

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS
Y ANTI-LEPTOSPIRA spp.**

Tatiane Cristina Fernandes Tavares
Médica Veterinária

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS –BRASIL
Julho de 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS
Y ANTI-LEPTOSPIRA spp.**

Tatiane Cristina Fernandes Tavares
Orientadora: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro

Dissertação apresentada a Faculdade de
Medicina Veterinária – UFU, como parte
das exigências para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias (Saúde
Animal)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

T231p Tavares, Tatiane Cristina Fernandes, 1985-
2012 Produção e aplicação de imunoglobulinas y anti-Leptospira spp
/ Tatiane Cristina Fernandes Tavares. - 2012.
85 f. : il.

Orientadora: Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Leptospira interrogans - Teses. 3. Vacinas - Teses. 4. Imunoglobulinas - Teses. I. Ribeiro, Anna Monteiro Correia Lima. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TATIANE CRISTINA FERNANDES TAVARES – Campos Belos, Goiás, 05 de Abril de 1985. Graduada na Universidade Federal de Uberlândia (UFU) – Uberlândia, MG, em Março de 2008. Em 2008-2009 foi Residente de Patologia Clínica e Medicina Veterinária Preventiva, no Hospital Veterinário de Uberaba. Em março de 2010, ingressou no programa de Pós - graduação (Mestrado) em Ciências Veterinárias na área de Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, esposo e amigos que me ajudaram e apoiaram, pois sem eles não teria conseguido chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

Aos meus pais, irmãos e meu esposo que, com muito carinho e apoio, não mediram esforço para mais esta conquista.

À professora Anna pela paciência e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

Aos meus amigos João Helder, Pollyanna, Mariana, Mariane, Muriel, Dayane, Gabriela pela paciência e colaboração durante todo este tempo que trabalhamos juntos.

As minhas amigas Jandra e Camila que foram fundamentais a minha formação profissional e pessoal.

Ao Álvaro, Dayane, Emília, Fabiana, Paula, Mayara, Melissa que contribuíram para realização deste trabalho.

Aos membros do Centro Colaborador, por ser verdadeiramente uma equipe contribuindo sempre com todos.

Aos técnicos do laboratório de doenças Infectocontagiosas da FAMEV-UFU pela colaboração.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	12
1.1 Leptospirose	12
1.1.2 Diagnóstico Leptospirose.....	13
1.1.3 Vacinas Leptospirose.....	15
1.2 Imunoglobulina Y	18
1.3 <i>Phage display</i>	20
Referências.....	24
CAPÍTULO 2 – PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS IgY POLICLONAIS ANTI-LEPTOSPIRA spp.....	31
Resumo	31
Abstract	32
2.1 Introdução	33
2.2 Material e Métodos	34
2.2.1 Obtenção do antígeno.....	34
2.2.2 Imunização.....	35
2.2.3 Purificação das imunoglobulinas IgY policlonais totais.....	36
2.2.4 ELISA para confirmar a especificidade da IgY.....	37
2.3 Resultados e Discussão.....	38
2.4 Conclusão	41
Referências	42
CAPÍTULO 3 - SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y ANTI-LEPTOSPIRA spp.....	46
Resumo	46
Abstract	47
3.1 Introdução	48
3.2 Material e Métodos	49

3.2.1 Obtenção dos antígenos.....	50
3.2.2 Produção e purificação de anticorpos policlonais.....	50
3.2.3 Teste de reatividade com a IgY purificada.....	52
3.2.4 <i>Biopanning</i> (Seleção de fagos).....	52
3.2.5 Titulação e purificação dos fagos.....	55
3.2.6 Extração de DNA dos fagos específicos.....	56
3.2.7 Sequenciamento de DNA dos fagos.....	56
3.2.8 Seleção dos fagos de interesse (<i>Screening</i>).....	57
3.2.9 Teste de imunoreatividade dos fagos (ELISA).....	58
3.2.10 Análise de dados <i>in Silico</i>	59
3.3 Resultados.....	59
3.3.1 Teste de reatividade com a IgY purificada.....	59
3.3.2 <i>Biopanning</i> (Seleção de fagos).....	60
3.3.3 Sequenciamento de DNA dos Fagos.....	61
3.3.4 Testes de reatividade dos fagos.....	61
3.3.5 Análise <i>in Silico</i>	64
3.4 Discussão.....	66
3.5 Conclusão.....	69
Referências.....	70
APÊNDICES	75
APÊNDICE A – Sequência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados e suas respectivas frequências.....	75
APÊNDICE B - Sequência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados com IgY anti-PME Hardjo e suas respectivas frequências.....	76
APÊNDICE C - Sequência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados com IgY anti-Leptospira e suas respectivas frequências.....	78
ANEXOS.....	79
ANEXO A – Protocolo das soluções utilizadas no experimento.....	79
ANEXO B – Protocolo Comitê de Ética na Utilização de Animais.....	85

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Grupos experimentais e tipo de imunização utilizada, Uberlândia, 2012.....	35
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Resultado da titulação realizada em cada <i>round</i> do <i>biopanning</i> , dos fagos que tiveram como alvo IgY anti-PME Hardjo e foram eluídos competitivamente com PME Hardjo.....	60
Tabela 2. Resultado da titulação realizada em cada <i>round</i> do <i>biopanning</i> , dos fago que tiveram como alvo IgY anti-PME Hardjo e foram eluídos de forma ácida.....	60
Tabela 3. Resultado da titulação realizada em cada <i>round</i> do <i>biopanning</i> , que tiveram como alvo IgY anti-Leptospira.....	61
Tabela 4. Fagos com similaridade significativa para proteínas anteriormente descritas para <i>Leptospira interrogans</i>	65

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Parede celular das Leptospiras.....	16
Figura 2: Estrutura de um fago filamentoso.....	21

Capítulo 2

Figura 1: Perfil eletroforético da IgY das gemas de ovos purificadas com sulfato de amônio.....	38
Figura 2. Curva de absorbância de IgY nas amostras de soro de galinhas obtidas pelo teste ELISA durante 8 semanas pós imunização.....	39
Figura 3. Cinética de produção de IgY nas amostras de gema de ovo de galinhas obtida pelo teste ELISA durante 10 semanas.....	40

Capítulo 3

Figura 1. Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos de <i>Leptospira interrogans</i> (Autoria própria).....	54
Figura 2. Cinética da produção de anticorpos IgY nas amostras de gema de ovo de galinhas obtida pelo teste ELISA durante 10 semanas.....	60
Figura 3. Reatividade dos fagos selecionados competitivamente frente aos anticorpos IgY anti-PME e IgY controle.....	62
Figura 4. Reatividade dos fagos selecionados frente aos anticorpos IgY anti-PME ácido e IgY controle.....	62
Figura 5. Reatividade dos fagos selecionados frente aos anticorpos IgY anti- <i>Leptospira</i> e IgY controle.....	63
Figura 6. Reatividade dos clones de fagos frente as IgY purificadas de galinhas inoculadas com PME Hardjo, <i>Leptospiras</i> e dos animais controle.....	64

PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y ANTI-LEPTOSPIRA spp.

RESUMO - A dissertação foi dividida em dois estudos. No primeiro estudo objetivou-se verificar se galinhas imunizadas com uma solução de Leptospiras inativadas e proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo, poderiam produzir anticorpos policlonais específicos anti-Leptospiras, detectáveis em testes ELISA. Foram imunizados oito galinhas com 25 semanas de idade, da raça *White Leghorn*, sendo três imunizadas com uma suspensão de Leptospiras inativadas, três com uma solução de proteínas de membrana externa extraída do sorovar Hardjo e duas controle. Coletas de sangue foram realizadas quinzenalmente e de ovos diariamente. A IgY foi purificada a partir da gema dos ovos utilizando para a delipidação o método de diluição em água ácida e a precipitação com sulfato de amônio. Realizou-se testes ELISA para verificar a especificidade da IgY, nestes foi possível observar a produção de anticorpos anti-Leptospira, tanto no soro quanto nas gemas purificadas. O pico de produção de anticorpos específicos ocorreu na 5ª semana após a primeira imunização. Foi possível induzir a produção de anticorpos específicos em galinhas, por meio de imunizações destas com Leptospira inativada e proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo. Galinhas imunizadas com uma suspensão de Leptospiras inativadas e com PME de Leptospira *interrogans* do sorovar Hardjo produziram anticorpos reativos a PME Hardjo detectáveis por teste ELISA. No segundo estudo objetivou-se com identificar epítomos ou mimetomos (sequências que imitam epítomos verdadeiros), por meio da técnica de *phage display* tendo como alvo anticorpos IgY anti-Leptospira e anti-PME Hardjo. Os anticorpos IgY utilizados como alvo foram produzidos em galinhas imunizadas com proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovar sorovar Hardjo (anti-PME Hardjo), suspensão de Leptospiras inativada (anti-Leptospira) e IgY controle. No *biopanning* uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos *Ph.D. 12 mer, New England BioLabs®Inc* foi incubada primeiramente com a IgY controle, realizando um processo denominado seleção negativa e depois com a IgY anti-Leptospira e anti-PME Hardjo, a eluição dos fagos selecionados foi então realizada de forma competitiva e ácida. Após três ciclos de seleção, 288 clones foram isolados e sequenciados, gerando 132 sequências válidas. Os clones foram submetidos a testes ELISA com o anticorpo usado como alvo no *biopanning* para verificar a especificidade destes. Nos resultados dos testes ELISAs verificou-se que nove fagos (PMEcomp17, PMEac10, PMEac12, PMEac19, PMEac29, PMEac35, Lep6, Lep7 e Lep20) apresentaram melhores resultados. Estes foram alinhados com a sequência primária de proteínas de *Leptospira* spp e

Leptospira interrogans sorovar Hardjo, e as análises *in Silico* mostraram que os nove peptídeos têm similaridade com proteínas imunogênicas de Leptospiras. Foram selecionados nove peptídeos com similaridade a proteínas de *Leptospira interrogans* consideradas imunogênicas. Os peptídeos foram similares a proteínas de membrana externa, lipoproteína, LipL32, LipL41, LigA, SecY, LenE.

Palavras-chave: Galinhas. *Phage display*. Diagnóstico. Vacinas. *Leptospira interrogans*

PRODUCTION AND APPLICATION OF IMMUNOGLOBULIN Y ANTI-LEPTOSPIRA spp

ABSTRACT - The dissertation was divided in two chapters. The aim was to determine whether hens immunized with an inactivated suspension of *Leptospira* and a solution of outer membrane proteins extracted from the serovar Hardjo, could produce specific polyclonal antibodies to *Leptospira*, detected in ELISA assay. Eight hens White Leghorn race with 25-weeks-old were immunized, three with an inactivated suspension of *Leptospira*, three with a solution of outer membrane proteins (OMP) extracted from the serovar Hardjo and two controls immunized with saline. Blood samples were collected fortnightly and eggs daily. The IgY was purified from the egg yolk using the method for the delipidation of dilution with water acidic and ammonium sulfate precipitation. The ELISA assay was performed to verify the specificity of the IgY, these was possible to observe the production of specific antibody to *Leptospira* both in serum and purified egg yolk. The specific antibody titers peaked in the fifth week post immunization. The production of polyclonal IgY was effective for producing high titers of specific antibodies. The aim of the second chapter was search to epitopes or mimetops (mimetic sequence of the true epitopes) through technique of phage display using IgY specific to *Leptospira*, outer membrane proteins the serovar Hardjo and IgY control. To realize the biopanning was used a commercial library of random peptides Ph.D. 12 mer, *New England BioLabs® Inc Phage Display Library* was first incubated with IgY control, performing a process called negative selection, and then with IgY specific to *Leptospira* and to OMP *Leptospira* Hardjo, selected phages were eluted competitively and acid. After three rounds of selection, 288 clones were isolated and sequenced, generating 132 valid sequences. The selected clones were tested in diagnosis by ELISA assay with the antibody used as a biopanning target in order to verify the specificity of these. The results of ELISA testing it was found that nine phage (PMEcomp17, PMEac10, PMEac12, PMEac19, PMEac29, PMEac35, Lep6, Lep7 e Lep20) showed better results. These were aligned with the primary sequence of proteins of *Leptospira* spp. and *Leptospira interrogans* serovar Hardjo and insilico analyzes showed that nine peptides has similarity with immunogenic proteins of *Leptospira*. In this work we selected nine peptides with similarity to proteins of *Leptospira interrogans* that were considered immunogenic. The peptides were similar to outer membrane proteins, lipoprotein, LipL32, LipL41, LigA, SecY, LenE.

Key words: Hens. Phage display. Diagnostics. Vaccines. *Leptospira interrogans*

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Leptospirose

As leptospirosas são bactérias pertencentes ao gênero *Leptospira*, família *Leptospiraceae* e ordem *Spirochaetales* (FAINE et al., 1999). Estas bactérias são móveis, aeróbias, possuem conformação helicoidal, medindo aproximadamente 0,1µm de diâmetro e 6-20µm de comprimento.

O gênero *Leptospira* primeiramente foi dividido, pela classificação fenotípica, em duas espécies *Leptospira interrogans* (patogênicas) e *Leptospira biflexa* (saprófitas) (LEVETT, 2001). Estas são divididas em numerosos sorovares, classificadas de acordo com a análise de sua constituição antigênica, por meio de reações de adsorção cruzadas de aglutininas. Os sorovares antigenicamente relacionados são agrupados em sorogrupos (BHARTI et al., 2003)

No entanto, estudos recentes de características genéticas têm implicado numa nova classificação baseada na hibridização de DNA, assim atualmente este gênero é constituído das seguintes espécies: *L. alexanderi*, *L. alstonii* (genomospecies 1), *L. borgpetersenii*, *L. inadai*, *L. interrogans*, *L. fainei*, *L. kirschneri*, *L. licerasiae*, *L. noguchi*, *L. santarosai*, *L. terpstae* (genomospecies 3), *L. weilii*, *L. wolffii*, *L. biflexa*, *L. meyeri*, *L. yanagawae* (genomospecies 5), *L. kmetyi*, *L. vanthielii* (genomospecies 4), e *L. wolbachii* (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

A Leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, caracterizada por febre, insuficiência renal e hepática, manifestações pulmonares e dificuldades reprodutivas (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). A transmissão para os seres humanos ocorre por contato direto ou indireto com urina de animais infectados.

As Leptospirosas penetram no hospedeiro, através de membranas mucosas, pequenos cortes ou abrasões e ainda por contato direto com a pele úmida e se disseminam rapidamente pela corrente sanguínea e barreiras de tecido estabelecendo assim uma infecção sistêmica (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009).

Os sinais clínicos são muito variáveis e geralmente sorovar adaptado, como Canicola em cães, Bratislava em equinos e suínos, Hardjo em bovinos e Australis e Pomona em suínos (BERNARD, 1993; ANDRÉ FONTAINE, 2006; GROOMS, 2006). Os animais podem

tornar-se portadores assintomáticos, albergando leptospiros virulentas nos túbulos renais e eliminando na urina por longo período (LEVETT, 2001).

Outras espécies, como camundongos (*Mus musculus* e outras espécies de *Mus*) e ratos (principalmente *Rattus norvegicus* e *R. rattus*) servem como reservatórios para sorovares hospedeiro adaptados (camundongos para sorovar Ballum, Icterohaemorrhagiae e ratos para Copenhageni) (BHARTI et al., 2003). Os ratos geralmente não apresentam a doença, mas albergam as leptospiros em seus rins, o que os tornam uma importante fonte de infecção para seres humanos ou outros animais (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

1.1.2 Diagnóstico Leptospirose

O diagnóstico clínico da leptospirose é difícil, uma vez que apresenta uma ampla variedade de sinais clínicos, dependendo assim de ensaios laboratoriais, principalmente, relacionados a detecção de anticorpos específicos (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

A soraglutinação microscópica (SAM) é o teste de referência para diagnóstico da leptospirose, este utiliza cepas vivas de leptospiros, podendo ser utilizado tanto na triagem de soros animais como de humanos, sendo que para se considerar o resultado como positivo é necessário um título igual ou superior a 400 em uma amostra única com presença de sinais clínicos e histórico de contato com o agente ou um aumento de quatro vezes ou mais em amostras pareadas de soro (FAINE et al., 1999, LEVETT et al., 2001; WHO, 2003).

A especificidade da SAM é considerada boa (95%) já que reações cruzadas com outras bactérias não são usualmente relatadas, porém há um elevado grau de reações cruzadas entre sorovares e sorogrupos, principalmente durante a fase aguda da doença (HICKEY; DEMERS, 2000; LEVETT, 2001; WHO, 2003).

No entanto a sensibilidade da SAM é baixa, especialmente na fase inicial da doença, o que se atribui ao fato de que o sistema imune do indivíduo infectado leva alguns dias para produzir níveis detectáveis de anticorpos contra o agente infectante (WHO, 2003; McBRIDE et al., 2005).

Além disso, o SAM apresenta outras desvantagens, como: o alto custo, complexidade e risco para os técnicos de laboratório, pois necessita de coleções de bactérias em constante cultivo em meio líquido e profissionais treinados para realização da leitura comparativa com sorovares controles; o resultado com títulos elevados de anticorpos contra sorovares que não são os causadores da enfermidade ou surto, já que existe um alto grau de reações cruzadas

entre diferentes sorovares e por não discriminar anticorpos provenientes de infecção ou vacinação (WHO, 2003; LEVETT, 2001; McBRIDE et al., 2005; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Devido à complexidade e desvantagens do SAM a busca por novos testes diagnósticos é constante, seja através da detecção de anticorpos ou identificação de antígenos (LEVETT, 2001; McBRIDE et al., 2005).

A fase aguda da leptospirose é caracterizada por bacteremia, por isso como alternativa diagnóstica durante essa fase, pode ser realizado exame direto, cultivo *in vitro* ou inoculação em animais de laboratório, uma vez que o SAM apresenta baixa sensibilidade neste período (WHO, 2003).

No exame direto as leptospiras podem ser visualizadas em fluidos corporais, sangue, urina e líquido por microscopia de campo escuro ou imunofluorescência (LEVETT et al., 2001). Contudo, o exame direto apresenta desvantagens como baixa especificidade e sensibilidade uma vez, que permite somente a identificação de bacteremia por espiroquetas e necessita de aproximadamente 10^4 leptospiras/ml, sendo assim, não é considerado um teste definitivo, devendo ser confirmado por outros testes (FAINE, 1999, LEVETT et al., 2001).

O cultivo em meios de cultura específicos constitui o diagnóstico definitivo, no entanto, não é realizado como rotina laboratorial, pois pode durar mais de dois meses para a confirmação, o que o torna inviável na maioria dos casos (FAINE et al., 1999; WHO, 2003; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Testes ELISA têm sido desenvolvidos utilizando uma enorme variedade de antígenos desde leptospiras inativadas a lipoproteínas recombinantes como a LipL32, LigA ou proteína de membrana externa OmpL1. Entretanto, embora apresente vantagens como dispensa a necessidade de cultivo e a possibilidade de automação, a sensibilidade e a especificidade ainda são menores que a SAM (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Novos testes nos formatos PCR, Dipstick, Immunoblot e Dot-ELISA foram descritos, mas, embora sensíveis, continuam sorovar-específicos (PETCHCLAI; HIRANRAS; POTH, 1991; RIBEIRO; SOUZA; ALMEIDA, 1995; SILVA, et al., 1997; GUSSENHOVEN et al., 1997; YAN et al., 1999; LEVETT; BRANCH, 2002). Testes moleculares como o “dot-blotting” (TERPSTRA; SCHOONE; TER, 1986) ou hibridização *in situ* (TERPSTRA et al., 1987) também foram descritos.

1.1.3 Vacinas Leptospirose

Segundo Langoni et al. (2002), apesar da vacinação contra leptospirose não conferir proteção máxima é uma medida de extrema importância, uma vez que reduz a ocorrência da doença na população animal e consequentemente minimiza os danos à saúde pública. As vacinas disponíveis comercialmente, na área veterinária, para o controle da leptospirose são baseadas na célula inteira inativada ou em preparados da membrana de leptospiros patogênicas, fornecendo assim somente uma resposta transitória de anticorpos contra o LPS destas bactérias (PENA-MOCTEZUMA et al., 1999), podendo prevenir o desenvolvimento da doença, mas não a leptospiúria (ALT; ZUERNER; BOLIN, 2001).

Nas imunizações a resposta gerada é predominantemente humoral e sorovar específica (FAINE, 1999). Assim, protegem somente contra infecções causadas por sorovares homólogos ou antigenicamente relacionados. Existe um grande número de sorovares patogênicos, o que impõe uma maior limitação para a produção de uma vacina com componentes multi-sorovar (GAMBERINI et al., 2005).

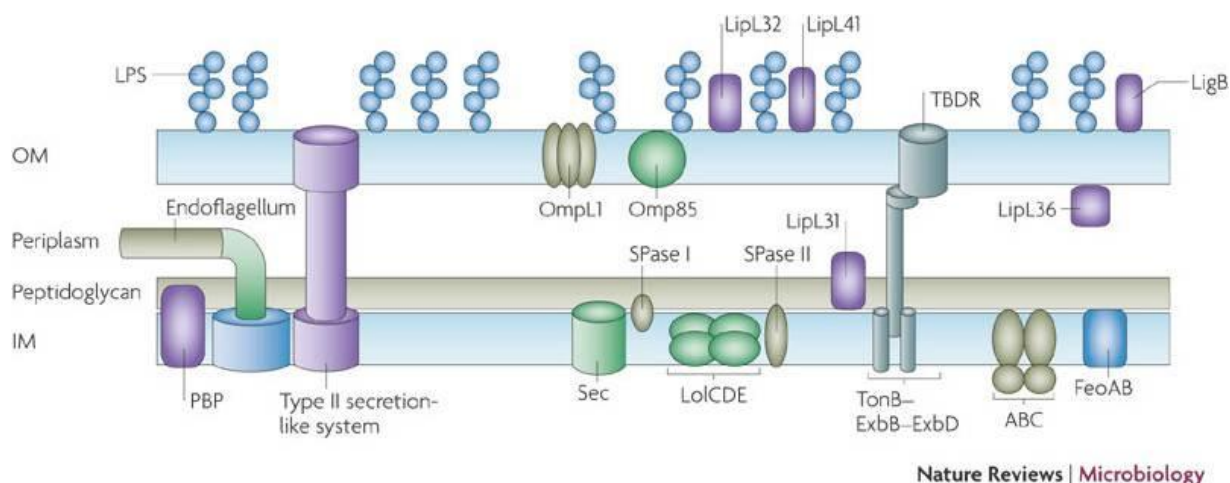
Atualmente é imprescindível o desenvolvimento de uma vacina multivalente protetora e de amplo espectro contra a leptospirose, mas há necessidade de identificar antígenos comuns em sorovares patogênicos. No soro humano de pacientes com leptospirose têm sido encontrados anticorpos contra diversos antígenos protéicos presentes na membrana externa, espaço periplasmático e também contra o LPS (PLANK; DEAN, 2000; BHARTI et al., 2003).

