

Marina Yukari Kubota

**Avaliação de MPLA como
adjuvante em formulações
vacinais contra leptospirose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/ Instituto Butantan, para o título de
Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Elizabeth Angelica Leme
Martins

Versão Original

**São Paulo
2015**

RESUMO

KUBOTA, M. Y. **Avaliação de MPLA como adjuvante em formulações vacinais contra leptospirose.** 2015. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Lipopolissacarídeos (LPS) de *L. interrogans*, *S. enterica* e *B. pertussis* foram extraídos e as subfrações monofosforil lipídeo A (MPLA) preparadas por hidrólise.

O LPS é responsável por forte resposta imunológica e endotóxica em mamíferos, enquanto o MPLA apresenta baixa endotoxicidade e boa capacidade imunomoduladora. Estudamos a atividade adjuvante de LPS e de MPLA em formulações com antígenos LigA ou OmpA contra leptospirose. Testes de imunização e desafio em hamsters confirmaram alta atividade imunoprotetora de LigA e capacidade adjuvante do MPLA de salmonela e de LPS de leptospirosas, mas as formulações não foram capazes de bloquear a colonização renal na leptospirose. Os resultados sugerem diferenças na imunidade protetora sistêmica da imunidade protetora renal.

Palavras-Chave: *S. enterica*. *L. interrogans*. LPS. MPLA. Adjuvante. LigA. OmpA.

ABSTRACT

KUBOTA, M. Y. **Avaliation of MPLA as adjuvant in vaccine formulation against leptospirosis**. 2015. 126 p. Master thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015

Lipopolysaccharides (LPS) of *L. interrogans*, *S. enterica* and *B. pertussis* were extracted and the subfraction monophosphoril lipid A (MPLA) prepared by hydrolysis. The LPS is responsible for immunological response and endotoxicity in mammallians, while MPLA has reduced endotoxic activity, but maintain the immunomodulatory capacity. We studied the adjuvant capacity of LPS and MPLA in formulations with LigA or OmpA antigens against leptospirosis. Tests of immunization and challenge in hamsters confirmed the high immune protection activity of LigA and adjuvant capacity of MPLA of salmonela and LPS of lepstopiras, however formulations did not block the renal colonization. The results suggest that there are differences in the systemic immune protection from the kidney immune protection.

Keyword: *S. enterica*. *L. interrogans*. LPS. MPLA. adjuvant. LigA. OmpA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leptospirose

A leptospirose é uma doença causada por bactérias espiroqueta do gênero *Leptospira*, que afeta milhões de pessoas no mundo (FAINE; SOLLY et al., 1999; GANOZA et al., 2006, SOLLY et al., 1999). A infecção em humanos ocorre principalmente através de água contaminada por urina de ratos portadores da bactéria (CHEVILLE; HUHN; CUTLIP, 1980). A doença ocorre, sobretudo, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento e prevalece em locais de clima tropical (GANOZA et al., 2006). O crescimento urbano desordenado e a falta de saneamento básico favorecem a presença desses roedores e a disseminação da doença, principalmente nos períodos de chuvas e enchentes (HOTEZ; FERRIS, 2006). Outros animais, tais como bovinos, suínos e caprinos também podem ser infectados e desenvolver a doença, resultando em grandes perdas para a pecuária (SLACK, 2010).

No Brasil, o número de infecções por leptospira alcança 5000 casos por ano e os casos fatais podem chegar a 25% do número de infecções registrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Estima-se que ocorram 350.000 a 500.000 casos severos de leptospirose em humanos todos os anos no mundo. Estes números podem ser subestimados uma vez que os sintomas da leptospirose são confundidos com outras doenças (HARTSKEERL; COLLARES-PEREIRA; ELLIS, 2011).

A leptospirose pode se manifestar de duas formas distintas, anictérica ou ictérica. A forma anictérica é caracterizada por febre alta contínua, calafrios, dores de cabeça, dores musculares e abdominais, diarreia, náuseas e vômitos. A forma ictérica, mais grave, também conhecida como síndrome de Weil, é caracterizada por icterícia, insuficiência renal, distúrbios hemorrágicos e alta mortalidade (FAINE, S. et al., 1999; TREVEJO et al., 1998;).

