéria. Vários estudos consagram o LPS como antígeno mais eficiente de *P. aeruginosa*, e de fato, foi produzido um imunógeno capaz de elicitar resposta imune. Além disso, o processo de conjugação foi simples, rápido e barato.

No entanto, embora os títulos de soroaglutinação após reforço vacinal tenham indicado a geração de memória imunológica, ainda há a necessidade de padronizar a proporção açúcar: proteína do imunoconjugado, bem como de melhorar a sua pureza para a administração *in vivo*.

## AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Ministério da Educação – Brasil) pelo auxílio financeiro.

## NOTAS INFORMATIVAS

A autorização para utilização dos animais nos procedimentos experimentais descritos neste trabalho foi concedida pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR (CEEA, certificado 416, de 01/12/2009).

## REFERÊNCIAS

- AL-ZEER, M.; MASOUD, H. LPS-based conjugate vaccines composed of O-polysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa* IATS 6 and 11 bound to a carrier protein. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.23, n.11, p.1541–1549, 2007.
- BOBADILLA, J.L.; MACEK, M.J.; FINE, J.P. *et al.* Cystic Fibrosis: a worldwide analysis of the CFTR mutations- correlation with the incidence data and application to screening. **Human Mutation**, v.19, n.6, p.575-606, 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CRYZ, S.J.; SADOFF, J.C.; FÜRER, E. *Pseudomonas aeruginosa* Polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine: safety and immunogenicity in humans. **The journal of infectious diseases**, v.154, n.4, p.682-688, 1986.
- DÖRING, G. Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients.

- International Journal of Medical Microbiology**, v.300, n.8, p.573-577, 2010.
- DÖRING, G.; PIER, G.B. Vaccines and Immunotherapy against *Pseudomonas aeruginosa*. **Vaccine**, v.26, n.8, p.1011-1024, 2008.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. *et al.* Colorimetric Method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, n.3, p.350-356, 1956.
- ENGEL, J.; BALACHANDRAN, P.; Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, n.1, p.61-66, 2009.
- FRASCH, C.E. Preparation of bacterial polysaccharide–protein conjugates: Analytical and manufacturing challenges. **Vaccine**, v.27, n.46, p.6468-6470, 2009.
- GATORIA, I.S.; SAINI, N.S.; RAI, T.S. *et al.* Comparison of three techniques for the diagnosis of urinary tract infections in dogs with urolithiasis. **Journal of Small Animal Practice**, v.47, n.12, p.727–732, 2006.
- HAWKINS, C.; HARPER, D.; BURCH, D. *et al.* Topical treatment of *Pseudomonas aeruginosa* otitis of dogs with a bacteriophage mixture: A before/after clinical trial. **Veterinary Microbiology**, v.146, n.3-4, p.309-313, 2010.
- HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D. *et al.* Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. **Canadian Veterinary Journal**, v.47, n.3, p.253–255, 2006.
- HILLIER, A.; ALCORN, J.R.; COLE, L.K. *et al.* Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs — 20 cases. **Veterinary Dermatology**, v.17, n.6, p.432–439, 2006.
- HOLDER, I.A. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. **Vaccine**, v.22, p.831-839, 2004.
- JOHANSEN, H.K.; ESPERSEN, F.; CRYZ, S.J. *et al.* Immunization with *Pseudomonas aeruginosa* vaccines and adjuvant can modulate the type of inflammatory response subsequent to infection. **Infection immunology**, v.62, p.3155, 1994.
- KASHEF, N.; BEHZADIAN-NEJAD, Q.; NAJAR-PEERAYEH, S. *et al.* Synthesis and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alginate-tetanus toxoid conjugate. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, n.10, p.1441-1446, 2006.
- KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.4, p.338-344, 2009.
- KIRBY, A.; ROSENKRANTZ, W.S.; GHUBASH, W.S. *et al.* Evaluation of cone disinfection techniques and contamination level in small animal private practice. **Veterinary Dermatology**, v.21, n.2, p.175-183, 2010.
- KLOUWENBERG, P.K.; BONT, L. Neonatal and Infantile Immune Responses to Encapsulated Bacteria and Conjugate Vaccines. **Clinical and Developmental Immunology**, v.10, n.1, p.1-10, 2008.
- LABORDE, H.F. E FAJARDO, C.L. Obtention and assay of rabbit anti-*Pseudomonas* serum. **Journal of Bacteriology**, v.98, n.3, p.992-995, 1969.
- LEE, N.; JUNG, S.B.; AHN, B.Y. *et al.* Immunization of burn-patients with a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine elicits antibodies with protective efficacy. **Vaccine**, v.18, n.18, p.1952-1961, 2000.
- LEITNER, G.; KRIFUCKS, O. *Pseudomonas aeruginosa* mastitis outbreaks in sheep and goat flocks: antibody production and vaccination in a mouse model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.119, n.3-4, p.198-203, 2007.
- MONOTANI, E.; KIRYU, M.; OHSHIRO, M. *et al.* Granulomatous lesions caused by *Pseudomonas aeruginosa* in the Ostrich (*Struthio camelus*). **Journal of Comparative Pathology**, v.112, p.272-282, 1995.
- PIER, G.B. Promises and pitfalls of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide as a vaccine antigen. **Carbohydrate Research**, v.338, n.23, p.2549-2556, 2003.
- PLOTKIN, A.S.; ORENSTEIN, W.A. **Vaccine**, Philadelphia : W.B. Saunders, 4ª edição, 2003, 1408 p.
- SANTOS, R.R. **Desenvolvimento e estudo in vivo de uma vacina conjugada contra *Pseudomonas aeruginosa***. 2009. Curitiba, 50f. Dissertação: Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná.
- SHEN, X.; LAGERGARD, T.; YANG, Y. *et al.* Preparation and preclinical evaluation of experimental group B streptococcus type III polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine for intranasal immunization. **Vaccine**, v.19, p.850-861, 2001.

WESTGATE, S.J.; PERCIVAL, S.L.;  
KNOTTENBELT, D.C. *et al.* Microbiology of  
equine wounds and evidence of bacterial  
biofilms. **Veterinary Microbiology**, v.150, n.1-2,  
p.152-159, 2011.

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