A proteômica, responsável pela identificação, caracterização e quantificação das proteínas, é considerada como importante ferramenta para identificação de alvos para uso em diagnóstico e vacinas (THONGBOONKERD, 2008). Nesta perspectiva, a proteômica permite identificar proteínas presentes exclusivamente em cepas patogênicas (HAAKE et al., 1999; HAAKE et al., 2000; HAAKE; MATSUNAGA, 2002; CULLEN et al., 2003) e que são importantes alvos para desenvolvimento de testes diagnósticos, seja utilizando métodos imunoquímicos ou moleculares.

Um grande número de proteínas de membrana externa de leptospiros já foram caracterizadas como importantes ferramentas para o desenvolvimento de vacinas e de ensaios de imunodiagnóstico como a OmpL1 (HAAKE et al., 1993), LipL41 (SHANG; SUMMERS, HAAKE, 1996), LipL36 (HAAKE et al., 1998), LipL32 (HAAKE et al., 2000), LipL21 (CULLEN et al., 2003), LipL46 (MATSUNAGA et al., 2006), OmpA-like Loa22 (KOIZUMI; WATANABE, 2005) e a proteína LenA (VERMA et al., 2006). Uma família de proteínas chamadas de immunoglobulin-like (Ligs) foi descrita recentemente

(PALANIAPPAN et al., 2002). Outros ensaios também demonstraram que as proteínas Ligs são antígenos protetores quando usados em modelos animais com leptospirose (KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007). A disposição dessas proteínas na membrana das Leptospiras encontra-se na Figura 1.

Figura 1: Parede celular das Leptospiras



Fonte: Ko; Goarant; Picardeau, 2009.

A imunização de hamsters com fração da membrana *L. interrogans* contendo as proteínas OmpL1 e LipL41 demonstrou sinergismo entre estas duas proteínas na proteção. No entanto quando as proteínas recombinantes foram administradas individualmente estas não foram protetoras, sugerindo que a maneira com que OmpL1 e LipL41 estão associadas à membrana é importante para determinar a imunoproteção (HAAKE et al., 1999).

Em outro estudo mais recente, formas recombinantes de outras prováveis proteínas de membrana externa de leptospiras, tais como Lp1454, Lp1118 e MceII, mostraram-se imunoprotetoras, individualmente e sinergeticamente, contra a infecção em hamsters (CHANG et al., 2007).

As proteínas LigA e LigB demonstraram imunoproteção em estudos realizados em modelos de hamster, no entanto em um estudo mais recente a importância da LigB na patogenicidade da leptospirose foi questionada, pois mesmo após deleção do gene ligB do genoma de uma cepa patogênica, esta conservou suas características letais (KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007, CRODA et al., 2008). Embora existam pesquisas com resultados contraditórios principalmente quando se utilizou LipL32 e Lig A na imunização de hamsters (LUCAS et al, 2012).

Lipoproteínas de espiroquetas têm demonstrado ser antígenos capazes de induzir uma resposta imune protetora (HAAKE, 2000), confirmando sua importância na patogênese da leptospirose. Nestes microrganismos, as lipoproteínas são, comprovadamente, as mais proeminentes proteínas que compõem sua membrana celular.

Atualmente o número de lipoproteínas de superfície celular de *Leptospira* caracterizadas é pequeno, são elas; LipL21, LipL31, LipL32, LipL36, LipL41, LipL45 e LipL48 (SHANG; SUMMERS; HAAKE, 1996; HAAKE et al., 1998; HAAKE et al., 2000; HAAKE; MATSUNAGA, 2002; MATSUNAGA et al., 2002; CULLEN et al., 2003). Estas lipoproteínas foram assim denominadas, com base em sua aparente massa molecular, de acordo com os critérios adotados para nomenclatura das proteínas de *Treponema* (NORRIS, 1993).

Até o presente momento, a mais proeminente proteína de membrana de *Leptospira* reportada é LipL32. Ela é expressa tanto em cultivos *in vivo* quanto *in vitro*, sendo sua sequência e expressão altamente conservada entre as espécies patogênicas de *Leptospira*. Desta forma, LipL32 é apontada como o antígeno mais importante na patogênese, diagnóstico e prevenção da leptospirose (HAAKE et al., 2000; GUERREIRO et al., 2001; BRANGER et al., 2001). Dentre as lipoproteínas acima relacionadas, as três maiores em ordem de abundância na superfície celular são: LipL32, LipL21 e LipL41 (CULLEN et al., 2005).

A capacidade de determinação da sequência genômica completa de diversos organismos, abriu as portas para uma nova metodologia de desenho racional de vacinas, que é relevante no tratamento e prevenção de uma série de infecções (KOIZUMI; WATANABE, 2005). As sequências completas dos genomas são transformadas em algoritmos computacionais, para que sejam avaliadas *in silico*, oferecendo uma nova estratégia para identificação de antígenos potenciais. Esta metodologia de análise recebe o nome de vacinologia reversa e vem surgindo como uma revolução na área de desenvolvimento de vacinas (RAPPUOLI; COVACCI, 2003; SERRUTO et al., 2004).

A análise do genoma de *L. interrogans* a escolha racional de sequências que codificam proteínas associadas à membrana, estão entre as novas estratégias de avaliação e caracterização de imunógenos para o desenvolvimento de uma vacina protetora e para o uso em testes diagnósticos.

1.2 Imunoglobulina Y

O processo de produção de anticorpos baseia-se na imunização e coleta de sangue ou mesmo sacrifício dos animais para remoção do baço, estes procedimentos provocam sofrimento dos animais estando assim em desacordo com as políticas de bem estar animal (CHALGHOUMI et al., 2009).

A capacidade dos anticorpos de reconhecer moléculas com alta especificidade fez deles uma ferramenta indispensável em laboratórios, principalmente na pesquisa de novos métodos diagnósticos, terapias e vacinas. Atualmente, os anticorpos disponíveis para esse objetivo são produzidos em mamíferos requerendo assim o uso de animais de laboratório (coelhos, ratos, camundongos e cobaias) ou mamíferos de maior porte (cavalos, ovelhas e cabras) (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004; CHALGHOUMI et al., 2009).

As imunoglobulinas Y (IgY) são moléculas com elevada especificidade para a ligação e inativação de substâncias externas, tais como moléculas tóxicas ou antigenicas, que são capazes de invadir o corpo (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

Sendo assim, para garantir o bem estar animal o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos (ECVAM) recomenda o uso de anticorpos de galinhas como alternativa aos anticorpos de mamíferos (SCHADE et al., 1996). Isto porque a utilização de galinhas reduz o número de animais utilizados, já que estas produzem maior quantidade de anticorpo quando comparadas aos animais de laboratório comumente usados (camundongo e coelho) e ainda a coleta de sangue pode ser substituída por extração do anticorpo a partir da gema de ovo, minimizando assim o sofrimento animal (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

Em galinhas (*Gallus domesticus*), apenas três classes de imunoglobulinas são bem identificadas, IgM, IgA e IgY (CHEN et al, 1982; BURNS; MAXWELL, 1981). Sendo que a IgY, principal anticorpo produzido apresenta função equivalente a IgG nos mamíferos e a IgA e IgM são homólogas as de mamíferos (WARR et al., 1995; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A IgY é continuamente sintetizada, secretada para o sangue e transferida para a gema de ovo, onde se acumula, através de um receptor na superfície da membrana da gema específico pra translocação de IgY (WARR et al., 1995; MORRISON et al., 2002, TESAR et al., 2008), enquanto que IgA e IgM são depositadas na clara de ovo (ROSE et al., 1974). Este acúmulo de IgY na gema é responsável pela imunidade passiva a embriões e neonatos pois a

produção de IgY em pintinhos, começa apenas seis dias após a eclosão (ZHANG, 2003; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A IgY está presente no sangue circulante, na gema de ovo e também conteúdo duodenal, secreção traqueal e no líquido seminal (LESLIE; CLEM, 1969). A quantidade de IgY na gema varia desde 60-150mg/ovo dependendo de vários fatores, como idade, raça e antígeno utilizado (COOK; TROTT, 2010, PAULY et al., 2009). Uma galinha pode produzir aproximadamente 325 ovos/ano, isto pode resultar num rendimento potencial de cerca de 20-40 g de IgY por ano (PAULY et al., 2009), dos quais 2% a 10% é o antígeno específico (SCHADE et al., 1991; TINI et al., 2002).

A estrutura geral do IgY é semelhante para IgG de mamíferos, com duas cadeias pesadas e duas leves, porém apresentam diferenças em suas características bioquímicas e funções imunológicas que se devem a sequência de aminoácidos e diferenças estruturais (ZHANG, 2003; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

A distância filogenética entre galinhas e mamíferos torna possível a produção de anticorpos contra proteínas altamente conservadas de mamíferos, e ainda é necessária uma quantidade menor de antígeno para produzir uma resposta imune eficiente (LARSSON et al., 1998). A distância evolutiva também determina a ausência de reação cruzada entre IgG de mamíferos e IgY o que reforça as vantagens da utilização de IgY como anticorpo primário em alguns tipos de imunodiagnóstico (HADGE; ANBROSUIUS, 1984; DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010). Além disso, anticorpos de galinha reconhecem epitopos diferentes dos anticorpos de mamíferos, aumentando assim o número de anticorpos diferentes e consequentemente a possibilidade de ligação (CARLANDER et al., 1999).

A utilização de IgY de galinha, em vez de IgG de mamíferos apresenta inúmeras vantagens, como: redução do número de animais, uma vez que galinhas podem produzir até 18 vezes mais anticorpo do que coelhos, redução de custo, bem estar animal (SCHADE et al., 1996; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004). Além disso, ao contrário da IgG não ativa o complemento, não interage com as proteínas estafilocócica A e estreptocócica G, ao fator reumatóidee ao receptor Fc da superfície celular e não reage com os anticorpos de IgG e IgM de mamíferos (TINI et al, 2002; CARLANDER et al., 2002; ZHANG, 2003).

Além disso, a IgY pode ser facilmente isolada a partir da gema por técnica de precipitação, uma vez que na gema encontra-se somente IgY, em contraste com o soro de mamíferos onde se encontram várias classes se anticorpos (GASSMANN et al., 1990).

Além dos benefícios já citados, a IgY é particularmente estável a altas temperaturas e variações de pH (SHIMIZU et al., 1992) e exibem elevada avidéz mesmo após a primeira imunização.

1.3 Phage Display

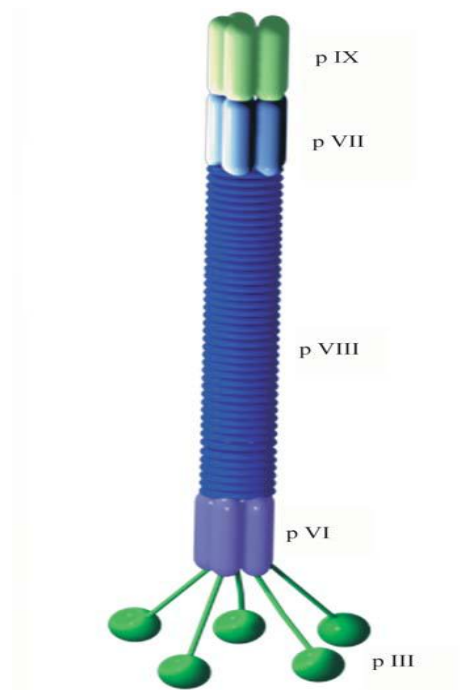
O termo Phage display significa apresentação de peptídeos na superfície de fagos, esta técnica foi descrita primeiramente por Smith em 1985, sendo este autor o pioneiro a conseguir a expressão da enzima de restrição Eco RI como uma fusão da proteína três (pIII) do capsídeo do fago. A técnica consiste na seleção de peptídeos *in vitro*, onde uma proteína ou peptídeo é geneticamente fundido a proteína de superfície de um bacteriófago, resultando na expressão de uma proteína heteróloga na superfície do capsídeo viral (FUMAGALLI, 2008).

Uma grande vantagem do *phage display* é que bibliotecas de peptídeos podem ser selecionadas pelos ligantes alvo-específico, sendo assim, bibliotecas selecionadas contra alvos de interesse podem ser criados com grande diversidade e estas podem ser amplificadas (SERGEEVA et al., 2006).

É uma técnica importante para o desenvolvimento de vacinas e mapeamento de epítomos e apresenta vantagens como: habilidade de selecionar ligantes de alta afinidade, possibilidade de produzir proteínas solúveis, fácil manuseio e rapidez (SMITH; PETRENKO, 1997).

Os bacteriófagos comumente utilizados na técnica de *phage display* são vírus de DNA circular e fita simples que infectam bactérias Gram negativas. Sendo que os mais extensivamente usados são fagos filamentosos estirpes M13, fd e f1 que infectam *E. coli* via *pilus* F, constituídos por cinco proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII e pIX (Figura 1) (ARAP, 2005). Destas e fita simples que infectam bactérias Gram – negativas. Sendo que os mais cinco proteínas existem aproximadamente 2.800 cópias da pVIII e 3 a 5 cópias da pIII (RUSSEL, 1991).

Figura 2: Estrutura de um fago filamentosso. PIII, pVI, pVII, pVIII and pIX representam as proteínas do fago. Os peptídeos são expressos usualmente na pIII ou pVIII.



Fonte: Arap, 2005.

A técnica de *phage display* envolve a fusão do DNA estranho com DNA do fago, o que resulta em proteínas exógenas expostas na superfície dos fagos filamentosos fusionado a uma das proteínas de revestimento. Embora todas as cinco proteínas de revestimento possam ser usadas para este fim, a pVIII e a pIII são as mais utilizadas (ARAP, 2005).

Bibliotecas de peptídeos sintéticos fusionados a pIII são mais indicadas para descoberta de ligantes com alta afinidade, quando comparadas as bibliotecas fusionadas a pVIII ligada, devido a baixa representatividade da pIII em relação a pVIII (KEHOE; KAY, 2005; PASCHKE, 2006).

A principal característica do fago filamentosso que faz com que ele seja o mais utilizado é que ao contrário dos bacteriófagos líticos, ele produz e secreta partículas de fagos a partir de bactérias infectadas sem causar a lise celular (RUSSEL et al., 2004).

A infecção é iniciada pelo acoplamento da pIII do fago ao pilus f de uma *E. coli* (HEMMINGA et al., 2010). Somente o DNA de fita simples e circular do fago penetra na bactéria onde é convertido pela maquinaria de replicação do DNA bacteriano em uma forma replicativa de plasmídeo de fita dupla. Esta forma replicativa sofre constantes replicações do DNA circular para gerar DNA de fita simples e ainda servir como molde para expressão das proteínas de fago pIII e pVIII. A progênie do fago é montada por empacotamento do DNA de

fita simples em capsídeos protéicos e é expulsa da bactéria através da membrana para o meio extracelular (AZZAZY; HIGHSMITH, 2002).

O processo de seleção é chamado de *biopanning* e envolve o enriquecimento do fago desejado por ligação e eluição a partir uma molécula alvo imobilizada (KONTHUR; WALTER, 2002).

O *biopanning* ou processo de seleção biológica, em geral, envolve cinco passos fundamentais: preparo de uma biblioteca primária ou amplificação de uma biblioteca existente; exposição das partículas de fagos contra um alvo imobilizado; remoção de fagos não específicos, que não se ligaram por lavagens; recuperação dos fagos específicos, que se ligaram a molécula alvo por eluição e amplificação dos fagos recuperados, repetição desse processo por duas a quatro vezes (ARAP, 2005).

Após o *biopanning*, é feito o sequenciamento do genoma do fago e assim é possível determinar a sequência do peptídeo expresso na superfície do fago o que permite a reprodução como peptídeo recombinante ou a produção de peptídeo sintéticos, e finalmente determinar a especificidade e seletividade para o alvo utilizado (KOIVUNEN et al., 1999).

Em razão das desvantagens apresentadas pelas vacinas e métodos de diagnóstico para leptospirose disponíveis atualmente, foram propostos como objetivos produzir e purificar anticorpos IgY policlonais específicos anti-Leptospiras, e estes foram utilizados como alvo na técnica de *phage display* visando a seleção e identificação de peptídeos específicos para *Leptospira*, que futuramente possam ser utilizados no desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e/ou para produção de vacinas multi-sorovar contra leptospirose.

Tungtrakanpoung et al. (2006) utilizando anticorpos monoclonais e soro de pacientes positivos para leptospirose obteve peptídeos especialmente; LTPCDXPTFGS e TPCIXXGSAS e CSNXSKR, que quando alinhados com proteínas de *Leptospira interrogans*, apresentaram sequências semelhantes a proteínas de membrana exterior (GenBank adesão Número AAN49104), termolisina proteína precursora (GenBank número de acesso YP_003227.1), e hipotética proteína LIC12228 (adesão GenBank Número YP_002163.1).

A utilização de amostras de soros na seleção de peptídeos, através da técnica de *phage display*, é uma estratégia atrativa que pode ser aplicada para o imunodiagnóstico ou no desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, na tentativa de se identificar sequências específicas que se liguem a anticorpos presentes em tais amostras. Tal procedimento pode gerar o desenvolvimento de novos compostos mais simples e sensíveis, além de permitir o entendimento da participação de antígenos conhecidos, ou não, nos mecanismos de resposta imune (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

Essa técnica demonstra um grande potencial na seleção e identificação de antígenos reconhecidos pelas amostras de soro de animais com leptospirose, sem o prévio conhecimento de tais antígenos. Além disso, mostra-se como uma interessante alternativa a ser verificada no desenvolvimento de antígenos vacinais contra leptospirose.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Review: *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, jan. 2010.
- ALT, D. P.; ZUERNER, R. L.; BOLIN, C. A. Evaluation of Antibiotics for Treatment of Cattle Infected With *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.219, n.5, p.636-639, Set. 2001.
- ANDRE-FONTAINE, G. Canine leptospirosis - do we have a problem? **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.117, n.1, p.19-24, Out., 2006.
- ARAP, M. A. *Phage display* technology - Applications and innovations. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, n. 6, p 1-9, Jan./Mar. 2005.
- AZZAZY, H. M., HIGHSMITH, W. E. Jr. *Phage display* technology: clinical applications and recent innovations. **Clinical Biochemistry**, Toronto, n.2, v.35, p.425-445, Set. 2002.
- BERNARD, W. Leptospirosis. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v.9, n.2, p.435-444, Aug. 1993.
- BHARTI, A.; NALLY, J.; RICALDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLIG, M.; GOTUZZO, E. VINETZ, J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **The Lancet Infectious Diseases**, Nova York, v.3, n.12, p.757-771, Dez. 2003.
- BRANGER, C.; SONRIER, C.; CHATRENET, B.; KLONJKOWSKI, B.; RUVOEN-CLOUET, N.; AUBERT, A.; ANDRE-FONTAINE, G.; ELOIT, M. Identification of the Hemolysis-Associated Protein 1 As a Cross-Protective Immunogen of *Leptospira interrogans* by Adenovirus-Mediated Vaccination. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.11, p.6831-6838, Nov. 2001.
- BURNS, R. B.; MAXWELL, M. H. Probable occurrence of IgE in the adult domestic fowl (*Gallus domesticus*) after horse serum stimulation. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.5, n.1, p.67-72, Set. 1981.
- CARLANDER, D. **Avian IgY antibody. In vitro and in vivo**. 2002. 53 f. Tese (Doutorado em Quimica Clínica) – Uppsala University, Sweden, 2002.
- CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJÅKER, P-E. LARSSON, A. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization by gargling with specific antibodies. In: SIM, J. S. (Ed.). **Egg Nutrition and Biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1999. p.371-374.
- CHANG, Y. Evaluation of protective immunity of *Leptospira* immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. **Vaccine**, Kidlington, v.26, n.2 p.277-287, Jan., 2007.
- CHALGHOUMI, R.; BECKERS Y.; PORTETELLE, D.; THÉWIS, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric

infections in chicken: a review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v.13, n.2, p.295-308, 2009.

CHEN, C. L.; LEHMEYER, J. E.; COOPER, M. D. Evidence for an IgD homologue on chicken lymphocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.129, n.6, p.2580–2585, Dez. 1982.

COOK, M. E.; TROTT, D. L. IgY-immune component of eggs as a source of passive immunity for animals and humans. **World's Poultry Science**, Ithaca, v. 66, n. 2, p.215-226, Jul., 2010.

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*: disruption of the LigB gene does not affect virulence in animal models of leptospirosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.76, n.12, p.5826–5833, Set. 2008.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.5, p.2414 – 2421, Mai. 2003.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.8, p.4853-4863, Ago. 2005.

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

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 3. ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

FUMAGALLI, M. A. C, **Proteção contra a infecção por *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* pela imunização de camundongos BALB/c com peptídeos sintéticos selecionados por *phage display* e *spot synthesis***. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia Bioquímica e Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2008.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira* Interrogans to Identify Potential Vaccine Candidates Against Leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v. 244, n.2, p. 305-313, Mar. 2005.

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

GROOMS, D. Reproductive losses caused by bovine viral diarrhea virus and leptospirosis. **Theriogenology**, Stoneham, v.66, n.3, p.624–628, Ago., 2006.

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**, Washington, v. 69, n.8, p.4958-4968, Ago., 2001.

GUSSENHOVEN, G. C.; VAN DER HOORN, M. A.; GORIS, M. G.; TERPSTRA, W. J.; HARTSKEERL, R. A.; MOL, B. W.; VAN INGEN, C. W.; SMITS, H. L. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of *Leptospira*-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.1, p.92-97, Jan., 1997.