O número de casos de leptospirose é certamente subestimado devido às dificuldades de diagnóstico (KO et al., 1999). Na fase inicial da doença, o diagnóstico pode ser feito por visualização microscópica da bactéria no sangue, por cultivo da leptospira em meio apropriado ou detecção do DNA da bactéria por PCR. Em uma fase tardia, a bactéria pode ser coletada de urina, líquor ou

sangue e cultivada *in vitro*. O crescimento da bactéria *in vitro* é lento, demorando em média quatro semanas. Portanto, este tipo de diagnóstico não consegue acompanhar o desenvolvimento da doença (BROWN et al., 1995; ZUERNER; ALT; BOLIN, 1995). Após sete dias da infecção, quando começam a aparecer os sintomas da doença, é possível fazer a detecção de anticorpos, nesta fase o teste mais comum é o ELISA-IgM. É possível também fazer o teste de microaglutinação (MAT), entretanto o MAT necessita de manutenção das cepas marcadoras.

1.2 Vacinas contra leptospirose

As leptospirosas, após a infecção, têm capacidade de se translocar rapidamente entre as células do hospedeiro, atingir a corrente sanguínea, se disseminar e colonizar alguns órgãos (BAROCCHI et al., 2002), a leptospira ainda consegue evadir-se do sistema imune do hospedeiro. Essas características da bactéria somadas à existência de grande variedade de sorovares determinam sérias dificuldades no desenvolvimento de uma vacina efetiva contra a leptospirose (WANG; JIN; WEGRZYN, 2007).

Existem vacinas contra leptospirose para humanos que são baseadas em bacterinas, resultando em imunização efetiva, mas específicas contra os sorovares presentes nas formulações. Outro problema é que a proteção conferida por vacinas baseadas em bacterinas é de curta duração, o que possivelmente está relacionado às respostas imunes inatas contra a porção lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias (RODRIGUEZ-GONZALEZ et al., 2004).

Vacinas proteicas apresentam vantagem em relação a antígenos polissacarídicos, uma vez que se poderiam utilizar proteínas conservadas entre diferentes sorovares de leptospira, induzindo proteção de mais amplo espectro. Antígenos proteicos também induzem resposta imune adaptativa e de mais longa duração. Portanto, no desenvolvimento de vacinas são estudadas proteínas com alta capacidade antigênica e que induzam imunidade protetora.

No desenvolvimento de uma vacina ideal contra a leptospirose procuram-se as características: a - induzir resposta imune duradoura; b - capaz de induzir proteção eficiente contra septicemia; c - capaz de evitar a

colonização renal pela bactéria; d - formulações não reatogênicas ou endotóxicas.

1.3 Adjuvantes vacinais

Os adjuvantes vacinais têm o papel de aumentar a produção de anticorpos ou modular a resposta imune entre imunidade de mucosa, humoral e celular e são usados para melhorar a capacidade protetora da imunização (MBOW et al., 2010).

Poucos adjuvantes são licenciados para o uso em humanos, podendo-se citar sais hidrato de alumínio, AS04 (adjuvante system) e emulsões de água e óleo (MF59) (O'HAGAN; DE GREGORIO, 2009).

O alumínio é o adjuvante mais utilizado nas vacinas por promover estabilidade e imunogenicidade dos antígenos, aumentando a produção de anticorpos (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008). O adjuvante AS04, uma mistura de monofosforil lipídeo A (MPLA) de salmonelas e alumínio que auxiliam em uma resposta rápida e local por ativação das células apresentadoras de antígenos (APC), induzindo a produção de NF- κ B e outras citocinas, devido à resposta imune inata (DIDIERLAURENT et al., 2009).

O MPLA de *Salmonella minnesota*, uma subfração do LPS da bactéria, tem sido usado como adjuvante vacinal em humanos (TAGLIABUE; RAPPUOLI, 2008) e estudos clínicos mostram que esta molécula é um agonista do Toll like receptor 4 (TLR4), apresentando boas respostas como adjuvante em vacinas contra *Pseudomonas aeruginosa* e vírus influenza (ROMERO et al., 2011). O MPLA de *Bordetella pertussis* também foi estudado como adjuvante em vacina contra vírus da influenza (QUINTILIO et al., 2009).