HICKEY, P. W.; DEMERS, D. **Leptospirosis. Emedicine**. 2012. Disponível em: <<http://www.emedicine.com/ped/topic1298.htm>>.

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

HAAKE, D. A.; CHAMPION, C. I.; MARTINICH, C.; SHANG, E. S.; BLANCO, D. R.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, n.13, p.4225–4234, Jul., 1993.

HAAKE, D. A.; MARTINICH, C.; SUMMERS, T. A.; SHANG, E. S.; PRUETZ, J. D.; MCCOY, A. M.; MAZEL, M. K.; BOLIN, C. A. Characterization of leptospiral outer membrane lipoprotein LipL36: downregulation associated with late-log-phase growth and mammalian infection. **Infection and Immunity**, Washington, v.66, n.4, p.1579–1587, Abr., 1998.

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.9, p.4936-4945, Set., 2002.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral Outer Membrane Proteins OmpL1 and LipL41 Exhibit Synergistic Immunoprotection. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, n.12, p.6572-6582, Dez., 1999.

HÄDGE, D.; AMBROSIUS, H. Evolution of low molecular weight immunoglobulins. IV. IgY-like immunoglobulins of birds, reptiles and amphibians, precursor of mammalian IgA. **Molecular Immunology**, Elmsford, v.85, n.8, p.96-99, Ago., 1984.

HEMMINGA, M. A.; VOS, W. L.; NAZAROV, P. V.; KOEHORST, R. B.; WOLFS, C. J.; SPRUIJT, R. B.; STOPAR, D. Viruses: incredible nanomachines. New advances with filamentous phages, **European Biophysics Journal**, Berlin, v.39, n.4, p.541-550, Mar., 2010.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H. LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science**, Ithaca, v.50, n.3, p.341-348, Set., 2004.

KEHOE, J. W.; KAY, B. K. Filamentous *phage display* in the new millennium. **Chemical Reviews**, Washington, v.105, n.11, p.4056–4072, Nov., 2005.

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

KOIVUNEN, E.; ARAP, W.; RAJOTTE D.; LAHDENRANTA, J.; PASQUALINI, R. Identification of receptor ligands with *phage display* peptide libraries. **Journal of Nuclear Medicine**, Nova York, v.40, n.5, p.883-888, Mai., 1999.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, n.11-12, p.1545-1552, Mar., 2004.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future. **Journal of Postgraduate Medical**, Bombay, v.51, n.3, p.210-214, Jul./Set., 2005.

KONTHUR, Z.; WALTER, G. Automation of *phage display* for high - throughput anti body development. **TARGETS**, v.1, n1, p.30-36, Jul., 2002. Disponível em: http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/targets_v1.pdf.

LANGONI, H.; PIMENTEL, V. L.; SILVA, A. V.; LUCHEIS S. B.; DENARDI M. B. Avaliação da dinâmica de anticorpos pós-vacinais contra *Leptospira* spp. em cães vacinados pela prova de SAM. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v.18, n.11, p.54-61, 2002.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Immune response in chicken with different amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, Abingdon, v.10, n.1, p. 29-36, 1998.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, n.6, p.1130, 1337, Dez., 1969.

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

LEVETT, P.; BRANCH, S. L. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay methods for detection of immunoglobulin M antibodies in acute leptospirosis. **American Journal of Tropical Medical Hygiene**, Baltimore, v. 6, n. 66, p. 745-748, Jun., 2002.

LUCAS, D. S. D.; 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**, Guildford, v.29, n.18, p.3413-3418, Abr., 2011.

MANOUTCHARIAN, K. A.; DIAZ-OREA, G.; GEVORKIAN, G.; FRAGOSO, G.; ACERO, E.; GONZALEZ, A.; DE ALUJA, N.; VILLALOBOS, E.; GOMEZ-CONDE, E.; SCIUTTO. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.99, n.1-2, p.11–24, Mai., 2004.

MATSUNAGA, J.; WERNEID, K.; ZUERNEER, R. L.; FRANK, A.; HAAKE, D. A. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v.152, n.12, p.3777–3786, Dez., 2006.

MATSUNAGA, J.; YOUNG, T. A.; BARNETT, J. K.; BARNETT, D.; BOLIN, C. A.; HAAKE, D. A. Novel 45-kilodalton leptospiral protein that is processed to a 31- kilodalton growth-phase-regulated peripheral membrane protein. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.1, p.323–334, Jan., 2002.

MCBRIDE, A. J.; ATHANAZIO, V. M.; REIS, G.; KO, A. I. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v.18, n.5, p.376–386, Out., 2005.

MORRISON, S. L.; MOHAMMED, M. S.; WIMS, L. A.; TRINH, R.; ETCHES, R. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**, Elmsford, v.38, n.8, p.619-625, Jan., 2002.

NORRIS, S. J. Polypeptides of *Treponema pallidum* : progress toward understanding their structural, functional and immunologic roles. *Treponema pallidum* Polypeptide Research Group. **Microbiology Review**, Washington, v.57, p.750-779, 1993.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.3, p.1745-1750, Mar., 2006.

PALANIAPPAN, R. U. M.; CHANG, Y.; JUSUF, S. S. D.; ARTIUSHIN, S.; TIMONEY, J. F.; MCDONOUGH, S. P.; BARR, S. C.; DIVERS, T. J.; SIMPSOM, K. W.; MCDONOUGH, P. L.; MOHAMMED, H. O. Cloning and molecular characterization of an immunogenic Lig A protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.11, p. 5924-5930, Nov., 2002.

PASCHKE M. *Phage display* systems and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.70, n.1, p.2–11, Mar., 2006.

PAULY, D.; DORNER, M.; ZHANG, X.; HLINAK, A.; DORNER, B.; SCHADE, R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in hens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, Champaign, v.88, n.2, p.281–290, Feb., 2009.

PENA-MOCTEZUMA, A.; BULACH, D. M.; KALAMBAHETI, T.; ADLER, B. Comparative analysis of the LPS biosynthetic loci of the genetic subtypes of serovar Hardjo: *Leptospira interrogans* Subtype Hardjoprajitno and *Leptospira borgpetersenii* Subtype Hardjobovis. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.177, n.2, p.319-326, Ago., 1999.

PETCHCLAI, B.; HIRANRA, S. S.; POTHAI, U. Gold immunoblot analysis of IgM-specific antibody in the diagnosis of human leptospirosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.45, n.6, p.672-675, Dez., 1991.

PLANK, R.; DEAN, D. Overview of the epidemiology, microbiology and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. **Microbes and Infection**, Paris, v.2, n.10, p.1265-1276, Ago, 2000.

RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. Reverse Vaccinology and Genomics. **Science**, Nova York, v.302, n.5645, p.602, Out., 2003.

RIBEIRO, M. A.; SOUZA, C. C.; ALMEIDA, S. H. Dot-ELISA for human leptospirosis employing immunodominant antigen. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Oxford, v.98, n.6, p.452-456, Dez., 1995.

ROSE, M. E.; ORLANS, E.; BUTTRESS, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. **European Journal of Immunology**, Baltimore, v.4, n.7, p.521-523, Jul., 1974.

RUSSEL, M. Filamentous phage assembly. **Molecular Microbiology**, Salem, v.5, n.7, p.1607-1613, 1991.

RUSSEL, M.; LOWMAN, H. B.; CLACKSON, T. (2004) Introduction to *phage display* and phage biology. In *Phage Display: A Practical Approach* (Clackson, T. and Lowman, H., eds), p. 1-26, Oxford University Press. Disponível em: <<http://fds.oup.com/www.oup.co.uk/pdf/0-19-963873-X.pdf>>

SCHADE, R.; FISTER, C. P.; HALATSCH, R.; HENKLEIN, P. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk-an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. **ATLA**, Nottingham, v.19, p.403-419, 1991.

SCHADE, R.; STAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; van REGENMORTEL, M.; RIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY - The report and recommendations of ECVAM workshop 21. **ATLA**, Nottingham, v.24, p.925-934, 1996.

SERGEEVA, A.; KOLONIN, M.G.; MOLLDREM, J. J.; PASQUALINI, R.; ARAP, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.58, n.15, p.1622-1654, Dez., 2006.

SERRUTO, D.; ADU-BOBIE, J.; CAPECCHI, B.; RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; MASIGNANI, V. Biotechnology and Vaccines: Application of Functional Genomics to *Neisseria meningitides* and Other Bacterial Pathogens. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.113, n.1-3, p.15-32, Set., 2004.

SHANG, E. S.; SUMMERS, T. A.; HAAKE, D. A. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding LipL41, a surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, Washington, v.64, n.6, p.2322-2330, Jun., 1996.

SHIMIZU, M.; NAGASHIMA, H.; SANO, K.; HASHIMOTO, K.; OZEKI, M.; TSUDA, K.; HATTA, H. Molecular Stability of chicken and rabbit immunoglobulin G. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.56, n.2, p.270-274, Fev., 1992.

SILVA, É. 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**, Kidlington, v.25, n.33, p 6277-6286, Ago., 2007.

SMITH, G. P.; PETRENKO, V. A. Phage Display. **Immunotechnology**, Nova York, v.97, n.2, p.391- 410, Jan., 1997.

TERPSTRA, W. J.; SCHOONEG, J.; TERS CHEGGETJ. Detection of leptospiral DNA by nucleic acid hybridization with **32P**- and biotin-labelled probes. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.22, n.1, p.23-28, Ago., 1986.

TERPSTRA, W. J.; SCHOONEG, J.; LIGTHARTG, S.; TER SCHEGGETJ. Detection of *Leptospira interrogans* in clinical specimens by *in situ* hybridization using biotin-labelled DNA probes. **Journal of General Microbiology**, Londres, v.133, n.4, p.911-914, Abr., 1987.

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**, Bethesda, v.19, n.4, p.1587–1593, Abr., 2008.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.131, n.3., p.569-574, Mar., 2002.

THONGBOONKERD, V. Proteomics in Leptospirosis Research: Towards Molecular Diagnostics and Vaccine Development. **Expert Reviews of Molecular Diagnostics**, Londres, v.8, n.1, p.53-61, Jan., 2008.

VERMA, A.; HELLWAGE J.; ARTIUSHIN, S.; ZIPFEL, P. F.; KRAICZY, P.; TIMONEY, J. F.; STEVENSON, B. LfhA, a novel factor H-binding protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.5, p.2659–2666, Mai., 2006.

YAN, K.T.; ELLIS, W.A.; MACKIE, D.P.; T AYLOR, M.J.; MCDONNEL, S.W.J.; MONTGOMERY, J.M. Development of an ELISA to detect antibody to protective lipopolysaccharide fraction of *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo in cattle. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.69, n.3, p.173-187, Set., 1999.

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY (WHO). **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva: World Health Organization/International Leptospirosis Society, 2003.

CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS Y POLICLONAIS ANTI-LEPTOSPIRA spp.

RESUMO - Objetivou-se verificar se galinhas imunizadas com uma solução de *Leptospiras* inativadas e proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo, poderiam produzir anticorpos policlonais específicos anti-*Leptospiras*, detectáveis em testes ELISA. Foram imunizados oito galinhas com 25 semanas de idade, da raça *White Leghorn*, sendo três imunizadas com uma suspensão de *Leptospiras* inativadas, três com uma solução de proteínas de membrana externa extraída do sorovar Hardjo e duas controle. Coletas de sangue foram realizadas quinzenalmente e de ovos diariamente. A IgY foi purificada a partir da gema dos ovos utilizando para a delipidação o método de diluição em água ácida e a precipitação com sulfato de amônio. Realizou-se testes ELISA para verificar a especificidade da IgY, nestes foi possível observar a produção de anticorpos anti-*Leptospira*, tanto no soro quanto nas gemas purificadas. O pico de produção de anticorpos específicos ocorreu na 5ª semana após a primeira imunização. Foi possível induzir a produção de anticorpos específicos em galinhas, por meio de imunizações destas com *Leptospira* inativada e proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo. Galinhas imunizadas com uma suspensão de *Leptospiras* inativadas e com PME de *Leptospira interrogans* do sorovar Hardjo produziram anticorpos reativos a PME Hardjo detectáveis por teste ELISA.

Palavras-chave: Galinhas, gema de ovos, *Leptospira interrogans*, leptospirose

CHAPTER 2 – PRODUCTION AND PURIFICATION OF IMMUNOGLOBULIN Y POLYCLONAL ANTI- LEPTOSPIRA

ABSTRACT - The dissertation was divided in two chapters. The aim was to determine whether hens immunized with an inactivated suspension of *Leptospira* and a solution of outer membrane proteins extracted from the serovar Hardjo, could produce specific polyclonal antibodies to *Leptospira*, detected in ELISA assay. Eight hens White Leghorn race with 25-weeks-old were immunized, three with an inactivated suspension of *Leptospira*, three with a solution of outer membrane proteins (OMP) extracted from the serovar Hardjo and two controls immunized with saline. Blood samples were collected fortnightly and eggs daily. The IgY was purified from the egg yolk using the method for the delipidation of dilution with water acidic and ammonium sulfate precipitation. The ELISA assay was performed to verify the specificity of the IgY, these was possible to observe the production of specific antibody to *Leptospira* both in serum and purified egg yolk. The specific antibody titers peaked in the fifth week post immunization. The production of polyclonal IgY was effective for producing high titers of specific antibodies.

Key words: hens, *Leptospira interrogans*, leptospirosis

2.1 INTRODUÇÃO

Os anticorpos são moléculas com elevada especificidade para a ligação e inativação de substâncias externas, tais como moléculas tóxicas ou antígenos, que são capazes de invadir o corpo (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004). Em razão disto, tem sido utilizado para fins de diagnóstico, terapia e inativação de substâncias (REILLY et al., 1996).

Os anticorpos específicos, policlonais ou monoclonais, atualmente disponíveis para pesquisa, diagnóstico e terapias são obtidos principalmente de mamíferos, entre eles coelhos e ratos, respectivamente (NARAT, 2003).

De maneira alternativa, os anticorpos purificados da gema de ovos de galinhas imunizadas, denominados imunoglobulinas Y ou IgY (do inglês *yolk* = gema), tem se mostrado úteis em várias aplicações, entre elas imunodiagnóstico, imunoterapia e estudos de proteômica (KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004). A utilização dos anticorpos IgY policlonais, apresenta vantagens em comparação com os anticorpos IgG de mamíferos, tais como, a redução do número de animais imunizados; elevada quantidade de anticorpos purificados por mL de gema sem a sangria da galinha e normalmente os métodos de extração de imunoglobulinas da gema são de baixo custo e de fácil execução (SCHADE et al., 1996; KARLSSON; KOLLBERG; LARSSON, 2004).

Além disso, os anticorpos IgY evitam a ocorrência de resultados falsos-positivos nas técnicas de imunoensaio que empregam amostras de soro ou células de mamíferos, pois não sofrem interferência com o fator reumatóide; não fixam o complemento e não interagem com o receptor para Fc dos mamíferos. Em relação à purificação, os anticorpos IgY não se ligam às proteínas A e B de *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., respectivamente (TINI et al, 2002; CARLANDER et al., 2002; ZHANG, 2003).

A distância filogenética entre galinhas e mamíferos torna possível a produção de anticorpos contra proteínas altamente conservadas de mamíferos (LARSSON et al., 1998). Além disso, anticorpos de galinha reconhecem epitopos diferentes dos anticorpos de mamíferos, aumentando assim o número de anticorpos diferentes e consequentemente a possibilidade de ligação (CARLANDER et al., 1999).

Atualmente é imprescindível o desenvolvimento de uma vacina multivalente protetora e de amplo espectro contra a leptospirose e também de um novo método diagnóstico, em virtude das desvantagens apresentadas pelos métodos atuais, sendo assim, objetivou-se verificar a resposta imune humoral de galinhas imunizadas com uma solução de *Leptospiras*

inativadas e proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo, por meio da verificação de níveis de anticorpos policlonais anti-Leptospiras, em testes ELISA.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADO-UFU) e no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (INGEB-UFU).

2.2.1 Obtenção do Antígeno

As cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas foram fornecidas pelo Laboratório de Doenças Infectocontagiosas FAMEV-UFU. Para o preparo de uma suspensão de Leptospiras inativadas, as bactérias foram cultivadas em caldo EMJH (meio Ellinghausen e McCullough modificado por Johnson e Harris, 1967) por 7 a 10 dias em estufa bacteriológica com temperatura entre 28 e 29°C (FAINE, 1999). Foram utilizados 14 sorovares: Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi e Wolffi.

Após atingir a densidade de 1 a 2 x 10⁸ leptospiras/mL, os cultivos foram centrifugados a 13.000rpm durante 30 minutos, o pellet contendo as células foi diluído em PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, K₂HPO₄ 1,2 mM, pH 7,4) estéril, e comparada com a escala de Macfarland 0,5 para que se atingisse uma densidade final aproximada de 1x10⁸ leptospiras/mL, e em seguida as bactérias foram inativadas a 56°C por 16-18 horas (SURUJBALLI; ELMGREN, 2000).

A extração de proteínas de membrana externa (PME) de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo foi realizada utilizando-se a metodologia descrita por HAAKE et al. (1991). Um cultivo de *L. interrogans* sorovar Hardjo com sete dias de crescimento foi centrifugado a 13.000 x g a 4°C, durante 10 minutos, o sobrenadante foi então descartado e o *pellet* ressuspenso em PBS pH 7,4 acrescido de 5 mM MgCl₂, por três vezes consecutivas. Posteriormente o pellet foi ressuspenso em TE (10mM de Tris hidrocloreto - 2mM EDTA), pH 7,4, adicionado de 1% de TritonX114 (v/v) (*Sigma-Aldrich*). Esta suspensão foi incubada a 4°C por 30 minutos. A suspensão foi então centrifugada a 17.000 x g, a 4°C durante 10

minutos, descartou-se o *pellet* e adicionou-se 2% de Triton X114 (v/v) ao sobrenadante, que após aquecimento a 37°C por 10 minutos, foi centrifugado a 2.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Após a centrifugação as duas fases presentes, aquosa e detergente, foram separadas e submetidas a um banho de gelo por 10 minutos. Acrescentou-se a fase aquosa 2% de Triton X114 (v/v) e a fase detergente nove partes do tampão TE, pH 7,4, incubou-se por 10 minutos a 37°C e depois centrifugou-se a 2.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Os procedimentos de separação de fases, resfriamento, adição de reagentes, aquecimento e centrifugação foram repetidos quatro vezes. As fases detergente e aquosa foram então separadas.

As duas frações foram precipitadas em acetona segundo Cunningham (1988), adicionou-se 10X o volume de acetona (Vetec, PA) e incubou-se no gelo por 45 minutos. Após incubação as frações foram centrifugadas a 14.000 x g, a 4°C, por 30 minutos. A acetona presente no sobrenadante foi então descartada e o *pellet* ressuscitado em PBS e estocado a -20°C

2.2.2 Imunização

Foram imunizadas oito galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn*, com 25 semanas de idade, cedidas pela granja Planalto de Uberlândia-MG, as quais foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais (Tabela1). O esquema de imunizações foi realizado de acordo com Barbas et al. (2001).

Tabela 1: Grupos experimentais e tipo de imunização utilizada, Uberlândia, 2012.

Grupo	n	Imunização
1	2	PBS + Adjuvante*
2	3	Suspensão de <i>Leptospiras</i> inativadas diluídas em PBS + Adjuvante*
3	3	Solução de proteínas de membrana externa sorovar Hardjo diluídas em PBS + Adjuvante*

* Adjuvante de Freund (Sigma Chemical Co.)

As imunizações foram realizadas com intervalos de 15 dias, sendo que na primeira foi usado o adjuvante completo de Freund (Sigma) e nas seguintes o adjuvante incompleto de Freund (Sigma), correspondendo a 50% do volume total da solução. Administrou-se 500 µL (250 µl do antígeno diluído em PBS e 250 µl de adjuvante) profundamente no músculo

peitoral da galinha, dividindo o volume total em quatro pontos diferentes, foi feito o acompanhamento para avaliação de reações pós-vacinais.

O Grupo 1 foi imunizado quatro vezes com 250 µl de PBS, enquanto Grupo 2 foi imunizado quatro vezes com 250 µl da suspensão de *Leptospiras* inativadas (densidade de 1×10^8 células/mL) e o Grupo 3 três vezes com 200 µg de PME do sorovar Hardjo diluída em 250 µl de PBS.

Foram realizadas coletas de sangue quinzenais, 1mL na asa (veia ulnar). Os ovos foram coletados diariamente a partir de uma semana antes da inoculação (pré-inoculação). Após a coleta, os ovos foram separados por semana, e estocados a 4°C até a realização do processo de delipidação.

2.2.3 Purificação das imunoglobulinas IgY policlonais totais

As gemas dos ovos foram cuidadosamente separadas da clara e lavadas com água ultrapura para a remoção de resíduos de clara. Em seguida, a membrana vitelínica foi rompida e a gema foi coletada em frascos cônicos de 50 mL, os quais foram armazenados a -20°C até o momento da purificação. Ao final do procedimento, obteve-se um *pool* semanal de gemas para cada um dos três grupos de galinhas imunizadas.

A purificação dos anticorpos IgY totais se iniciou pela delipidação, remoção da fração lipídica da gema, segundo Akita e Nakai (1993). A gema pura foi diluída com água ultrapura na proporção 1:10 (v/v), após a homogeneização o pH da mistura foi ajustado para uma faixa entre 5,0-5,2, por meio de gotejamento de HCl 0,1N e, em seguida, a mistura acidificada foi armazenada a 4°C *overnight*. Após esse período a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 25 minutos a 4°C. O *pellet* contendo a fração rica em lipídeos foi descartado e o sobrenadante contendo os anticorpos totais, foi filtrado (filtro de 0,45µm Millipore). A amostra filtrada teve seu pH ajustado para 7,4 com PBS 10x e após isso foi armazenada a -20°C.

Após a delipidação, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio (Synth) baseado no protocolo de Araújo et al. (2010) onde se adicionou sulfato a amostra filtrada na concentração de 20% (p/v) sob agitação durante 30 minutos a 4°C. Após esse tempo o material foi centrifugado a 2.000xg por 30 minutos a 4°C, com isso o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em PBS 1x, pH 7,4.

Por fim foi realizada a diálise das amostras em uma membrana de AMICOM (Amicom Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Millipore), onde se colocava a amostra juntamente com PBS, pH 7,4 para centrifugar a 4.000 x g por 30 minutos, 4°C, esse procedimento foi realizado três vezes.

Após o término da extração das imunoglobulinas IgY totais, a concentração proteica foi obtida em todas as frações por meio do método de Bradford (1976) e a pureza das preparações foi investigada por eletroforese unidimensional. Utilizou-se gel de poliacrilamida a 16% (p/v), aplicando-se 10µg de amostra por poço. A visualização das bandas proteicas foi feita através da coloração do gel com *Coomassie Blue* R250 (Sigma).

2.2.4 ELISA para confirmar a especificidade da IgY

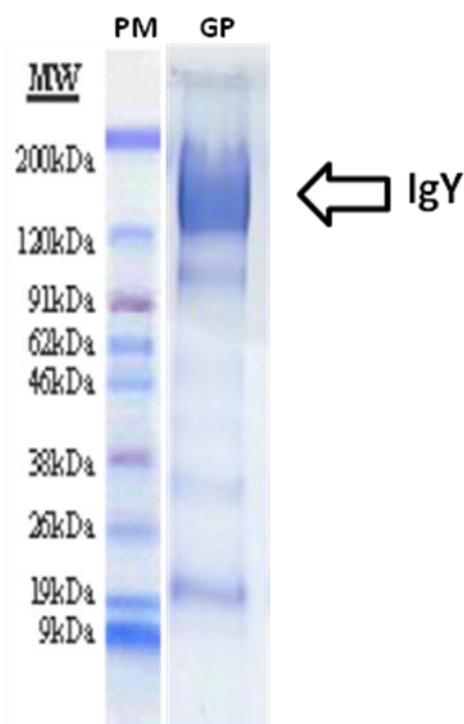
Duas placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc) foram sensibilizadas com 50µL/poço de proteínas de Membrana Externa do sorovar Hardjo a uma concentração de 10µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato (NaHCO_3 0,1M, pH8,6) e incubadas durante a noite a 4°C. Em seguida os sítios remanescentes para ligações inespecíficas foram bloqueados com tampão Tris-HCl acrescido de leite em pó desnatado na concentração de 5% (p/v) (TBS-M), durante 2 horas a 37°C. Após incubação foi realizado um ciclo de três lavagens com tampão TBS.

Amostras de 50 µL das IgY totais, correspondentes ao *pool* de gemas de cada uma das dez semanas do experimento de imunização, diluídas a 1:50 em TBS acrescido de 0,05% de Tween 20 e 5% de leite em pó desnatado (TBS-TM), foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Após esse procedimento um segundo ciclo de lavagens idêntico foi executado. A detecção de IgY foi feita pela incubação com anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcados com peroxidase (Sigma) diluídos 1:5000 em PBS-TM por 60 minutos, 37°C. Foi realizado um ultimo ciclo de lavagens e, em seguida, realizou-se a revelação por meio da adição de 50 µL/poço de orto-fenilenodiamina (OPD) (DAKO) acrescido de H_2O_2 a 30%. Após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 µL/poço de H_2SO_4 (2N), efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca (Thermo Plate - TP-Reader).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eletroforese da IgY purificada das gemas de ovos (Figura 1) demonstrou que o processo de purificação com sulfato de amônio a 20% não foi totalmente eficiente, uma vez que há formação de outras bandas além da de IgY, resultado que discorda com outros estudos que afirmam que este seria o método mais eficiente de purificação com alta pureza (SVENDSEN et al, 1995, ARAÚJO, 2007). Nota-se que a banda de IgY, encontra-se um pouco abaixo de 200 Kd, na literatura há divergência quanto ao PM da IgY, alguns autores afirmam ter esta molécula 167,25 kDa (CARLANDER, 2002; CHACANA et al., 2004). Enquanto Leslie e Clem (1969) relataram um peso molecular de até 206 kDa, e Devi et al. (2002) estabeleceram seu peso em 190 kDa, no entanto foi estabelecido pela maioria dos autores em torno de 180Kd (WARR et al., 1995; AKITA; LI-CHAN; NAKAI, 1998; BIZANOV et al., 2004).

Figura 1: Perfil eletroforético da IgY das gemas de ovos purificadas com sulfato de amônio. PM - Padrão de peso molecular (Amresco), GP – gema purificada.

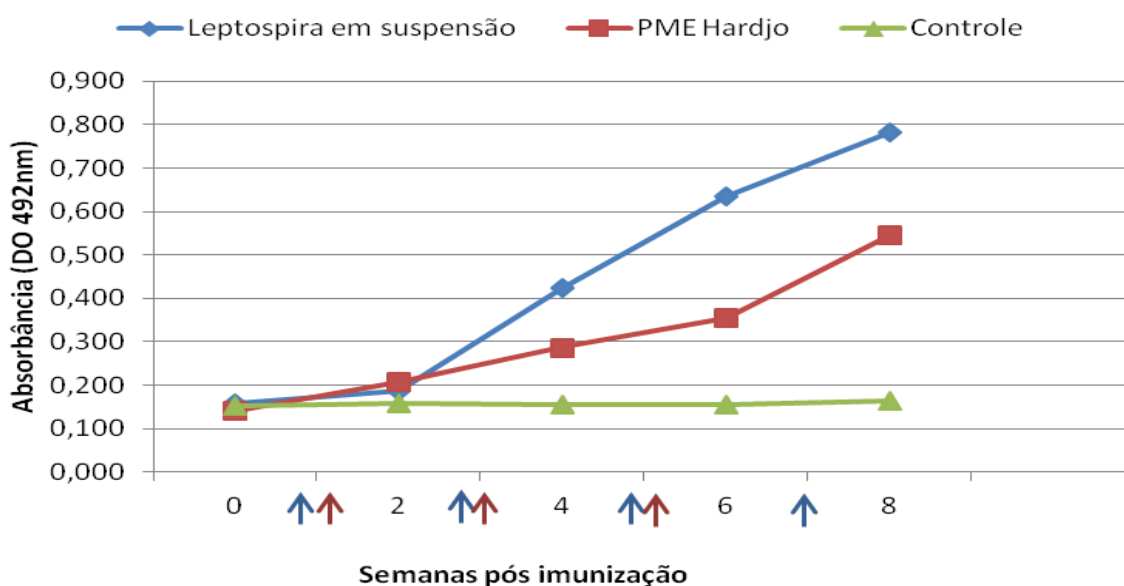


Observou-se que a partir da 2ª semana pós-imunização houve um aumento no título de anticorpos específicos anti-PME Hardjo e anti-*Leptospira* (Figura 2), embora esta resposta

tenha sido baixa, resultado que se assemelha aos encontrados por Almeida et al. (1998) que observaram aumento do título de anticorpos após a segunda imunização.

Observa-se ainda que a atividade dos anticorpos do grupo controle foi baixa e permaneceu inalterada durante o experimento. O que indica que sua atividade específica foi insignificante e, portanto, poderia ser empregada como um controle negativo em experiências subsequentes.

Figura 2: Curva de absorbância de IgY nas amostras de soro de galinhas obtidas pelo teste ELISA durante 8 semanas pós imunização



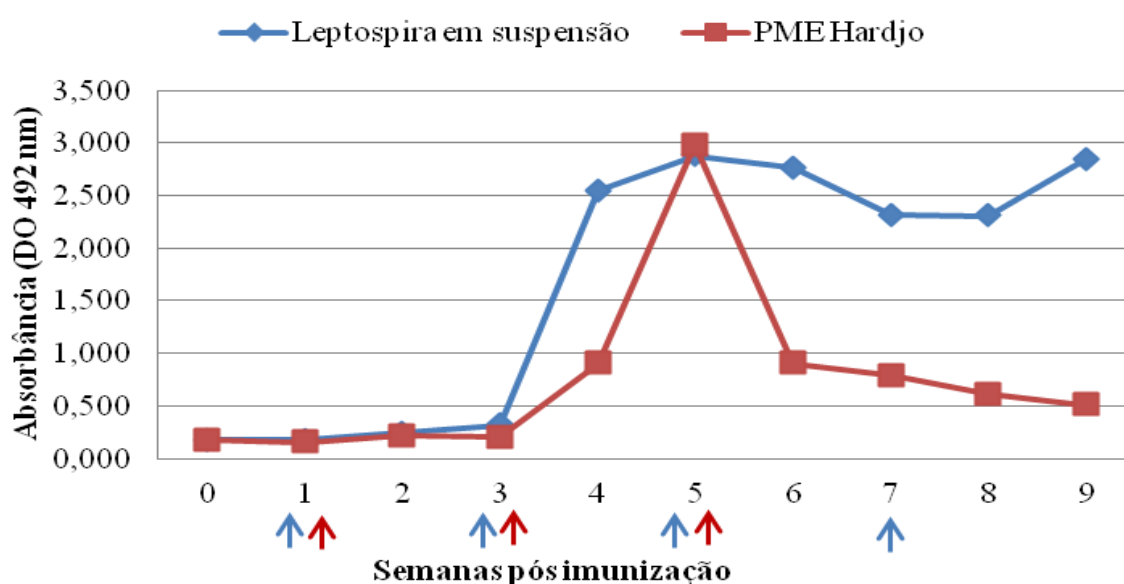
A Figura 3 mostra o perfil cinético da resposta imunológica resposta durante 10 semanas na gema.

Na 4ª semana, duas semanas após a segunda imunização observa-se um aumento considerável no título de anticorpos, resultado que confirma o descrito por Narat (2003) que relatou que a presença de anticorpos na gema deve ser verificada após a segunda imunização.

Os títulos de anticorpo anti-PME e anti-Lepto nas gemas de ovos atingiram o pico na quinta semana após a inoculação. O perfil cinético encontrado difere do observado por Bizanov e Jonauskienė (2003) e Bizhanov; Jonauskienė e Hau (2004), pois nestes o título de anticorpos na gema começou a aumentar na segunda semana após a primeira inoculação e aumenta de forma constante nas próximas semanas. Estas diferenças podem ser devido a diferenças de imunogenicidade entre os antígenos, bem como à utilização de diferentes esquemas de vacinação, raças diferentes de galinhas e ensaios diferentes empregados (BIZHANOV; VYSHNIAUSKIS, 2000).

No entanto o perfil se assemelha ao encontrado por Paul (2007) e Araújo et al. (2010), que obtiveram um aumento significativo dos anticorpos específico somente após a segunda inoculação, e o pico de anticorpos na quarta e quinta semana pós imunização, respectivamente.

Figura 3: Cinética de produção de IgY nas amostras de gema de ovo de galinhas obtida pelo teste ELISA durante 10 semanas. As setas vermelhas indicam as imunizações com PME e as setas azuis as imunizações com *Leptospira* em suspensão



No grupo inoculado com PME observa-se que houve queda acentuada na produção de anticorpos após a 7ª semana, provavelmente, isso se deve ao fato de terem sido realizadas apenas três inoculações enquanto no grupo inoculado com *Leptospira* em suspensão foram realizadas quatro inoculações ou mesmo devido a diferenças de imunogenicidade entre os antígenos (BIZHANOV; VYSHNIAUSKIS, 2000).

Segundo CHEN et al. (2002) e PAULY et al. (2009) a queda na concentração de anticorpos, não é um fenômeno desejado, e sua ocorrência pode ser revertida por meio de reaplicação do antígeno.

Quando se compara a resposta sérica e a resposta na gema observa-se que a detecção de anticorpos na gema ocorre com um atraso de aproximadamente sete dias, depois da detecção sérica, fato que pode ser explicado em virtude do tempo requerido para o desenvolvimento do folículo ovariano e ovopostura (PEI; COLLISSON, 2005; DAVISON; MAGOR; KASPERS, 2008).

Foi possível verificar que as galinhas que foram inoculadas com uma suspensão de *Leptospira* inativada, quanto os animais imunizados com PME de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo produziram anticorpos capazes de reconhecer as PME de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, utilizada como antígeno no ELISA. Segundo Lafetá (2006) o perfil protéico das proteínas de membrana externa da *Letpospira interrogans* sorovar Hardjo possui muitas similaridades com o perfil protéico da membrana externa de *L. interrogans*, portanto devido a essa semelhança essas foram utilizadas como antígeno no ELISA.

Por demonstrarem especificidade a *Leptospira*, estes anticorpos poderiam ser utilizados em testes diagnósticos para leptospirose, que visem a detecção de antígeno. Segundo Tini et al. (2002) a IgY pode ser usada em praticamente todos os métodos de imunodiagnóstico tradicionalmente desenvolvidos com IgG de mamíferos ou seja, imunofluorescência, ELISA, técnicas de imunoeletroforese, Western blotting, imunohistoquímica, e muitos outros (TINI et al., 2002).

Os anticorpos IgY apresentam vantagens em relação aos de mamíferos, que são geralmente usados para imunodiagnóstico, pois não ativam o sistema complemento de mamíferos e não interagem com o fator reumatoide, diminuindo assim a ocorrência de resultados falso-positivos (LARSON et al. 1992).

Esses resultados reforçam os obtidos anteriormente onde já foram caracterizados como bons antígenos e imunógenos várias PME de *Leptospira* (HAAKE et al., 2000; CULLEN et al., 2003; KOIZUMI; WATANABE, 2005; MATSUNAGA et al. 2006; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007), sendo que o diferencial desse estudo foi a utilização de imunoglobulinas (IgY) produzidas em galinhas anti-*Leptospira* e anti-PME de *Leptospira*.

2.4 CONCLUSÃO

Galinhas imunizadas com uma suspensão de *Leptospiras* inativadas e com PME de *Leptospira interrogans* do sorovar Hardjo produziram anticorpos reativos a PME Hardjo detectáveis por teste ELISA.

REFERÊNCIAS

- AKITA, E. M.; LI-CHAN, E. C.; NAKAI, S. Neutralization of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin by chicken egg yolk immunoglobulin Y and its antigen-binding fragments. **Food and Agricultural Immunology**, Abingdon, v.10, n.2, p.161–172, 1998.
- 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**, Amsterdam, v.160, n.2, p.207–214, Abr., 1993.
- ALMEIDA, C. M. C.; KANASHIRO, M. M.; RANGEL FILHO, F. B.; MATA, M. F.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, W. D. Development of snake antivenom antibodies in chicken and their purification from yolk. **Veterinary Record**, Londres, v.143, n.21, p.579, 1998.
- ARAÚJO, A. S. **Produção de antiveneno botrópico em ovos de galinha**. 2007. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ARAUJO, A. S.; LOBATO, Z. I. P.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; VELARDE, D. T. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: Studies on the development of a process in chicken egg yolk. **Toxicon**, Elmsford, v.55, n.4, p.739–744, Abr., 2010.
- BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Phage Display: A Laboratory Manual. **Plain view**, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- BIZANOV, G.; JONAUSKIENÉ, I. Production and purification of IgY from egg yolk after immunization of hens with pig IgG. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v.47, p.403, 2003.
- BIZANOV, G.; JONAUSKIENE, I.; HAU, J. A novel method, based on lithium sulfate precipitation for purification of chicken egg yolk immunoglobulin Y, applied to immunospecific antibodies against Sendai virus. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v.31, n.3, p.121, 2004.
- BIZHANOV, G.; VYSHNIAUSKIS, G. A comparison of three methods for extracting IgY from the egg yolk of hens immunized with Sendai virus. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.24, n.2, p.103–113, Mar., 2000.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Nova York, v.72, p.248-254, Mai., 1976.
- CARLANDER, D. **Avian IgY antibody. In vitro and in vivo**. 2002. 53f. Tese (Doutorado em Química Clínica) – Uppsala University, Sweden, 2002.
- CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJÅKER, P. E.; LARSSON, A. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization by gargling with specific antibodies. In: SIM, J. S. (Ed.). **Egg Nutrition and Biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1999. p.371-374.

CHACANA, P.A.; TERZOLO, H.R.; GUTIERREZ CALZADO, E.; SCHADE R. Tecnologia IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista Medicina Veterinaria**, v.85, n.5, p.179-189, 2004.

CHEN, C. C.; TU, Y. Y.; CHEN, T. L.; CHANG, H. M. Isolation and characterization of immunoglobulin in yolk (IgY) specific against hen egg white lysozyme by immunoaffinity chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.19, p. 5424-5428, Set., 2002.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.5, p.2414 – 2421, Mai. 2003.

CUNNINGHAM, T. M.; WALKER, E. M.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. A. Selective release of *Treponema pallidum* outer membrane and associated polypeptides with triton x-114. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, n.12, p.5789-5796, Dez., 1988.

DAVISON, F.; MAGOR, K. E.; KASPERS B. Structure and evolution of avian immunoglobulins. In: Davison, F.; Kaspers, B.; Schat, K. A.(Ed.). **Avian immunology**. London: Academic Press, 2008. p. 107–127.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 3. ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

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

HAAKE, D. A.; WALKER, E. M.; BLANCO, D. R. et al. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippityphosa during “in vitro” cultivation. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, n.3, p.1131-1140, Mar., 1991.

KARLSSON, M.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science**, Ithaca, v.60, p.341-348, n.3, p.341-348, Set., 2004.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospirosis Vaccines: Past, Present, and Future. **Journal of Postgraduate Medical**, Bombay, v.51, n.3, p.210-214, Jul./Set., 2005.

LAFETÁ, B.N. **Perfil protéico da membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovariedade hardoprajitno**. 2006. 36 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Immune response in chicken with different amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, Abingdon, v.10, n.1, p. 29-36, 1998.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, Nova York, p.1130, n.6, 1337-1352, Dez., 1969.

MATSUNAGA, J.; WERNEID, K.; ZUERNER, R. L.; FRANK, A.; HAAKE, D. A. LipL46 is a novel surface-exposed lipoprotein expressed during leptospiral dissemination in the mammalian host. **Microbiology**, v.152, n.12, p.3777–3786, Dez., 2006.

NARAT, M. Production of Antibodies in Chickens. **Food Technology and Biotechnology**, v.41, n.3, p.259–267, 2003.

PALANIAPPAN, R. U.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.3, p.1745-1750, Mar., 2006

PAUL, K.; MANJULA, J.; DEEPA, E. P.; SELVANAYAGAM, Z. E.; GANESH, K. A.; SUBBARAO, P. V. Anti-Echis carinatus venom antibodies from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, Elmsford, v.50, n.7, p.893, Dez., 2007.

PAULY, D.; DORNER, M.; ZHANG, X.; HLINAK, A.; DORNER, B.; SCHADE, R. Monitoring of laying capacity, immunoglobulin Y concentration, and antibody titer development in chickens immunized with ricin and botulinum toxins over a two-year period. **Poultry Science**, Champaign, v.88, n.2, p.281-290, Fev., 2009.

PEI, J.; COLLISSON, E. W. Specific antibody secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory corona-virus. **Developmental & Comparative Immunology**, Nova York, v.29, n.2, p.153–160, 2005.

REILLY, M. R.; DOMINGO, R.; SANDHU, J. Oral delivery of antibodies: future pharmacokinetic trends. **Clinical Pharmacokinetics**, Auckland, v.32, n.4, p.313-323, Abr., 1997.

SCHADE, R.; STAK, C.; HENDRIKSEN, C.; ERHARD, M.; HUGL, H.; KOCH, G.; LARSSON, A.; POLLMANN, W.; van REGENMORTEL, M.; RIJKE, E.; SPIELMANN, H.; STEINBUSCH, H.; STRAUGHAN, D. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY - The report and recommendations of ECVAM workshop 21. **ATLA**, Nottingham, v.24, p.925-934, 1996.

SVENDSEN, L.; CROELEY, A.; OSTERGAARD, L. H.; STODULSKI, G.; J. HAU. Development and comparison of purification strategies for chicken antibodies from egg yolk. **Laboratory Animal Science**, Memphis, v.45, n.1, p.89–93, Fev., 1995.

SURUJBALLI, O.; ELMGREN, C. Monoclonal antibodies suitable for incorporation into a competitive enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.71, n1-2, p.149-159, Jan., 2000.

TINI, M.; JEWELL, U. R.; CAMENISCH, G.; CHILOV, D.; GASSMANN, M. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.131, n.3., p.569-574, Mar., 2002.

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

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

CAPÍTULO 3 - SELEÇÃO DE PEPTÍDEOS RECONHECIDOS POR IMUNOGLOBULINAS Y ANTI-LEPTOSPIRA spp

RESUMO - Objetivou-se com identificar epítomos ou mimetopos (sequências que imitam epítomos verdadeiros), por meio da técnica de *phage display* tendo como alvo anticorpos IgY anti-Leptospira e anti-PME Hardjo. Os anticorpos IgY utilizados como alvo foram produzidos em galinhas imunizadas com proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovar sorovar Hardjo (anti-PME Hardjo), suspensão de Leptospiras inativada (anti-Leptospira) e IgY controle. No *biopanning* uma biblioteca comercial de peptídeos randômicos *Ph.D. 12 mer*, New England BioLabs®Inc foi incubada primeiramente com a IgY controle, realizando um processo denominado seleção negativa e depois com a IgY anti-Leptospira e anti-PME Hardjo, a eluição dos fagos selecionados foi então realizada de forma competitiva e ácida. Após três ciclos de seleção, 288 clones foram isolados e sequenciados, gerando 132 sequências válidas. Os clones foram submetidos a testes ELISA com o anticorpo usado como alvo no *biopanning* para verificar a especificidade destes. Nos resultados dos testes ELISAs verificou-se que nove fagos (PMEcomp17, PMEac10, PMEac12, PMEac19, PMEac29, PMEac35, Lep6, Lep7 e Lep20) apresentaram melhores resultados. Estes foram alinhados com a sequência primária de proteínas de *Leptospira* spp e *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo, e as análises *in Silico* mostraram que os nove peptídeos têm similaridade com proteínas imunogênicas de Leptospiras. Foram selecionados nove peptídeos com similaridade a proteínas de *Leptospira interrogans* consideradas imunogênicas. Os peptídeos foram similares a proteínas de membrana externa, lipoproteína, LipL32, LipL41, LigA, SecY, LenE.

Palavras chave: Leptospirose. *Phage display*. Proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans*

CHAPTER 3 – SELECTION OF PEPTIDES RECOGNIZED BY ANTI-IMMUNOGLOBULIN Y LEPTOSPIRA

ABSTRACT - The objective of identifying epitopes or mimetops mimetic sequence of the true epitopes) through technique of phage display using IgY specific to *Leptospira*, outer membrane proteins the serovar Hardjo and IgY control. To realize the biopanning was used a commercial library of random peptides Ph.D. 12 mer, *New England BioLabs®Inc Phage Display Library* was first incubated with IgY control, performing a process called negative selection, and then with IgY specific to *Leptospira* and to OMP *Leptospira* Hardjo, selected phages were eluted competitively and acid. After three rounds of selection, 288 clones were isolated and sequenced, generating 132 valid sequences. The selected clones were tested in diagnosis by ELISA assay with the antibody used as a biopanning target in order to verify the specificity of these. The results of ELISA testing it was found that nine phage (PMEcomp17, PMEac10, PMEac12, PMEac19, PMEac29, PMEac35, Lep6, Lep7 e Lep20) showed better results. These were aligned with the primary sequence of proteins of *Leptospira* spp. and *Leptospira interrogans* serovar Hardjo and insilico analyzes showed that nine peptides has similarity with immunogenic proteins of *Leptospira*. In this work we selected nine peptides with similarity to proteins of *Leptospira interrogans* that were considered immunogenic. The peptides were similar to outer membrane proteins, lipoprotein, LipL32, LipL41, LigA, SecY, LenE.

Key words: Leptospirosis. Phage display. Outer membrane proteins of *Leptospira interrogans*

3.1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antroponose, de ampla distribuição mundial causada por bactérias do gênero *Leptospira*, o qual atualmente é composto por 19 espécies e mais de 300 sorovares (ADLER; MOCTEZUMA, 2010). A existência de tantas sorovariedades se deve a mudanças na composição do lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa da bactéria (ZUERNER et al., 2000).

As perdas econômicas e os danos a saúde pública causados pela doença justificam o uso de vacinas contra leptospirose, tanto em humanos como em animais. Na medicina veterinária, as vacinas convencionais são baseadas na célula inteira inativada (bacterinas), as quais estimulam imunidade restrita (6 a 12 meses), ou em preparados da membrana de leptospiros patogênicos (HARTWIG, 2006). Em humanos as bacterinas não são bem aceitas por serem reatogênicas (ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Essas vacinas promovem uma resposta imune contra o LPS destas bactérias, sendo portanto, restrita a sorovares antigenicamente relacionados (PETERSEN et al., 2001; BHARTI et al., 2003) prevenindo o desenvolvimento da doença, mas não a leptospiúria (ALT, ZUERNER, BOLIN, 2001). Sendo assim, o grande número de sorovares patogênicos impõe uma grande limitação para a produção de uma vacina com componentes multi-sorovar (GAMBERINI et al., 2005).

O diagnóstico laboratorial da leptospirose está baseado principalmente na detecção de anticorpos circulantes, sendo que o teste de referência é a soroaglutinação microscópica de campo escuro (SAM).

No entanto, este apresenta desvantagens, como: é considerado um teste subjetivo, pois o ponto de corte é a maior diluição de soro em que ocorre 50% aglutinação, dependendo assim do observador; utiliza cepas vivas de leptospiros, o que oferece riscos aos técnicos de laboratório; a interpretação deste teste é complicada pelo elevado grau de reações cruzadas que ocorre entre os diferentes sorogrupos, especialmente em amostras de fase aguda; não discrimina entre anticorpos resultantes de vacinação ou infecção; possui baixa sensibilidade, especialmente na fase inicial da doença (WHO, 2003; McBRIDE et al., 2005; ADLER; MOCTEZUMA, 2010).

Devido a complexidade e desvantagens da SAM e também em decorrência da baixa eficiência das vacinas comercializadas, necessita-se de novos métodos diagnósticos mais eficientes e antígenos vacinais que induzam a imunidade contra a infecção por um maior período e ainda sejam multivalente, atingindo diversos sorovares.

Nesta perspectiva, as proteínas conservadas entre as *Leptospiras* patogênicas tem sido o foco das pesquisas atuais, pois estas poderiam gerar uma proteção cruzada contra vários sorovares (HAAKE, 1991; NALLY et al., 2005).

A utilização de anticorpos na seleção de peptídeos, através da técnica de *phage display*, é uma estratégia atrativa que pode ser aplicada para o imunodiagnóstico ou no desenvolvimento de vacinas contra diversas doenças, na tentativa de se identificar sequências específicas que se liguem a anticorpos presentes em tais amostras. Tal procedimento pode gerar o desenvolvimento de novos compostos mais simples e sensíveis, além de permitir o entendimento da participação de antígenos conhecidos, ou não, nos mecanismos de resposta imune (MANOUTCHARIAN et al., 1999).

Anticorpos IgY policlonais de galinhas têm sido utilizado como alvo no *biopanning* (LEE et al., 2007, MANHANI et al., 2011; PRUDENCIO et al., 2011).

A IgY apresenta vantagens em relação aos anticorpos de mamíferos. Não apresenta reações cruzadas com anticorpos de mamíferos, interferindo pouco nos ensaios; acumulam-se em grande quantidade na gema de ovo de onde pode ser facilmente purificada, produzindo assim maior quantidade de anticorpos do que outros animais podem produzir durante o mesmo período; o cuidado com o animal custa menos (CARLANDER, 2002; MANHANI, 2009).

Além disso, anticorpos de galinha reconhecem um número maior de epítomos quando usado para a detecção de antígenos relacionados a mamíferos, aumentando assim a possibilidade de ligação e permitindo a descoberta de antígenos ocultos (LARSSON et al., 1998; CARLANDER et al., 1999; MANHANI, 2011).

Portanto, objetivou-se com este trabalho identificar epítomos ou mimetopos (sequências que imitam epítomos verdadeiros), por meio da técnica de *phage display* tendo como alvo anticorpos IgY anti-*Leptospira* e anti-PME Hardjo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Universidade Federal de Uberlândia (LADO-UFU) e no Laboratório de Nanobiotecnologia e Laboratório de Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (INGEB-UFU).

3.2.1 Obtenção dos antígenos

As cepas de *Leptospira interrogans* utilizadas foram fornecidas pelo Laboratório de Doenças Infectocontagiosas FAMEV-UFU. Foram utilizados 14 sorovares: Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Canicola, Copenhageni, Grippotyphosa, Hardjo, Hebdomadis, Icterohaemorrhagiae, Pomona, Pyrogenes, Tarassovi e Wolffii.

Para o preparo de uma suspensão de Leptospiras inativadas, as bactérias foram cultivadas em caldo EMJH (meio Ellinghausen e McCullough modificado por Johnson e Harris, 1967) por 7 a 10 dias em estufa bacteriológica com temperatura entre 28 e 29°C (FAINE, 1999). Após atingir a densidade de 1 a 2 x 10⁸ leptospiras/mL, os cultivos foram centrifugados a 13.000rpm durante 30 minutos, o pellet contendo as células foi diluído em PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, K₂HPO₄ 1,2 mM, pH 7,4) estéril, até a concentração final aproximada de 1x10⁸ leptospiras/mL, e em seguida as bactérias foram inativadas a 56°C por 16-18 horas (SURUJBALLI; ELMGREN, 2000).

A extração de PME foi realizada utilizando-se o detergente Triton X114 (Sigma) (HAAKE et al., 1991) e as proteínas extraídas foram precipitadas com acetona (Vetec, PA) (CUNINGHAM et al., 1988).

3.2.2 Produção e purificação de anticorpos policlonais

Anticorpos específicos contra leptospirose foram produzidos por galinhas poedeiras da linhagem *White Leghorn* (n=8) com 25 semanas de idade, por imunização com 250 µL de leptospira inativada (densidade de 1x10⁸ células/mL) e proteínas de membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo (200 µg/mL), diluídos em PBS e emulsionados em adjuvante completo de Freund (Sigma) v/v na primeira imunização e nos *booster* o adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Como controle foi utilizado a semana zero, pré-imunização.

As imunizações foram realizadas com intervalos de 15 dias, no músculo peitoral da galinha, dividindo o volume total (500 µL) em quatro pontos diferentes. Os ovos foram coletados diariamente a partir de uma semana antes da inoculação (pré-inoculação) para purificação dos anticorpos IgY a partir da gema dos ovos.

As gemas foram cuidadosamente separadas da clara e lavadas com água ultrapura para a remoção de resíduos de clara. Em seguida, a membrana vitelínica foi rompida e a gema foi coletada em frascos cônicos de 50 mL, os quais foram armazenados a -20°C até o momento

da purificação. Ao final do procedimento, obteve-se um *pool* semanal de gemas para cada um dos três grupos de galinhas imunizadas.

A purificação dos anticorpos IgY totais se iniciou pela delipidação, remoção da fração lipídica da gema segundo Akita e Nakai (1993). A gema pura foi diluída com água ultrapura na proporção 1:10 (v/v), após a homogeneização o pH da mistura foi ajustado para uma faixa entre 5,0-5,2, por meio de gotejamento de HCl 0,1N e, em seguida, a mistura acidificada foi armazenada a 4°C *overnight*. Após esse período a solução foi centrifugada a 10.000xg por 25 minutos à 4°C. O *pellet* contendo a fração rica em lipídeos foi descartado e o sobrenadante contendo os anticorpos totais, foi filtrado (filtro de 0,45µm Millipore). A amostra filtrada teve seu pH ajustado para 7,4 com PBS 10x e após isso foi armazenada a -20°C.

Após a delipidação, foi realizada a precipitação com sulfato de amônio baseado no protocolo de Araújo et al. (2010) onde se adicionou sulfato a amostra filtrada na concentração de 20% (p/v) sob agitação durante 30 minutos a 4°C. Após esse tempo o material foi centrifugado a 2.000 x g por 30 minutos a 4°C, com isso o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em PBS, pH 7,4. As amostras foram dialisadas em uma membrana de AMICOM (Amicom Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Millipore), onde se colocava a amostra juntamente com PBS, pH 7,4 para centrifugar a 4.000 x g por 30 minutos a 4°C, esse procedimento foi realizado 3 vezes.

O anticorpos foram então purificados em coluna *HiTrap IgY Purification HP*, 5mL (GE Healthcare), para garantir a pureza dos anticorpos utilizados no *biopanning*. Utilizou-se um sistema completo de cromatografia líquida modelo *Akta Primer* (Amersham Bioscience). O sistema foi preenchido com tampão de eluição (Na₂HPO₄ 20 mM, pH7,5), e então conectada à coluna. A coluna foi lavada com 5 volumes (25 mL) de cada tampão: ligação (Na₂HPO₄ 20mM, K₂SO₄ 0,5 M, pH7,5), eluição e limpeza (Na₂HPO₄ 20 mM, 30% volume/volume de isopropanol, pH7,5). Em seguida a coluna foi equilibrada com 5 volumes de tampão de ligação, e foi injetada amostra. A coluna foi lavada com 10 volumes da mesma (50 mL) de tampão de ligação. As IgY foram então eluídas com 10 volumes da coluna de tampão de eluição, sendo coletadas amostras de 1 mL que foram quantificadas no espectrofotômetro a 280 nm. A resina foi regenerada com oito volumes (40 mL) de tampão de limpeza, e reequilibrada com 5 volumes de tampão de ligação.

As amostras foram então concentradas por centrifugação a 4.000 x g, 4°C em uma membrana de AMICOM (Amicom Ultra-15 Centrifugal Filter Unit Millipore). A reatividade da IgY foi determinada por ELISA.

3.2.3 Teste de reatividade com a IgY Purificada

Duas placas de microtitulação de poliestireno (MaxiSorp, Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL/poço de Proteínas de Membrana Externa do sorovar Hardjo a uma concentração de 10 µg/mL em tampão bicarbonato de sódio (NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,6) e incubada *overnight* a 4°C. Em seguida os sítios remanescentes para ligações inespecíficas foram bloqueados com tampão Tris-HCl (TBS) acrescido de leite em pó desnatado na concentração de 5% (p/v) (TBSM), durante 2 horas a 37°C. Após incubação foi realizado um ciclo de três lavagens com tampão TBS.

Amostras de 50 µL dos anticorpos IgY totais, correspondentes ao *pool* de gemas de cada uma das dez semanas do experimento de imunização, diluídas a 1:50 em TBS-TM (TBSM, acrescido 0,05% de Tween 20), foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Após esse procedimento um segundo ciclo de lavagens idêntico foi executado. A detecção dos anticorpos IgY foi feita pela incubação com anticorpos IgG de coelho anti-IgY marcados com peroxidase (Sigma) diluídos 1:5000 em TBS-TM por 60 minutos a 37°C. Foi realizado um ultimo ciclo de lavagens e, em seguida, realizou-se a revelação por meio da adição de 50 µL/poço de orto-fenilenodiamina (OPD) (DAKO) acrescido de 5 µL de H₂O₂ a 30%. Após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 µL/poço de H₂SO₄ 2N, efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca (Thermo Plate - TP-Reader).

3.2.4 Biopanning (Seleção de fagos)

O processo de seleção seguiu como descrito por Barbas et al. (2001).

Para obtenção dos peptídeos, foi utilizada uma biblioteca comercial randômica de peptídeos (Ph.D. 12 mer, *New England Biolabs*, USA) que apresenta incluso na proteína PIII desse bacteriófago M13 uma cadeia de peptídeos de 12 aminoácidos. Essas bibliotecas possuem aproximadamente $2,8 \times 10^{11}$ clones independentes, o qual representa $1,9 \times 10^9$ possíveis combinações de resíduos de aminoácidos.

Inicialmente foi realizada uma seleção negativa. Poços de uma placa de microtitulação (Maxisorp – NUNC) foram sensibilizados, *overnight* a 4°C, com 150 µL/poço de anticorpos pré-imunização (controle), diluídos em tampão bicarbonato de sódio, a uma concentração de 100 µg/mL. Após sensibilização adicionou-se 300 µL/poço de tampão bloqueio (PBS

acrescido de 5% de BSA) e incubou-se por uma hora a 37°C, em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS, acrescido de 0.05% de Tween 20 (PBS-T). Adicionou-se 10 µL da biblioteca de fagos a uma concentração de 1×10^{11} diluída em 150 µL de PBS ao primeiro poço do controle negativo. Foram sensibilizados três poços para cada estratégia utilizada. A biblioteca de peptídeos foi incubada em cada poço por 30 minutos a 37°C, após incubação os fagos não ligantes eram transferidos para o poço seguinte até que se passasse nos três poços.

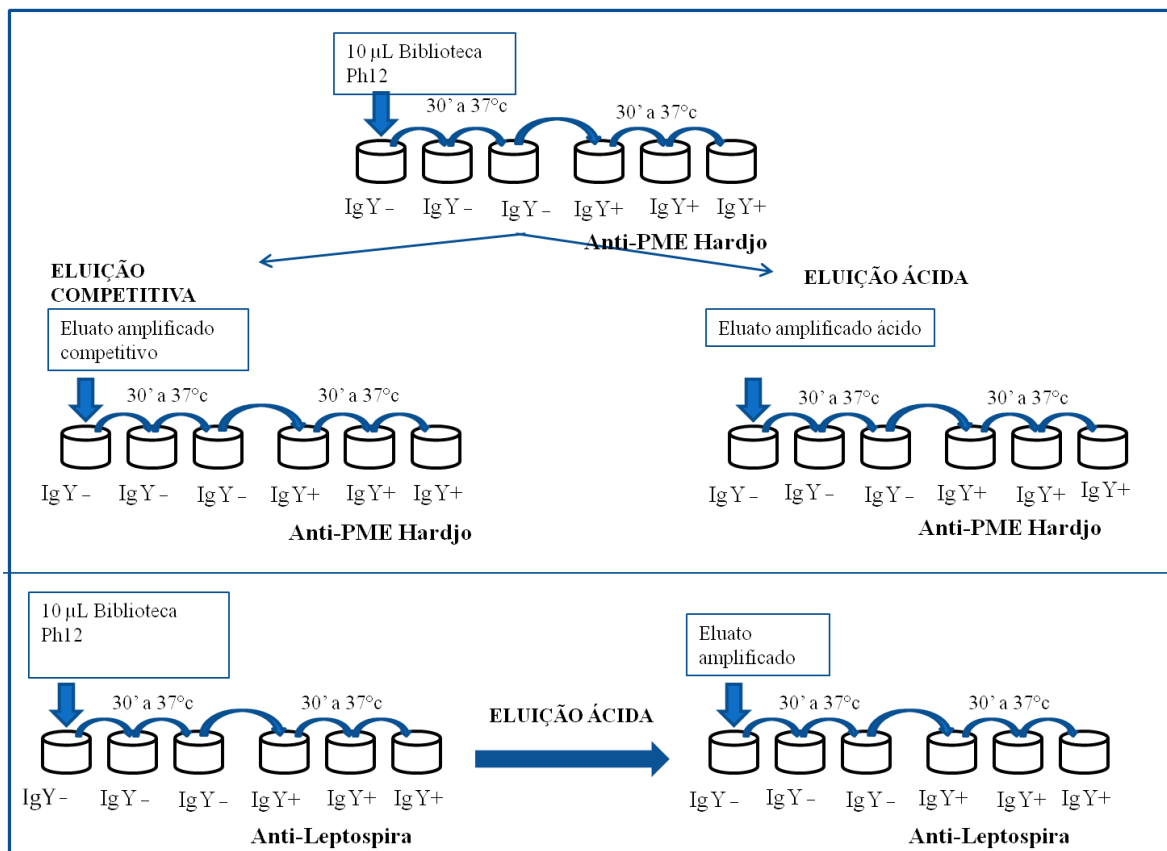
Foram utilizadas duas estratégias distintas de seleção, uma utilizando como alvo anticorpo IgY anti-Leptospira e outra IgY anti-PME Hardjo. Para tanto, três poços de uma placa de microtitulação (Maxisorp – NUNC, USA) foram sensibilizados, *overnight* a 4°C, com 150 µL/poço de anticorpo IgY anti-Leptospira e três poços com IgY anti-PME Hardjo. Os anticorpos foram previamente diluídos em tampão bicarbonato de sódio a uma concentração de 100 µg/mL.

Após sensibilização e bloqueio e lavagem dos poços como descrito anteriormente para IgY controle, os fagos não ligantes durante a seleção negativa foram incubados com a IgY anti-Leptospira e anti-PME Hardjo. Foram sensibilizados três poços para cada estratégia utilizada, nestes foram realizadas passagens sucessivas com incubação de 30 minutos a 37°C. Após passagem pelos três poços sensibilizados com o alvo, estes foram lavados 10 vezes com PBS-T (300 µL/poço) para remoção dos fagos não ligantes.

A eluição foi realizada de duas formas distintas, os três poços sensibilizados com IgY anti-Leptospira passaram por uma eluição ácida, onde adicionou-se 150 µL de glicina pH 2,2 por 10 minutos e depois 22,5 µL de Tris pH 9,1. Os três poços sensibilizados com IgY anti-PME Hardjo foram eluídos primeiramente de forma competitiva onde adicionou-se 150 µL da PME Hardjo a 100 µg/mL e incubou-se por 30 minutos, 37°C. Após a eluição competitiva foi realizada a eluição ácida como descrito acima.

Foram realizados três ciclos de seleção biológica (Figura 1). Os fagos eluídos de forma competitiva no 1º ciclo, nos próximos ciclos foram eluídos somente competitivamente. Enquanto, os fagos eluídos de forma ácida foram eluídos somente com solução ácida.

Figura 1: Esquema representativo da seleção de peptídeos miméticos a antígenos de *Leptospira interrogans* (Autoria própria).



Após a seleção as alíquotas dos fagos eluídos foram utilizadas para a determinação da titulação. O eluato remanescente contendo fagos foi utilizado para a amplificação dos fagos. Os fagos amplificados a partir do primeiro ciclo de seleção foram utilizados em um segundo ciclo e assim subsequentemente, por um total de três ciclos.

Para amplificar os fagos eluídos, utilizou-se a bactéria *E. coli* ER2738 em fase inicial de crescimento ($OD_{600} \sim 0,5$) amplificada em 20 mL de meio de cultura Luria-Bertania (LB) contendo tetraciclina e incubada a 37°C sob agitação por 4 - 5 horas. Logo após, transferiu-se o conteúdo para um tubo de acrílico de 50 mL, sendo este centrifugado a 10.000 rpm por 10 min a 4°C. As células residuais foram descartadas e o sobrenadante transferido para um novo tubo onde se adicionou 1/6 do volume de PEG-NaCl (20% p/v de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5 M), sendo incubado a 4°C *overnight*. No dia seguinte, este conteúdo foi centrifugado a 10000 rpm por 15min, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de fagos ressuspenso em 1 mL de PBS, transferido para um microtubo e centrifugado a 14000 rpm por 5 min, 4°C para precipitar os resíduos celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo para adição de 1/6 do volume de PEG-NaCl, e incubado por 1 hora no gelo a

4°C e depois centrifugado a 14000 rpm por 10 min, 4°C. O sobrenadante foi descartado, o pellet ressuspensionado em 200 µL de PBS, e centrifugado novamente por cinco minutos a 14.000 rpm, para remoção de resíduos celulares e o sobrenadante passado para um novo microtubo obtendo-se o eluato amplificado, pronto para a titulação.

3.2.5 Titulação e purificação dos fagos

O objetivo da titulação foi determinar a quantidade de fagos na entrada e saída de cada ciclo do *biopanning*.

Para realizar as titulações, foram utilizados 1,0 µL dos eluatos diluídos em 9,0 µL de meio de cultura LB. Para os eluatos não-amplificados utilizou-se diluições de 10^1 a 10^7 , e para os amplificados utilizou-se diluições de 10^7 a 10^{12} .

Terminada a diluição, estas foram incubadas a 37°C com 200 µL de meio LB contendo *E.coli* (ER2738) em fase inicial de crescimento por cinco minutos, e então o conteúdo de cada tubo foi diluído em 3 mL de meio LB top ágar (10g de Bacto-Tryptona, 5g de Extrato de Levedura, 5g de NaCl, 1g de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ /Litro) e rapidamente colocada em placas de petri contendo meio LB sólido adicionado com IPTG (0,5 mM) e X-gal (40 µg/mL). Na presença de IPTG os fagos expressam o gene β -galactosidase promovendo a quebra do substrato X-gal, o que fornece uma coloração azul as colônias infectadas com os fagos.

As placas foram incubadas durante toda a noite a 37°C e no dia seguinte verificou-se a presença de colônias azuis que foram contadas manualmente para a obtenção dos títulos de entrada e saída para todos os ciclos de seleção (número de colônias azuis X fator de diluição).

Foi realizada uma última titulação (3º ciclo), com o eluato de fagos não-amplificados, a qual tinha a função de permitir a coleta de colônias isoladas. Uma colônia desta é constituída de somente um tipo de fago, ou seja, todos os fagos de uma colônia isolada têm o mesmo DNA, consequentemente, o peptídeo adicionado a capa externa destes é idêntico. Estas, uma vez coletadas, foram colocadas, uma colônia por poço, em placas de cultura (tipo *deepwell*) contendo 1mL/poço de meio LB com ER2738 em fase inicial de crescimento. Após os processos de amplificação e purificação o DNA dos fagos foi extraído e sequenciado.

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificados e não amplificados de cada ciclo.

3.2.6 Extração de DNA dos Fagos Específicos

Para a obtenção de DNA dos fagos, 10,0 µL dos fagos purificados foram adicionados a 1,0 mL de cultura de ER2738 em fase de crescimento inicial em uma placa *deepwell*. A placa foi vedada com um adesivo e incubada a 37°C, onde permaneceram sob agitação vigorosa por 20 horas a 37°C. Após a amplificação, as culturas foram centrifugadas por 50 minutos a 3700 rpm, para a sedimentação das bactérias.

O sobrenadante contendo os fagos foi transferido para outra placa onde adicionou-se 1/6 do volume total de PEG-NaCl e incubou-se em seguida no gelo a 4°C por 12 horas. Após incubação, a placa foi centrifugada por 40 minutos a 3700 rpm, a 4°C, foi descartado o sobrenadante, e o precipitado ressuspenso em 100,0 µL de Tampão Iodeto (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaI 4 M), agitado vigorosamente e, então, adicionou-se 250,0 µL de etanol absoluto (100%).

Após incubação c, as placas foram centrifugadas por 40 minutos, a 3700 rpm, a 4°C, o sobrenadante foi descartado, e em seguida, lavou-se o precipitado com 150,0 µL de etanol 70%, centrifugando mais uma vez por 15 minutos a 3700 rpm 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado (DNA dos fagos) suspenso em 15µL de água Milli-Q .

O DNA extraído dos fagos foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% e corado com brometo de etídeo para verificar sua qualidade. Em seguida o DNA foi sequenciado e analisado. Foram retiradas 10 amostras, aleatoriamente, dentre as 288 obtidas.

3.2.7 Sequenciamento do DNA dos fagos

O sequenciamento foi realizado utilizando o kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle Kit* (Amersham Biosciences) e um sequenciador automático MegaBace 1000 (Amersham Biosciences) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU). Para a reação do sequenciamento, foi utilizado o primer M13 (5'-HOCCCTCATAGTTAGCGTAACG -3'-Invitrogen) que amplifica a região do DNA do fago correspondente aos insertos dos aminoácidos codificantes dos peptídeos randômicos fusionados na proteína PIII.

Foi utilizado 500ng de DNA molde, 5pmol do *primer* e Premix (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit* – Amersham Biosciences). Para a realização da reação de 35 ciclos foi utilizado um termociclador de placas (*MasterCycler-Eppendorf*) nas seguintes condições:

desnaturação (a 95°C por 20 segundos); anelamento do *primer* (a 58°C por 15 segundos) e extensão (a 60°C por um minuto).

O DNA sequenciado foi precipitado com 1µL de acetato de amônio e 27,5µL etanol. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 45 minutos, a 3700rpm e o sobrenadante descartado. Adicionou-se 150µL de etanol 70% ao DNA precipitado e centrifugou-se por 15 minutos, a 3700rpm. A solução de etanol foi descartada e os precipitados resultantes foram ressuspensos em 10µL do tampão de diluição (*DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Kit – Amersham Biosciences*). A leitura do sequenciamento foi realizada no sequenciador automático MegaBace 1000 (*Amersham Biosciences*) no Laboratório de Nanobiotecnologia (UFU).

A análise das sequências de DNA provenientes do sequenciador automático foi processada em software do próprio equipamento (*Sequence Analyser, Base Caller, Cimarron 3.12, Phred 15*).

3.2.8 Seleção dos fagos de interesse (*Screening*)

Devido ao grande número de fagos sequenciados, estes foram submetidos a um ELISA com o sobrenadante dos fagos isolados e amplificados, para verificar a reatividade destes frente ao anticorpo IgY usado no *biopanning*, a fim de selecionar aqueles que melhor distinguiram positivo de negativo.

Para realização do teste ELISA, placas (Maxisorp – Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL de IgY anti-Leptospira, anti-PME Hardjo e IgY controle, na concentração de 1µg/poço e incubadas *overnight* a 4°C. Em seguida o conteúdo foi descartado e a placa lavada uma vez com PBS, após a lavagem adicionou-se 300 µL de tampão bloqueio PBS contendo 5% de soro albumina bovina (PBS-BSA) e a placa foi incubada durante 1 hora a 37°C. Após esse período foram realizadas três lavagens com PBS e então adicionou-se 50 µL do sobrenadante dos fagos amplificados. As placas foram então incubadas por 1 hora e 30 minutos, 37°C e lavadas novamente cinco vezes com PBST. Adicionou-se então 50 µL/poço de anticorpo conjugado anti-M13 diluído 1:5000 em PBST-BSA e incubou-se a placa por 1 hora a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada cinco e adicionou-se 50 µL de orto-fenilenodiamina (OPD, DAKO) acrescido de H₂O₂ a 30%. Após 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 µL/poço de H₂SO₄ 2N, efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca (Thermo Plate - TP-Reader).

Os fagos selecionados com IgY anti-PME e eluídos de forma competitiva que apresentaram uma diferença entre positivo e negativo superior a 1,5 vezes (DOpositivo/DOnegativo) e os fagos selecionados com IgY anti-PME e IgY anti-Leptospira e eluídos de forma ácida que apresentaram uma diferença entre positivo e negativo superior a 2 vezes foram então submetidos a um novo teste ELISA, conforme item 3.2.9.

3.2.9 Teste de imunoreatividade dos fagos (ELISA)

Os testes de imunoreatividade foram realizados, segundo Prudencio (2008).

Os clones que apresentaram melhor resposta no ELISA sanduíche com sobrenadante foram então submetidos a um novo teste ELISA sanduíche para confirmar a reatividade destes, sendo que neste os fagos foram amplificados e purificados nas mesmas condições e quantificados para que se entrasse com a mesma quantidade de fagos em todos os poços.

Placas (Maxisorp – Nunc) foram sensibilizadas com 50 µL/poço do anticorpo na concentração de 1µg/poço de IgY anti-leptospira, IgY anti-PME e IgY controle e incubadas *overnight* a 4°C. Em seguida o conteúdo foi descartado e a placa lavada uma vez com PBS, após a lavagem adicionou-se 300µL de tampão bloqueio (PBS, acrescido de 5% de BSA) e a placa foi incubada durante 1 hora em estufa a 37°C. Após esse período foram realizadas três lavagens com PBS e então adicionou-se 50µL dos fagos diluídos em tampão bloqueio a uma concentração de 10¹¹/poço dos fagos selecionados purificados e incubou-se a placa por 1 hora e 30 minutos a 37°C. A placa foi lavada novamente cinco vezes com PBST e adicionou-se anticorpo conjugado anti-M13 diluído 1:5000 em PBST+BSA 5% e incubada por 1 hora a 37°C. A placa foi lavada mais cinco vezes após esse período e adicionou-se 100 µL de OPD. Após 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida com a adição de 25 µL/poço de H₂SO₄ 2N, efetuando-se em seguida a leitura a 492 nm em espectrofotômetro de microplaca *Thermo Plate - TP-Reader*.

Em cada placa foram incluídas duas amostras de fago selvagem, como controles negativos diluídos e incubados nas mesmas condições, para o cálculo de *cut off*, o qual foi estabelecido pela média dos valores de densidade óptica (DO) dos controles negativos mais dois desvios padrão. Os resultados foram expressos como índice ELISA (IE) com previamente proposto por (Prudencio, 2008) da seguinte forma: $IE = DO_{amostra} / DO_{cut\ off}$, onde os valores de IEs maiores que 1 foram considerados positivos e os IEs menores que 1 foram

considerados negativos. Portanto, os clones que apresentaram IE superior a 1 frente aos anticorpos IgY anti-PME e IgY anti-*Leptospira* e IE inferior a 1 frente a IgY controle foram selecionados e suas sequências comparadas com sequências de proteínas da base de dados do GenBank.

3.2.10 Análise de dados *in Silico*

Após o sequenciamento, as sequências dos fagos foram comparadas com sequências de proteínas da base de dados do GenBank, utilizando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) software (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) (ALTSCHUL et al., 1997). A pesquisa foi restrita a *Leptospira spp* quando os fagos foram selecionados a partir de IgY anti-leptospira e quando foram selecionados a partir de IgY anti-PME Hardjo restrita a *Leptospira interrogans sorovar Hardjo*.

3.3 RESULTADOS

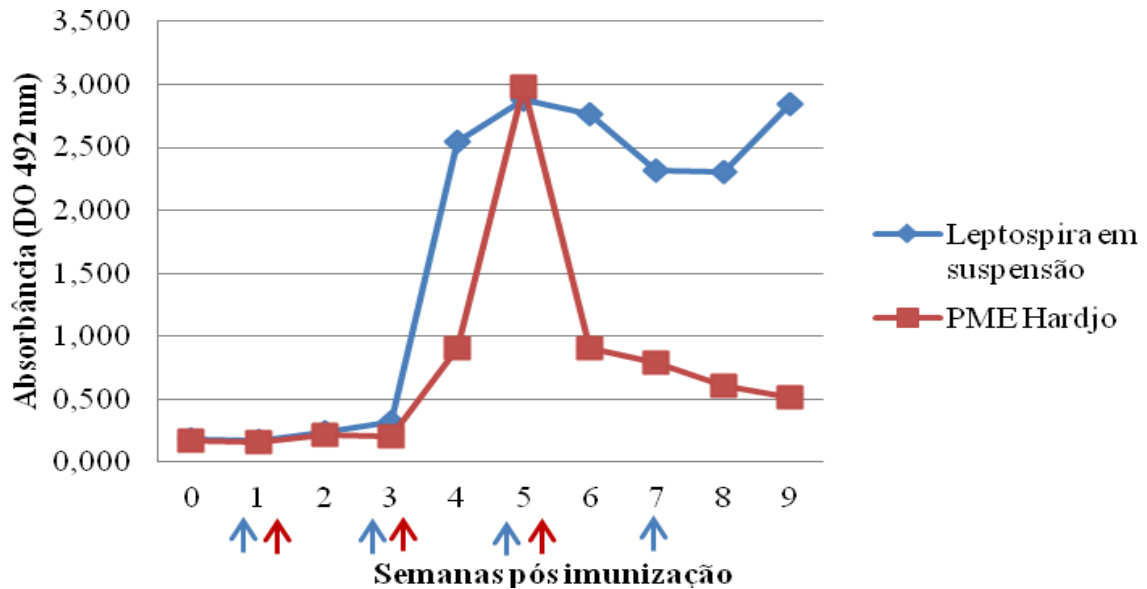
3.3.1 Teste de reatividade com a IgY Purificada

Observou-se que o pico na produção de anticorpos ocorreu entre a 5^o e 6^o semana após a primeira imunização (Figura 2), por isso os anticorpos da 5^o semana foram selecionados para o *biopanning*.

Segundo Lafetá (2006) o perfil protéico das proteínas de membrana externa da *Leptospira interrogans* sorovar Hardjo possui muitas similaridades com o perfil protéico da membrana externa de *L. interrogans*, portanto devido a essa semelhança essas foram utilizadas como antígeno no ELISA. Observou-se que tanto animais imunizados com PME Hardjo, como as galinhas inoculadas com uma suspensão de Leptospiras inativadas desenvolveram anticorpos reativos a proteínas de membrana externa do sorovar Hardjo.

Na semana zero, ou seja antes da inoculação, a absorbância no ELISA é 0,177 o que indica que sua atividade específica foi insignificante e, portanto, poderia ser empregada como um controle negativo.

Figura 2: Cinética da produção de anticorpos IgY nas amostras de gema de ovo de galinhas obtida pelo teste ELISA durante 10 semanas. As setas vermelhas indicam as imunizações com PME e as setas azuis as imunizações com *Leptospira* spp. em suspensão



3.3.2 Biopanning (Seleção de fagos)

A quantidade de fagos selecionados durante os três ciclos de seleção foi estimada pela titulação dos eluatos amplificados (entrada) e não amplificados (saída) de cada ciclo (Tabelas 1, 2 e 3).

Tabela 1: Resultado da titulação realizada em cada *round* do *biopanning*, dos fagos que tiveram como alvo IgY anti-Pme Hardjo e foram eluídos competitivamente com PME Hardjo.

Ciclos de Seleção	Entrada	Saída
Primeiro	2×10^{11}	7×10^3
Segundo	1×10^{11}	3×10^4
Terceiro	2×10^{11}	$4,3 \times 10^4$

Tabela 2: Resultado da titulação realizada em cada *round* do *biopanning*, dos fagos que tiveram como alvo IgY anti-Pme Hardjo e foram eluídos de forma ácida.

Ciclos de Seleção	Entrada	Saída
Primeiro	2×10^{11}	1×10^4
Segundo	1×10^{11}	$3,3 \times 10^6$
Terceiro	$4,8 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^6$

Tabela 3: Resultado da titulação realizada em cada *round* do *biopanning*, que tiveram como alvo IgY anti-*Leptospira*.

Ciclos de Seleção	Entrada	Saída
Primeiro	2×10^{11}	4×10^2
Segundo	1×10^{11}	6×10^3
Terceiro	$5,2 \times 10^{10}$	$3,1 \times 10^5$

3.3.3 Sequenciamento do DNA dos fagos

Foram sequenciados 96 clones de cada estratégia de seleção utilizada, sendo que dos 96 clones selecionados com IgY anti-PME Hardjo e eluídos de forma ácida, apenas 40 apresentaram sequências válidas (sem erros de sequenciamento), com 34 sequências distintas (Apêndice A). Enquanto os clones selecionados com IgY anti-PME Hardjo e eluídos de forma competitiva apresentaram 68 sequências válidas, com 63 sequências distintas (Apêndice B). Já os clones selecionados com IgY anti-*Leptospira* inativada apresentaram 44 sequências válidas, com 35 sequências distintas (Apêndice C). Os Apêndices A, B e C mostram a sequência e frequência dos clones obtidos.

Portanto, após três ciclos de seleção, foram obtidas 132 sequências distintas de peptídeos, nas diferentes estratégias de seleção.

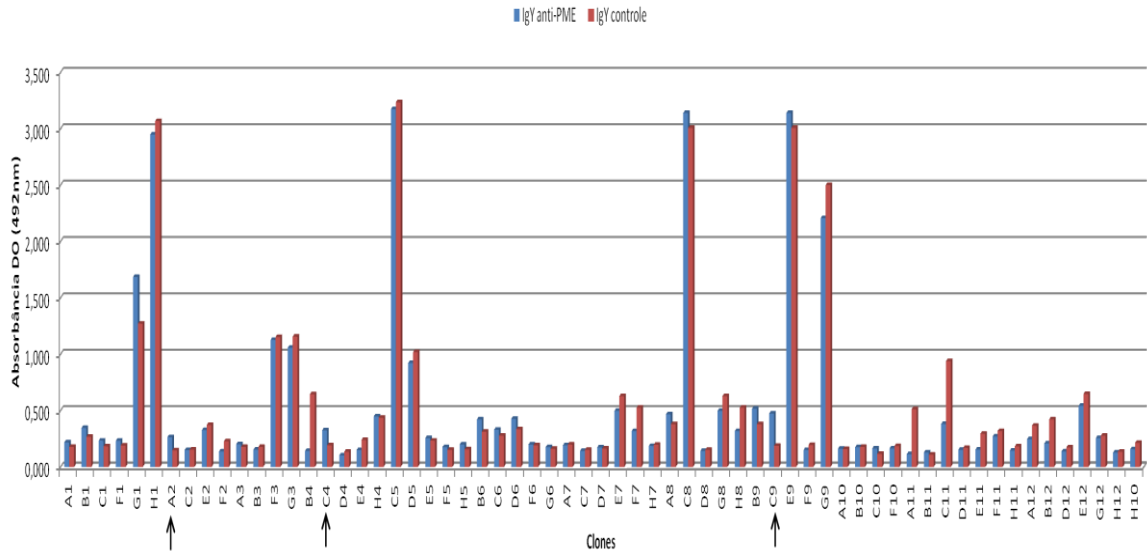
3.3.4 Teste de Reatividade dos fagos (*Screening*)

Devido ao grande número de fagos selecionados, realizou-se um ELISA sanduíche com as IgY purificadas utilizadas no *biopanning* e o sobrenadante de meio de cultura, obtidos após o terceiro ciclo de seleção para verificar a reatividade ao alvo (Figuras 3, 4 e 5). O objetivo desta etapa foi individualizar e selecionar apenas os clones que apresentaram maior diferença entre positivo e negativo.

Sendo que os fagos que apresentaram uma diferença (DOpositivo/DOnegativo) maior que 1,5 vezes para os fagos selecionados com IgY anti-PME e eluídos de forma competitiva, e uma diferença superior a 2 vezes para os fagos selecionados com IgY anti-PME e IgY anti-*Leptospira*, foram submetidos a um outro ELISA.

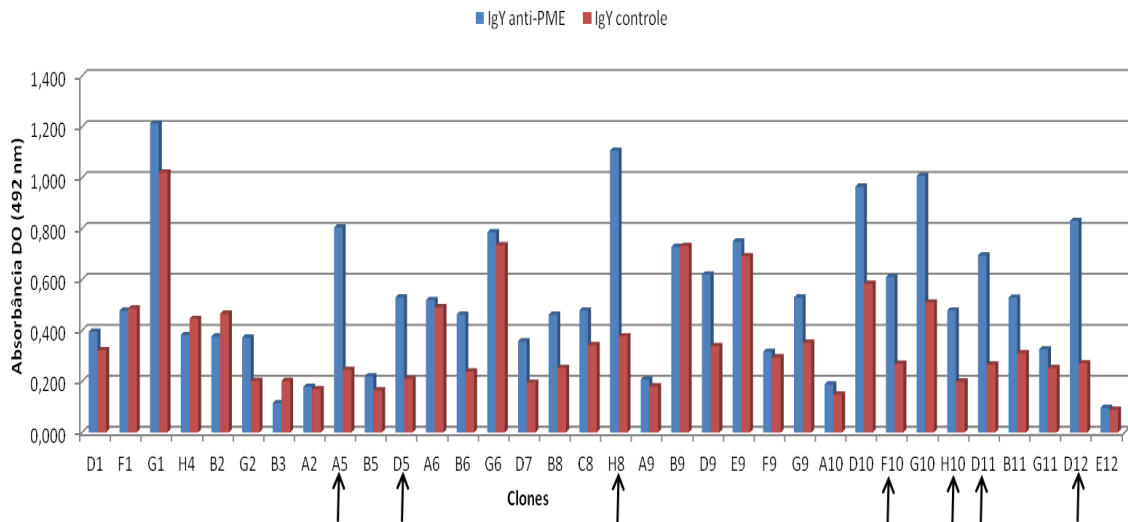
Observou-se que dos 63 clones selecionados com IgY anti-PME Hardjo e eluídos competitivamente, apenas três foram selecionados para testes posteriores pois estes apresentaram uma diferença (DOpositivo/DOnegativo) maior que 1,5 vezes. Foram os clones A2, C4, C9 (Figura 3).

Figura 3: Reatividade dos fagos selecionados competitivamente frente aos anticorpos IgY anti-PME e IgY controle



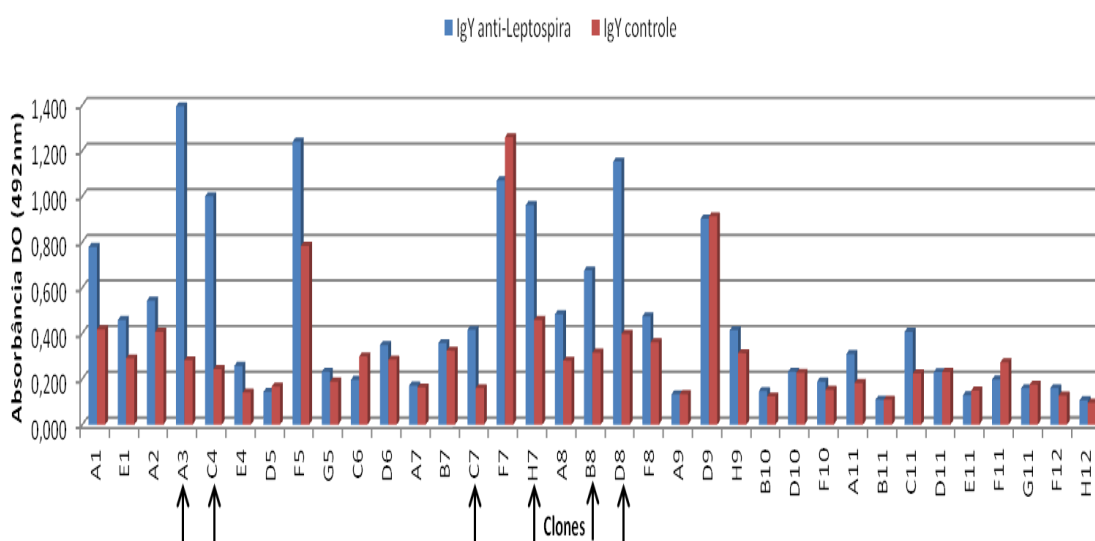
Observou-se que dos 34 clones selecionados com anticorpo anti-PME e eluídos de forma ácida, foram selecionados sete para testes posteriores, pois estes apresentaram uma diferença (DOpositivo/DOnegativo) maior que 2 vezes. Foram os clones A5, D5, H8, F10, H10, D11 e D12 (Figura 4).

Figura 4: Reatividade dos fagos selecionados frente aos anticorpos IgY anti-PME ácido e IgY controle



Observou-se que dos 35 clones selecionados com IgY anti-*Leptospira* seis foram selecionados para testes posteriores pois estes apresentaram uma diferença (DOpositivo/DOnegativo) maior que 2 vezes. Foram os clones: A3, C4, C7, H7, B8 e D8 (Figura 5).

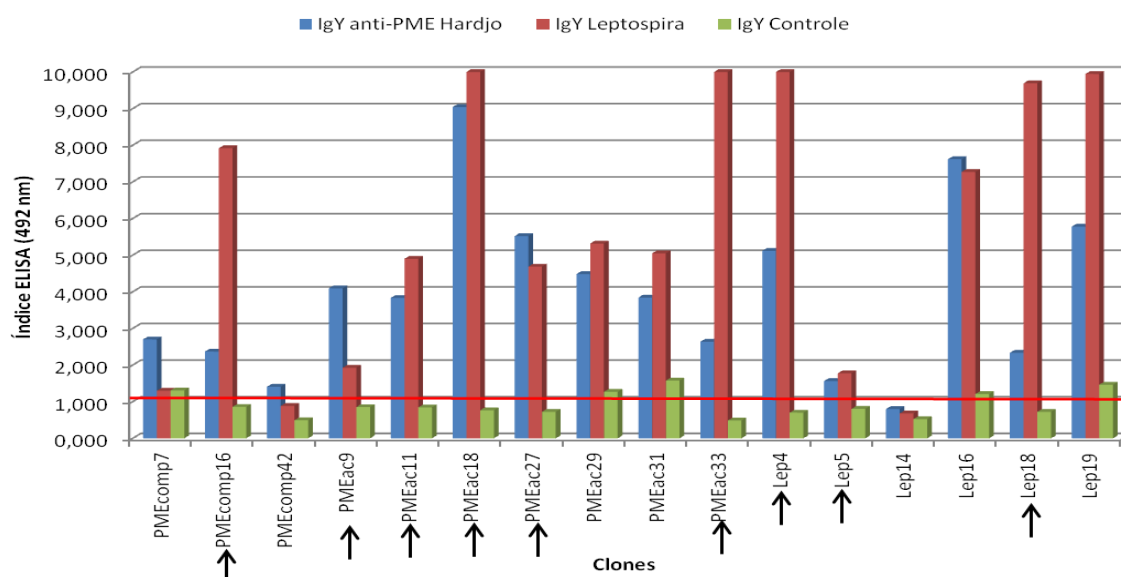
Figura 5: Reatividade dos fagos selecionados frente aos anticorpos IgY anti-*Leptospira* e IgY controle



Os clones selecionados no *screening*, foram então submetidos a outro teste ELISA sanduíche em condições iguais para todos os clones, para verificar a especificidade destes, todos os clones selecionados foram testados tanto com anticorpos IgY anti-*leptospira* quanto com anticorpos anti-PME Hardjo (Figura 6).

Os clones que apresentaram IE superior a 1 frente aos anticorpos IgY anti-PME e IgY anti-*Leptospira* e IE inferior a 1 frente a IgY controle foram selecionados e suas sequências foram comparadas com sequências de proteínas da base de dados do GenBank, utilizando BLAST. Foram os clones: PMEcomp16 (C4), PMEac9 (A5), PMEac11 (D5), PMEac18 (H8), PMEac27 (F10), PMEac33 (D12), Lep4 (A3), Lep5 (C4) e Lep18 (B8) (Figuras 6).

Figura 6: Reatividade dos clones de fagos frente as IgY purificadas de galinhas inoculadas com PME Hardjo, Leptospiras e controle



Dos 132 fagos que apresentaram sequências válidas, sem erros de identificação, nove foram selecionados. No ensaio imunoenzimático realizado, observou-se que de todos os peptídeos testados, os peptídeos **PMEcomp16**, **PMEac9**, **PMEac11**, **PMEac18**, **PMEac27**, **PMEac33**, **Lep4**, **Lep5** e **Lep18** demonstraram potencial diagnóstico.

3.3.5 Análise *in Silico*

A sequência dos nove fagos mais reativos foram comparadas com sequências de proteínas do banco de dados do GenBank usando BLASTP, os resultados encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4: Fagos com similaridade significativa para proteínas anteriormente descritas para *Leptospira interrogans*

Peptídeo	Sequência	Proteínas do BLAST	Nº de Acesso
PMEcomp16	DLFSVHWPLKA	Lipoproteína de Membrana externa (Hardjo)	AAT65970.1
		LipI32, partial (Hardjo)	AFC76104.1
		Proteína de membrana externa fator de virulência	ADL14250.1
		SecY (Hardjo)	ACC60964.1
PMEac9	GLRDLSKEKLYR	Lipoproteína de Membrana externa (Hardjo)	AAT65970.1
		LipI32, partial (Hardjo)	AFC76104.1
		Proteína de membrana externa fator de virulência	ADL14250.1
		SecY (Hardjo)	ACC60964.1
PMEac11	GLKSLPSPASQ	Lipoproteína de Membrana externa (Hardjo)	AAT65970.1
		LipI32, partial (Hardjo)	AFC76104.1
		Proteína de membrana externa fator de virulência	ADL14250.1
PMEac18	DESVLGDTFYRM	Lipoproteína de Membrana externa (Hardjo)	AAT65970.1
		LipI32, partial (Hardjo)	AFC76104.1
		Proteína de membrana externa fator de virulência	ADL14250.1
PMEac27	GMKDLHALPTSS	Lipoproteína de Membrana externa (Hardjo)	AAT65970.1
PMEac33	ERMSVTPSISYV	Proteína de membrana externa fator de virulência	ADL14250.1
		Proteína de Membrana externa (Hardjo)	AAT65970.1
		LipI32, partial (Hardjo)	AFC76104.1
Lep4	SRLAVTPNTQHP	LenE <i>Leptospira interrogans</i> sorovar:	
		Grippotyphosa	ABV552361
		Canicola	ABV006941
		Copenhageni	ABU98649.1
		Bratislava	ABU88672.1
		Pomona	ABU88667.1
Lep5	DDHRIGLLHTRP	LipI41 <i>Leptospira interrogans</i> sorovar:	
		Canicola	AAU04606.1
		Pomona	AAU4601.1
		Wolffi	AAU4602.1
		Linhai	AAU04599.1
		Lipoproteína (Copenhageni)	YP 000712.1
Lep18	NISIRHTTPWVS	LenE <i>Leptospira interrogans</i> sorovar:	
		Grippotyphosa	ABV552361
		Canicola	ABV006941
		Copenhageni	ABU98649.1
		Bratislava	ABU88672.1
		Pomona	ABU88667.1
		LigA (<i>Icterhaemorrhagiae</i>)	ACU87695

3.4 DISCUSSÃO

Analisando a resposta imune das galinhas inoculadas com PME Hardjo e *Leptospira* inativada, foi possível demonstrar a capacidade de utilizar galinhas para produção de anticorpos policlonais específicos anti-*Leptospira* e anti-PME do sorovar Hardjo.

Estratégias de seleção de mimetopos usando anticorpos policlonais de galinha têm sido pouco exploradas, apesar de oferecerem vantagens em relação a anticorpos de mamíferos (BENTLEY et al., 2000, LEE et al., 2007, MANHANI et al., 2011; PRUDENCIO et al., 2011). Uma das vantagens mais importantes é que os anticorpos IgY reconhecem um maior número de epítomos quando usado para detecção de antígenos relacionados mamíferos (CARLANDER et al., 1999).

No *biopanning*, observou-se que durante os ciclos de seleção houve um enriquecimento do número de fagos, já esperado pelo fato de que, a cada ciclo, clones/fagos com determinadas sequências foram retidos para subsequente eluição e amplificação no ciclo seguinte. Os títulos dos fagos na entrada do *biopanning* foram sempre maiores que os títulos de saída, pois os fagos com maior afinidade aos anticorpos específicos estão ligados a este, e os fagos com baixa ou sem afinidade são removidos por sucessivas lavagens (SAWADA et al., 2011).

Através dos testes de reatividade, verificou-se que nove peptídeos foram específicos para o alvo utilizado na seleção, confirmando a especificidade do processo de seleção.

Todos os nove fagos selecionados apresentaram peptídeos semelhantes a sequência de proteínas de membrana externa (PME) de *Leptospiras*, indicando que estes peptídeos em questão podem ser miméticos a proteínas imunogênicas de *Leptospira interrogans*. As PMEs, em particular aquelas expostas na superfície celular, são os candidatos vacinais considerados mais promissores, por estarem diretamente envolvidas na interação das bactérias com a célula hospedeira (CULLEN et al., 2003; PALANIAPPAN; RAMANUJAM; CHANG, 2007).

A identificação de proteínas conservadas entre as leptospiros patogênicas é um foco importante das pesquisas atuais sobre leptospirose, pois estas poderiam gerar uma proteção cruzada contra vários sorovares (HAAKE, 1991; NALLY et al., 2005).

A capacidade das espiroquetas de aderir a superfície de células eucarióticas, a proteínas de matriz extracelular e outros ligantes do hospedeiro, como a laminina, colágenos tipo I e IV, fibronectina, fibrinogênio, elastina e proteoglicanos, é essencial para patogênese

da leptospirose (HAAKE, 2000; BARBOSA et al., 2006; BREINER et al., 2009). As leptospirosas apresentam moléculas de adesão associadas a superfície, geralmente chamadas de adesinas, entre estas encontram-se as proteínas Len, LigA e LipL32, as quais os fagos selecionados nesta pesquisa apresentaram sequências semelhantes.

As proteínas Len pertencem a uma família de proteínas de membrana externa, também denominadas “*Leptospiral endostatin-like protein*”, por apresentarem semelhança estrutural e funcional com a endostatina de mamíferos, apresenta vários componentes (LenA, LenB, LenC, LenD, LenE, LenF), recentemente descritas (STEVENSON et al., 2007)

A proteína Len pode interagir com a laminina, fibronectina e proteínas reguladoras do complemento, facilitando assim a invasão e colonização do tecido hospedeiro e protegendo a *Leptospira* da resposta imune do hospedeiro (STEVENSON et al., 2007; CINCO, 2010) .

As leptospirosas patogênicas apresentam uma família de proteínas semelhantes a imunoglobulina, LigA, LigB e LigC. LigA é uma lipoproteína de 130 kDa exposta na superfície, expressa durante a infecção e é altamente imunogênica, se liga a componentes da matriz extracelular, como elastina, colágeno tipo I e IV, laminina e fibronectina podendo, portanto, estar envolvidos na adesão e invasão celular (MATSUNAGA et al., 2003; CHOY et al., 2007; LIN et al., 2009).

A LigA tem sido pesquisada quanto ao seu potencial vacinal e diagnóstico, principalmente devido ao fato, de estar presente apenas em leptospirosas patogênicas e ainda a diminuição da sua expressão foi correlacionada a perda da letalidade no hospedeiro (MATSUNAGA et al., 2003; KOIZUMI; WATANABE, 2004; PALANIAPPAN et al., 2004; PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA et al., 2007). Além disso, o gene lig mostrou ser útil na detecção de leptospirosas patogênicas (PALANIAPPAN et al., 2005).

As lipoproteínas são as proteínas predominantes na membrana das espiroquetas e por estarem localizadas na superfície da bactéria, desempenham várias funções relacionadas a adaptação e interação com o meio ambiente (CULLEN et al., 2005; HAAKE, 2000; HAAKE; MATSUNAGA, 2002).

A lipoproteína mais abundante na membrana externa das *Leptospirosas* é a LipL32, altamente conservada nas espécies patogênicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, e não detectada nas espécies saprofíticas (HAAKE et al, 2000; GUERREIRO et al., 2001; MALMSTROM et al., 2009).

A lipL32 também se liga a laminina, colágenos I, IV e V, e fibronectina e ainda demonstrou-se que esta potencializa a hemólise mediada pela esfingomielinase H (SphH),

sendo denominada também de Hap-1 (proteína associada a hemólise) (HAAKE et al., 2000; HAUKE et al., 2008; HOKE et al., 2008).

O alto grau de conservação de LipL32 entre as diferentes espécies de *Leptospiras* patogênicas e seu alto poder imunogênico, mais de 95% de pacientes com leptospirose produziram anticorpos contra LipL32, indicam que estratégias de sorodiagnóstico e vacinas baseadas neste antígeno podem ser efetiva independente do sorovar (GUERREIRO, et al., 2001).

A LipL41 é uma lipoproteína de membrana externa que associada a OmpL1, uma proteína transmembrana, ambas expostas na superfície celular, demonstraram agir sinergicamente induzindo a proteção contra leptospirose em hamsters, embora nenhuma das proteínas individualmente tenha induzido a imunidade protetora (HAAKE et al., 1999).

O gene que codifica a preproteína translocase, SecY, tem valor de diagnóstico e potencial para resolver questões taxonômicas em *Leptospira*, é muito usado em PCR (GRAVEKAMP et al., 1993; ZUERNER et al., 2000).

Pesquisas têm demonstrado que fagos selecionados a partir de bibliotecas com anticorpos podem ser utilizados como imunógenos, estimulando a respostas de anticorpos e proporcionando uma proteção *in vivo* (IRVING et al., 2001).

Analizando as proteínas as quais os peptídeos foram similares, verifica-se que muitas são consideradas bons imunógenos (GUERREIRO, et al., 2001; MATSUNAGA et al., 2003; CHOY et al., 2007; LIN et al., 2009) demonstrando assim que os peptídeos selecionados neste estudo, têm potencial, podendo futuramente serem utilizados para vacinação ou mesmo, como ensaio diagnóstico.

Tungtrakanpoung et al. (2006) utilizando anticorpos monoclonais e soro de pacientes positivos para leptospirose obteve peptídeos especialmente; LTPCDXPTFGS e TPCIXXGSAS e CSNXSKR, que quando alinhados com proteínas de *Leptospira interrogans*, apresentaram sequências semelhantes a proteínas de membrana exterior (GenBank adesão Número AAN49104), termolisina proteína precursora (GenBank número de acesso YP_003227.1), e hipotética proteína LIC12228 (adesão GenBank Número YP_002163.1).

3.5 CONCLUSÃO

Os anticorpos policlonais IgY, produzidos por meio da imunização de galinhas com PME do sorovar Hardjo e suspensão de *Leptospiras* inativadas mostraram-se específicos para *Leptospira* e foram eficientes, quando usados no processo de seleção biológica, para selecionar peptídeos similares a proteínas de *Leptospira* spp. Foram selecionados nove peptídeos com similaridade a proteínas de *Leptospira interrogans* consideradas imunogênicas. Os peptídeos foram similares a proteínas de membrana externa, lipoproteína, LipL32, LipL41, LigA, SecY, LenE.

REFERÊNCIAS

- ADLER, B.; MOCTEZUMA, A. P. Review: *Leptospira* and leptospirosis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.140, n.3-4, p. 287-296, Jan., 2010.
- AKITA, E.M.; NAKAI, S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with a enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.2, n.160, p.207-214, Abr., 1993.
- ALT, D. P.; ZUERNER, R. L.; BOLIN, C. A. Evaluation of Antibiotics for Treatment of Cattle Infected With *Leptospira borgpetersenii* Serovar Hardjo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.219, n. 5, p.636-639, Set., 2001.
- ALTSCHUL, F. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, n.17, p.3389–3402, 1997.
- BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Phage Display: A Laboratory Manual. **Plain view**, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- BARBOSA, A. S.; ABREU, P. A. E.; NEVES, F. O.; ATZINGEN, M. V.; WATANABE, M. M.; VIEIRA, M. L.; MORAIS, Z. M.; VASCONCELLOS, S. A.; NASCIMENTO, A. L. T.O. A newly identified leptospiral adhesin mediates attachment to laminin. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.11, p.6356–6364, Nov., 2006.
- BENTLEY, L.; FEHRSEN, J.; JORDAAN, F.; HUISMANS, H.; DU PLESSIS, D. H. Identification of antigenic regions on VP2 of African horsesickness virus serotype 3 by using phage-displayed epitope libraries. **Journal of General Virology**, Londres, v.81, Pt.4, p.993–1000, Abr., 2000.
- BHARTI, A.; NALLY, J.; RICARDI, J.; MATTHIAS, M.; DIAZ, M.; LOVETT, M.; LEVETT, P.; GILMAN, R.; WILLIG, M.; GOTUZZO, E.; VINETZ, J. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. **Lancet Infectious Diseases**, Nova York, v.3, n.12, p.757–771, Dez., 2003.
- BREINER, D. D.; FAHEY, M.; SALVADOR, R.; NOVAKOVA, J.; COBURN, J. *Leptospira interrogans* binds to human Cell Surface Receptors including proteoglycans. **Infection and Immunity**, Washington, v. 77, n.12, p.5528-5536, Dez., 2009.
- CARLANDER, D. **Avian IgY antibody. In vitro and in vivo**. 2002. 53f. Tese (Doutorado em Química Clínica) – Uppsala University, Sweden, 2002.
- CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; WEJÅKER, P. E.; LARSSON, A. Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonization by gargling with specific antibodies. In: SIM, J. S. (Ed.). **Egg Nutrition and Biotechnology**. Wallingford: CAB International, 1999. p.371-374.
- CINCO, M. New insights into the pathogenicity of leptospires: evasion of host defences. **New Microbiologica**, Pavia, v.33, n.4, p.283-292, Out., 2010.

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**, Washington, v.75, n.5, p.2441–2450, Mai., 2007.

CULLEN, P.A.; HAAKE, D.A.; BULACH, D.M.; ZUERNER, R.L.; ADLER, B. LipL21 is a novel surface-exposed lipoprotein of pathogenic *Leptospira* species. **Infection and Immunity**, Washington, v.71, n.5, p.2414 – 2421, Mai., 2003.

CULLEN, P. A.; XU, X.; MATSUNAGA, J.; SANCHEZ, Y.; KO, A. I.; HAAKE, D. A.; ADLER, B. Surfaceome of *Leptospira* spp. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.8, p.4853-4863, Ago., 2005.

CUNNINGHAM, T. M.; WALKER, E. M.; MILLER, J. N.; LOVETT, M. A. Selective release of *Treponema pallidum* outer membrane and associated polypeptides with triton x-114. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, n.12, p.5789-5796, Dez., 1988.

FAINE, S.; ADLER, B.; BOLIN, C.; PEROLAT, P. *Leptospira and leptospirosis*. 3.ed. Melbourne: MediSci, 1999. 272p.

GAMBERINI, M.; GOMEZ, R. M.; ATZINGEN, M. V.; MARTINS, E. A.; VASCONCELLOS, S. A.; ROMERO, E. C.; LEITE, L. C.; HO, P. L.; NASCIMENTO, A. L. Whole-Genome Analysis of *Leptospira Interrogans* to Identify Potential Vaccine Candidates Against Leptospirosis. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, v. 244, n.2, p. 305-313, Mar., 2005.

GRAVEKAMP, C.; VAN DE KEMP, H.; FRANZEN, M.; CARRINGTON, D.; SCHOONE, G. J.; VAN EYS, G. J.; EVERARD, C. O.; HARTSKEERL, R. A.; TERPSTRA, W. J. Detection of seven species of pathogenic leptospires by PCR using two sets of primers. **Journal of General Microbiology**, Londres, v.139, n.8, p.1691–1700, Ago., 1993.

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**, Washington, v. 69, n.8, p. 4958-4968, Ago., 2001.

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

HAAKE, D. A.; MATSUNAGA, J. Characterization of the Leptospiral Outer Membrane and Description of Three Novel Leptospiral Membrane Proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v.70, n.9, p.4936-4945, Set., 2002.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, n.12, p.6572-82, Dez., 1999.

HAAKE, D.A.; WALKER, E.M.; BLANCO, D.R. et al. Changes in the surface of *Leptospira interrogans* serovar Grippotyphosa during “in vitro” cultivation. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, n.3, p.1131-1140, Mar., 1991.

HARTWIG, D. D. **Vacina Recombinante de Subunidade contra Leptospirose: Avaliação do Potencial Imunogênico de Lipoproteínas**. 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Agrícola) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

HAUK, P.; MACEDO, F.; ROMERO, E. C.; VASCONCELLOS, S. A.; DE MORAIS, Z. M.; BARBOSA, A. S.; HO, P. L. In LipL32, the major leptospiral lipoprotein, the C terminus is the primary immunogenic domain and mediates interaction with collagen IV and plasma fibronectin. **Infection and Immunity**, Washington, v.76, n.6, p.2642–2650, Jun., 2008.

HOKE, D. E.; EGAN, S.; CULLEN, P. A.; ADLER, B. LipL32 Is an extracellular matrix-interacting protein of *Leptospira* spp. and *Pseudoalteromonas tunicata*. **Infection and Immunity**, Washington, v.76, n.5, p.2063–2069, Mai., 2008.

IRVING, M. B.; PAN, O.; SCOTT, J. K. Random peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. **Current Opinion in Chemical Biology**, Londres, v.5, p.314–324, Jun., 2001.

KOIZUMI, N.; WATANABE, H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine**, Kidlington, v. 22, n.11-12, p.1545-1552, Mar., 2004.

LARSSON, A.; CARLANDER, D., WILHELMSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v.10, n.1, p.29-36, Fev., 1998.

LAFETÁ, B.N. **Perfil protéico da membrana externa de *Leptospira interrogans* sorovariedade hardoprajitno**. 2006. 36 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

LEE, Y. C.; LEU, S. J.; HUNG, H. C.; WU, H-H.; HUANG, I.-J.; HSIEHE, W-S.; CHIU, W-T.; HSIEHG, M-S.; CHENG, T. F.; YANG Y-Y. A dominant antigenic epitope on SARS-CoV spike protein identified by an avian single-chain variable fragment (scFv)-expressing phage. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.117, n.1-2, p.75–85, Mai., 2007.

LIN, Y. P.; CHANG, Y. F. A domain of the *Leptospira* LigB contributes to high affinity binding of fibronectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.382, n.2, p.443-448, Out., 2007.

MALMSTROM, J.; BECK, M.; SCHMIDT, A.; LANGE, V.; DEUTACH, E. W.; AEBEERER, R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. **Nature**, London, v.460, n.7256, p.762-765, Ago., 2009.

MANHANI, M. N. **Seleção de peptídeos reconhecidos por imunoglobulinas Y anti-metacésteo de *Taenia solium* por phage display**. 2009. 98f. Dissertação (Mestrado em

Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

MANHANI, M. N.; RIBEIRO, V.S.; UEIRA-VIERIA, C.; GOULART, L.R.; COSTA-CRUZ, J.M.. Specific phage-display peptides discriminate different forms of neurocysticercosis by antibody detection in the serum samples. **Parasite Immunology**, Oxford, v.33, n.6, p322-329, Jun., 2011.

MANOUTCHARIAN, K.; TERRAZAS, L. I.; GEVORKIAN, G.; ACERO, G.; PETROSSIAN, P.; RODRIGUEZ, M.; GOVEZENSKY, T. Phage-Displayed T-Cell Epitope Grafted into Immunoglobulin Heavy-Chain Complementarity-Determining Regions: an Effective Vaccine Design Tested in Murine Cysticercosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.67, n.9, p. 4764–4770, Set., 1999.

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**, Salem, v.49, n.4, p.929–946, Ago., 2003.

MCBRIDE, A. J., D. A. ATHANAZIO, M. G. REIS, AND A. I. KO. Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Philadelphia, v.18, n.5, p.376–386, Out., 2005.

NALLY, J. E.; CHOW, E.; FISHBEIN, M. C.; BLANCO, D. R.; LOVETT, M. A. Changes in lipopolysaccharide O antigen distinguish acute versus chronic *Leptospira interrogans* infections. **Infection and Immunity**, Washington, v.73, n.6, p.3251–3260, Jun., 2005.

PALANIAPPAN, R U.M.; MCDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C. S.; PAN, M. J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y. F. Immunoprotection of recombinant Leptospiral immunoglobulin-like protein a against *Leptospira interrogans* serovar pomona infection. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.3, p.1745-1750, Mar., 2006.

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

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; HASSAN, F.; MCDONOUGH, S. P.; POUGH, M., BARR, S. C.; SIMPSON, K. W.; MOHAMMED, H. O.; SHIN, S.; MCDONOUGH, P.; ZUERNER, R. L.; QU, J.; ROE, B. Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.10, n. 53, Pt.10, p. 975-984, Out., 2004.

PALANIAPPAN, R. U.; CHANG, Y. F.; CHANG, C. F.; PAN, M. J.; YANG, C. W.; HARPENDING, P.; MCDONOUGH, S.P, DUBOVI, E.; DIVERS, T.; QU, J.; ROE, B. Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospires. **Molecular Cellular Probes**, London, v.19, n.2, p.111–117, Dez., 2005.

PETERSEN, A. M.; BOYE, K.; BLOM, J.; SCHLICHTING, P.; KROGFELT, K. A. First Isolation of *Leptospira fainei* Serovar Hurstbridge From Two Human Patients With Weil's Syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v.50, n.1, p.96-100, Jan., 2001.

PRUDENCIO, C. R. **Desenvolvimento de peptídeos recombinantes epítomos específicos do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* selecionados por bibliotecas de phage display**. 2008.150f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.

PRUDENCIO, C. R.; CARDOSO, R.; RODRIGUES, A. A. R.; GOULART, L. R. Antigen Fingerprinting of Polyclonal Antibodies Raised in Immunized Chickens with Total Tick Proteins: a Reservoir for the Discovery of Novel Antigens. **Journal of biological screening**, v.16, n.9, p.1027-1036, Out., 2011.

SAWADA, R.; PETERSON, C. Y.; GONZALEZ, A. M.; POTENZA, B. M.; MUELLER, B.; COIMBRA, R.; ELICEIRI, B.; BAIRD, A. A phage-targeting strategy for the design of spatiotemporal drug delivery from grafted matrices. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, London, v.17, p.4-7, Fev., 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1755-1536-4-7>

SILVA, É. 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**, Kidlington, v.25, n.33, p 6277-6286, Ago., 2007.

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 protein bind host fibronectin, laminin and regulators of complement. **PLoS One**, v.2, n.11, p. e1188, 2007. DOI:10.1371/journal.pone.0001188 88

SURUJBALLI, O.; ELMGREN, C. Monoclonal antibodies suitable for incorporation into a competitive enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for the detection of specific antibodies to *Leptospira interrogans* serovar Pomona. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.71, n.1-2, p.149-159, Jan., 2000.

TUNGTRAKANPOUNG, R., PITAKSAJJAKUL, P., NA-NGARM, N., CHAICUMPA, W., EKPO, P., SAENGJARUK, P., FROMAN, G. AND RAMASOOTTA, P. Mimotope of *Leptospira* from phagedisplayed random peptide library is reactive with both monoclonal antibodies and patients' sera. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.115, n.1-3, p.54-63, Jun., 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/ INTERNATIONAL LEPTOSPIROSIS SOCIETY (WHO). **Human Leptospirosis: Guidance for Diagnosis, Surveillance and Control**. Geneva: World Health Organization/International Leptospirosis Society, 2003.

ZUERNER, R. L.; HARTSKEERL, R. A.; VAN DE KEMP, H.; BAL, A. E. Characterization of the *Leptospira interrogans* S10-spc-alpha operon. **FEMS Microbiology Letters**, v.182, n.2, p.303-308, Jan., 2000.

APÊNDICE A

Sequência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados com IgY anti-PME e eluídos de forma ácida com suas respectivas frequências.

Localização	CLONE	SEQUENCIA	36/96	FREQUÊNCIA
D1	PMEac1	WGSSARYVLPMP	1/96	1,04%
F1	PMEac2	LTGGTGYSHDFR	1/96	1,04%
G1	PMEac3	GLKYLQYDWNKP	1/96	1,04%
A2	PMEac4	SPNHTAGPNSRS	1/96	1,04%
B2	PMEac5	DDMSWTRCCTSA	1/96	1,04%
B3	PMEac6	NATLQSWVRDAR	1/96	1,04%
G2	PMEac7	SNPVVQLDRLLP	1/96	1,04%
H4	PMEac8	VHQQEKPSMFLT	2/96	2,08%
A5	PMEac9	GLRDLSKEKLYR	3/96	3,12%
B5	PMEac10	TLSRITVSTFTH	1/96	1,04%
D5	PMEac11	GLKSLPSPPASQ	1/96	1,04%
A6	PMEac12	GLSDLPHSALYF	1/96	1,04%
B6	PMEac13	TWKHPALGMQGH	1/96	1,04%
G6	PMEac14	GLRSLNAEWYLR	1/96	1,04%
D7	PMEac15	HDXLISGHRQL	1/96	1,04%
B8	PMEac16	NNDLSLWSISKS	1/96	1,04%
C8	PMEac17	TMMGPLRTPDSA	1/96	1,04%
H8	PMEac18	DESVLGDTFYRM	1/96	1,04%
A9	PMEac19	SAQNPLFGPIAS	1/96	1,04%
B9	PMEac20	MHRSDLMSAAVR	1/96	1,04%
D9	PMEac21	GLKHLHDSTESQ	2/96	2,08%
E9	PMEac22	GIRDLYASLATH	1/96	1,04%
F9	PMEac23	AAHPSSMSEWPT	1/96	1,04%
G9	PMEac24	QNPQALVQISPK	1/96	1,04%
A10	PMEac25	NSQTQTLHLFPH	1/96	1,04%
D10	PMEac26	GLRDLIVPAVRL	3/96	3,12%
F10	PMEac27	GMKDLHALPTSS	1/96	1,04%
G10	PMEac28	GLKYHQSLQQYW	1/96	1,04%
H10	PMEac29	GLSDLIHQTTSH	1/96	1,04%
B11	PMEac30	AMNKTITKPLAI	1/96	1,04%
D11	PMEac31	GLKDFYPFKPLT	1/96	1,04%
G11	PMEac32	FRGSPEAQPTYF	1/96	1,04%
D12	PMEac33	ERMSVTPSISYV	1/96	1,04%
E12	PMEac34	HYSVESLLINST	1/96	1,04%

APÊNDICE B

Sequencia traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados com IgY anti-PME Hardjo e eluídos de forma competitiva e suas respectivas frequências.

Localização	CLONE	SEQUENCIA	65/96	FREQUÊNCIA
A1	PMEcomp1	QHYNIVNTQSRV	2/96	2,08%
B1	PMEcomp2	LPAFFVTNQTD	1/96	1,04%
C1	PMEcomp3	TLRLPIDQNNST	1/96	1,04%
F1	PMEcomp4	VPSYRITPNITP	1/96	1,04%
G1	PMEcomp5	GLKHLDWRTLRA	2/96	2,08%
H1	PMEcomp6	ATPHWLPPQVPW	1/96	1,04%
A2	PMEcomp7	AFETKLNPVYA	1/96	1,04%
C2	PMEcomp8	DGRFASKPVRVH	1/96	1,04%
E2	PMEcomp9	STLPLSTQRGWL	1/96	1,04%
F2	PMEcomp10	GLPPYSPHRLAQ	1/96	1,04%
A3	PMEcomp11	STPLVTGTNNLM	1/96	1,04%
B3	PMEcomp12	DTLINRSRAATA	1/96	1,04%
F3	PMEcomp13	GLKWFAPGDPIK	1/96	1,04%
G3	PMEcomp14	SGLIPNKYPSSA	1/96	1,04%
B4	PMEcomp15	SILMSPGSVSSQ	1/96	1,04%
C4	PMEcomp16	DLFSVHWPLKA	1/96	1,04%
D4	PMEcomp17	AGVMSPPHHVPP	1/96	1,04%
E4	PMEcomp18	SGLPHLSLNAPR	1/96	1,04%
H4	PMEcomp19	GLKFNTFASYS	1/96	1,04%
C5	PMEcomp20	LTTRHPHYSLPT	1/96	1,04%
D5	PMEcomp21	LTPNNYDTPSFR	1/96	1,04%
E5	PMEcomp22	GLSSLPTASKFY	1/96	1,04%
F5	PMEcomp23	DPFSLVPWGSFP	1/96	1,04%
H5	PMEcomp24	IPSLFTGELNVS	1/96	1,04%
B6	PMEcomp25	QFLAPLTLSSPW	1/96	1,04%
C6	PMEcomp26	TVLRTSSALPAT	1/96	1,04%
D6	PMEcomp27	EHMALTYFPRPP	2/96	2,08%
F6	PMEcomp28	GDPRPSYISHLL	1/96	1,04%
G6	PMEcomp29	GASEAPIAIKSL	1/96	1,04%
A7	PMEcomp30	LLADTTTHHRPWT	1/96	1,04%
C7	PMEcomp31	NWQPLPWTYPEY	1/96	1,04%
D7	PMEcomp32	MKNQQSIFYVTRG	1/96	1,04%
E7	PMEcomp33	MHHSHQLTDRIW	1/96	1,04%
F7	PMEcomp34	VTHSGLSRLTTM	1/96	1,04%
H7	PMEcomp35	HTKPAIAPHRPL	1/96	1,04%
A8	PMEcomp36	GLSWLDAIPLGN	1/96	1,04%
C8	PMEcomp37	GTSIATVWPPWF	1/96	1,04%
D8	PMEcomp38	FIFDTRNAGALN	1/96	1,04%
G8	PMEcomp39	YFPPFHPAHIRS	1/96	1,04%
H8	PMEcomp40	SYTNATYFPPQA	1/96	1,04%
B9	PMEcomp41	QYYGTQSTMSLS	1/96	1,04%
C9	PMEcomp42	GLKHFNSPITGL	2/96	2,08%
E9	PMEcomp43	SAHMHKHYHLP	1/96	1,04%
F9	PMEcomp44	GLKHNSVSDWRP	1/96	1,04%
G9	PMEcomp45	GGHIYETWKRGH	1/96	1,04%
A10	PMEcomp46	TWNQSTVHSLPR	1/96	1,04%
B10	PMEcomp47	TPFLPNVGTFSR	2/96	F12

C10	PMEcomp48	MHWHNVTPSSYA	1/96	1,04%
F10	PMEcomp49	VNCSRPRTPFQDY	1/96	1,04%
H10	PMEcomp50	THPTQWPYKTSS	1/96	1,04%
A11	PMEcomp51	NSDHMPILTRR	1/96	1,04%
B11	PMEcomp52	HSSASDRSRPL	1/96	1,04%
C11	PMEcomp53	SVVAHSISGLHW	1/96	1,04%
D11	PMEcomp54	HLVNYDIRQMKT	1/96	1,04%
E11	PMEcomp55	GLSSLRNNLPN	1/96	1,04%
F11	PMEcomp56	ISKNVYTATVPY	1/96	1,04%
H11	PMEcomp57	YDTVSEQGRKQS	1/96	1,04%
A12	PMEcomp58	SSNYQMYYYQYFS	1/96	1,04%
B12	PMEcomp59	GLAWLPSTHTA	1/96	1,04%
D12	PMEcomp60	GLRHVHERMPNF	1/96	1,04%
E12	PMEcomp61	TTFNRNIYTWLK	1/96	1,04%
G12	PMEcomp62	LMAVPLSLTGIM	1/96	1,04%
H12	PMEcomp63	RSNTYDWINSVI	1/96	1,04%

APÊNDICE C

Sequência traduzida de aminoácidos dos peptídeos expressos nos clones de fagos selecionados com IgY anti-*Leptospira* e suas respectivas frequências.

Localização	CLONE	SEQUENCIA	37/96	FREQUÊNCIA
A1	Lep1	GLKYLTAPPLAA	2/96	2,08%
E1	Lep2	LLADTTHHRPWT	2/96	2,08%
A2	Lep3	GMKDLHVALPTP	2/96	2,08%
A3	Lep4	SRLAVTPNTQHP	2/96	2,08%
C4	Lep5	DDHRIGLLHTRP	1/96	1,04%
E4	Lep6	DPKSPSTYLTAP	1/96	1,04%
D5	Lep7	GPARTYNNYNSW	1/96	1,04%
F5	Lep8	GLSALLQHNLFF	1/96	1,04%
G5	Lep9	NFQHMKSFPFPPR	2/96	2,08%
C6	Lep10	QNYIGPLNAPRW	1/96	1,04%
D6	Lep11	IDHAGYQWQHSS	1/96	1,04%
A7	Lep12	DSFPDTRNHILR	1/96	1,04%
B7	Lep13	KPTDLQLQSARQ	1/96	1,04%
C7	Lep14	TLTTHGRLFESN	1/96	1,04%
F7	Lep15	SATPLSLNSSHR	1/96	1,04%
H7	Lep16	GLKDIYSRWSP	1/96	1,04%
A8	Lep17	DDHRIGLLHTSP	1/96	1,04%
B8	Lep18	NISIRHTTPWVS	1/96	1,04%
D8	Lep19	GLKDLASMLLPP	1/96	1,04%
F8	Lep20	GLSSLTTKLALL	4/96	4,16%
A9	Lep21	YSYQVGPTSPRY	2/96	2,08%
D9	Lep22	WAPPLFRSSLFY	1/96	1,04%
H9	Lep23	AKSTPGMKAEWL	1/96	1,04%
B10	Lep24	IEHPKTPDHSR	1/96	1,04%
D10	Lep25	QTYPLVSLYSVG	1/96	1,04%
F10	Lep26	NSMIAHNKTRMH	1/96	1,04%
A11	Lep27	GLQQQLQHAHWN	1/96	1,04%
B11	Lep28	AMAYNPKSQIVD	1/96	1,04%
C11	Lep29	GDPRPSYISHLL	1/96	1,04%
D11	Lep30	NWPVNLRPWIA	1/96	1,04%
E11	Lep31	WSPGQQRLHNST	1/96	1,04%
F11	Lep32	VPLRPFANADGS	1/96	1,04%
G11	Lep33	AGRIIPSTPHG	1/96	1,04%
F12	Lep34	LPYPQHPGSLGR	1/96	1,04%
H12	Lep35	QAEPSPLTMLFP	1/96	1,04%

ANEXO A

Preparo de soluções utilizadas no experimento

Meios de Cultura

Meio LB (*Luria Bertani*):

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)
Ajustar o pH para 7,0	

Meio LB ágar:

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 1,4% (p/v).

Meio LB top ágar:

Meio LB adicionado de ágar bacteriológico a uma concentração final de 0,7% (p/v).

5.5. Antibióticos

Solução estoque: Tetraciclina (SIGMA) 20mg/ml

Essa solução foi preparada em etanol, esterilizada por filtração em filtro Millipore 0,2 µm e estocadas a -20°C.

• IPTG (isopropil-β-D- thiogalactopyranoside) 1M

IPTG (SIGMA)	0,238 g
Água mili Q	1 mL

A solução foi esterilizada por filtração em filtro MILLIPORE 0,2 µm e estocada a -20°C.

Soluções para eletroforese em Gel Agarose e de Poliacrilamida

- **Tampão de corrida para gel de Agarose (TBE) 10X**

Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno cianol	0,1% (p/v)

- **Tampão de amostra para Gel de Agarose 10X**

Tampão de corrida TBE 20X	50% (v/v)
Glicerol	50% (v/v)
Azul de Bromofenol	0,1% (p/v)
Xileno cianol	0,1% (p/v)

- **Solução de Brometo de etídio 20.000X**

Brometo de etídio	10 mg/mL
-------------------	----------

- **Tampão de corrida para SDS-PAGE (5X)**

Tris base	125 mM
Glicina	125 mM
SDS	0,5
pH 9,2	

- **Tampão de amostra para SDS-PAGE 2X**

Tris-HCl pH 6,8	100 mM
SDS	4% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
B-mercaptoetanol	5%
Azul de bromofenol	0,2% (p/v)

- **Acrilamida 49%/Bis-acrilamida 0.5%**

Acrilamida	98 g
Bis-acrilamida	1 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL

Estocada na geladeira, ao abrigo de luz

- **Tris-HCl 3 M, pH 8,3**

Tris	72,68 g
H ₂ O q.s.p.	200 mL

- **Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8**

Tris	12,11g
H ₂ O q.s.p.	200 MI

- **SDS 10% (p/v)**

SDS	10 g
H ₂ O q.s.p.	100 mL

- **PSA 10% (p/v)**

Persulfato de amônio	100 mg/1 mL de água
----------------------	---------------------

- **Gel de empilhamento SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	10,41mL
Tris-HCl pH 8,3	3,75mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	1,50mL
PSA 10% (p/v)	140µL
TEMED	10µL

- **Gel de separação SDS-PAGE**

H ₂ O destilada	5,90mL
Tris-HCl pH 8,3	13,35mL
Solução Acrilamida/Bis-acrilamida	13,25mL
Glicerol	7,48mL
PSA 10% (p/v)	140µL
TEMED	7µL

- **Solução corante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)
<i>Comassie Brilliant Blue</i> (R-250)	1% (p/v)

- **Solução descorante para Gel SDS-PAGE**

Metanol	40% (v/v)
Ácido acético	10% (v/v)

- **PBS pH 7,4**

Na ₂ HPO ₄ 1 M	68,4 mL
NaH ₂ PO ₄ 1 M	31,6 mL
NaCl 2,5 M	58 mL
q.s.p. 1000 mL de H ₂ O destilada	

- **PBST pH 7,4**

PBS adicionado de tween 20 a 0,05% (v/v).

- **PBS-BSA 5%**

PBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 5% (p/v)

- **Tampão Bicarbonato de sódio 0,1 M, pH 8,6**

Bicarbonato de sódio	420 mg
H ₂ O destilada	90 mL

O pH foi ajustado para 8,6

O volume final foi completado para 100 mL.

- **TBS 10X (estoque)**

Tris(hydroxymethyl)aminomethano	0,5 M
NaCl	1,5 M

O pH foi ajustado para 7,4

- **TBS–BSA 5% TBS+leite em pó desnatado**

TBS 1X adicionado de albumina bovina sérica a 5% (p/v)

- **TBST 0,5% (tampão de lavagem)**

TBS 1X adicionado de 0,5% (v/v) de Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate)
– Sigma

- **Tampão de eluição**

HCl 0,1M

O pH foi ajustado para 2,2 com Glicina (Sigma).

- **Tampão de neutralização**

Tris-Base 2 M diluído em água.

5.10. Soluções para purificação de proteína em Coluna de Níquel Sepharose (HPLC)

- **Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque)**

NaHPO ₂ -2H ₂ O	1.42 g
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O	1.1 g
NaCl	23,38 g

Os solutos foram diluídos em 90 mL de água destilada, o pH da solução foi ajustado para 7,4, o volume foi completado para 100 ml e a solução foi filtrada com filtro de 0,45 µm. Concentrações finais: Fosfato = 160 mM e NaCl = 4M.

- **Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque)**

Imidazol	13,63 g
Água destilada	90 mL

O soluto foi completamente diluído, o pH foi ajustado para 7,4 com HCL, o volume final foi completado para 100 mL e a solução, filtrada em filtro com poros de 0,45 µm.

- **Tampão de ligação (240 mL)**

Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque) 30 mL

Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque) 2,4 mL

H₂O q.s.p. 240 mL

Contrações finais: Fosfato = 20 mM, NaCl = 0,5 M, Imidazol = 20 mM.

pH 7,4.

- **Tampão de Eluição (80 mL)**

Tampão Fosfato 8 X, pH 7,4 (estoque) 10 mL

Tampão Imidazol 2M pH 7,4 (estoque) 20 mL

H₂O q.s.p. 80 mL

Contrações finais: Fosfato = 20 mM, NaCl = 0,5 M, Imidazol = 500 mM.

pH 7,4

Tampão TE

10mM de Tris hidróclorido - 2mM EDTA

PBS10X

PEG NaCl

20% p/v de polietileno glicol-8000; NaCl 2,5 M

ANEXO B

Protocolo Comitê de Ética na Utilização de
Animais



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A - Campus Santa Mônica -
Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceuaufu@yahoo.com.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 071/12 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 044/12**

Projeto Pesquisa: “Produção e aplicação de igr obtido a partir de imunizações de galinhas com extrato proteico e antígeno total de *brucella abortus*, *leptospira interrogans* e vírus da anemia infecciosa equina.”

Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Anna Monteiro Correia Lima Ribeiro

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

AO FINAL DA PESQUISA DEVE SER ENTREGUE À CEUA UM RELATÓRIO. O MODELO DESTES ESTÁ NO SITE.

.

Uberlândia, 16 de Agosto de 2012

Prof. Dr. Jonas Dantas Batista
Coordenador *Pro tempore* da CEUA/UFU