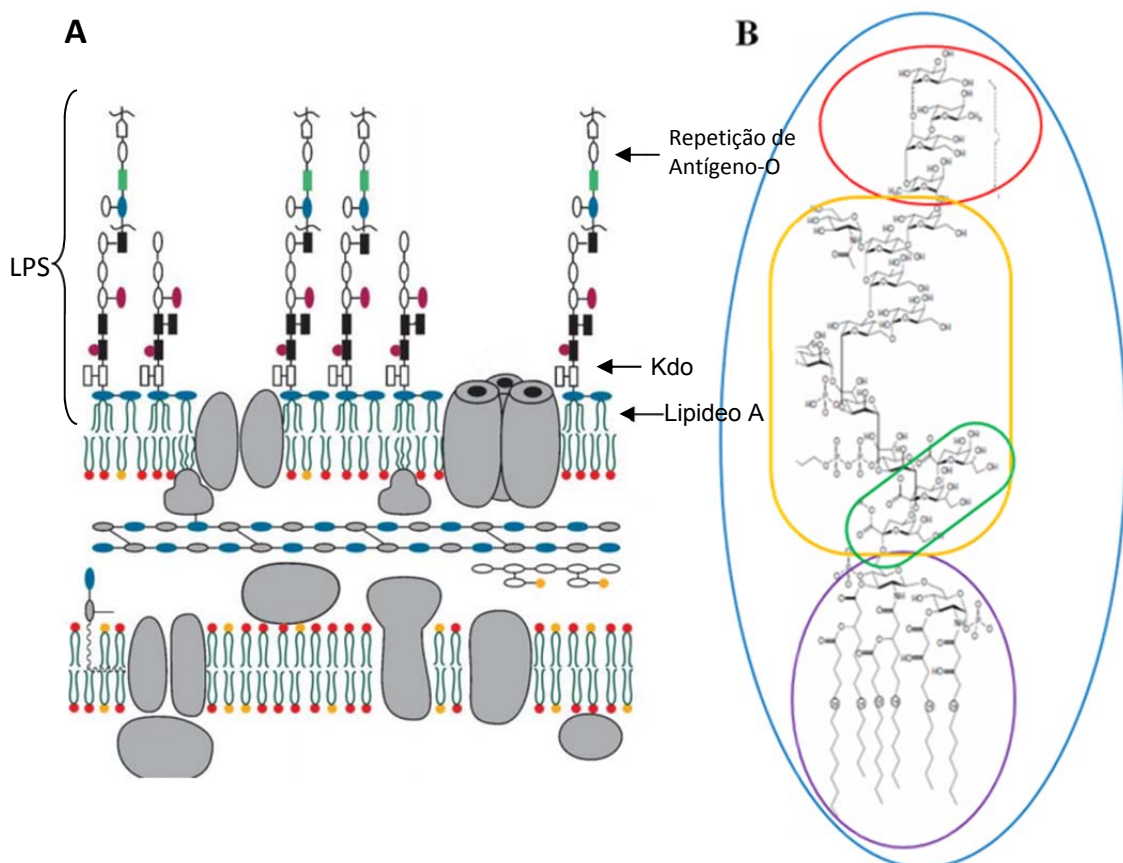
Em nosso laboratório, investigamos antígenos de leptospiros com potencial vacinal selecionados *in silico*, sobre o genoma da bactéria (GAMBERINI et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2004). Nesse contexto, investigamos o potencial adjuvante de MPLA de salmonelas e MPLA de leptospiros na modulação da resposta imune em formulações que contenham os antígenos proteicos com potencial vacinal contra leptospirose.

1.4 Caracterização de LPS, lipídeo A e MPLA

O LPS é o componente majoritário nas membranas de superfície das bactérias Gram-negativas. Esta molécula é um composto tóxico para mamíferos, sendo o causador de sintomas como febre, diarreia, choque séptico e morte (EL HAMIDI et al., 2005). A Figura 1 apresenta um esquema das membranas interna e externa de bactérias Gram negativas.

A molécula possui três regiões distintas: (a) a porção lipídeo A, com açúcares glicosamina ligados a lipídeos compondo a membrana celular, (b) um core central polissacarídico e (c) uma porção de polissacarídeos específicos (PS) ligados ao core por oxigênio, denominada antígeno-O.

Figura 1 – **(A)** Esquema da estrutura de membranas de bactérias Gram-negativas. **(B)** Modelo do LPS de salmonela

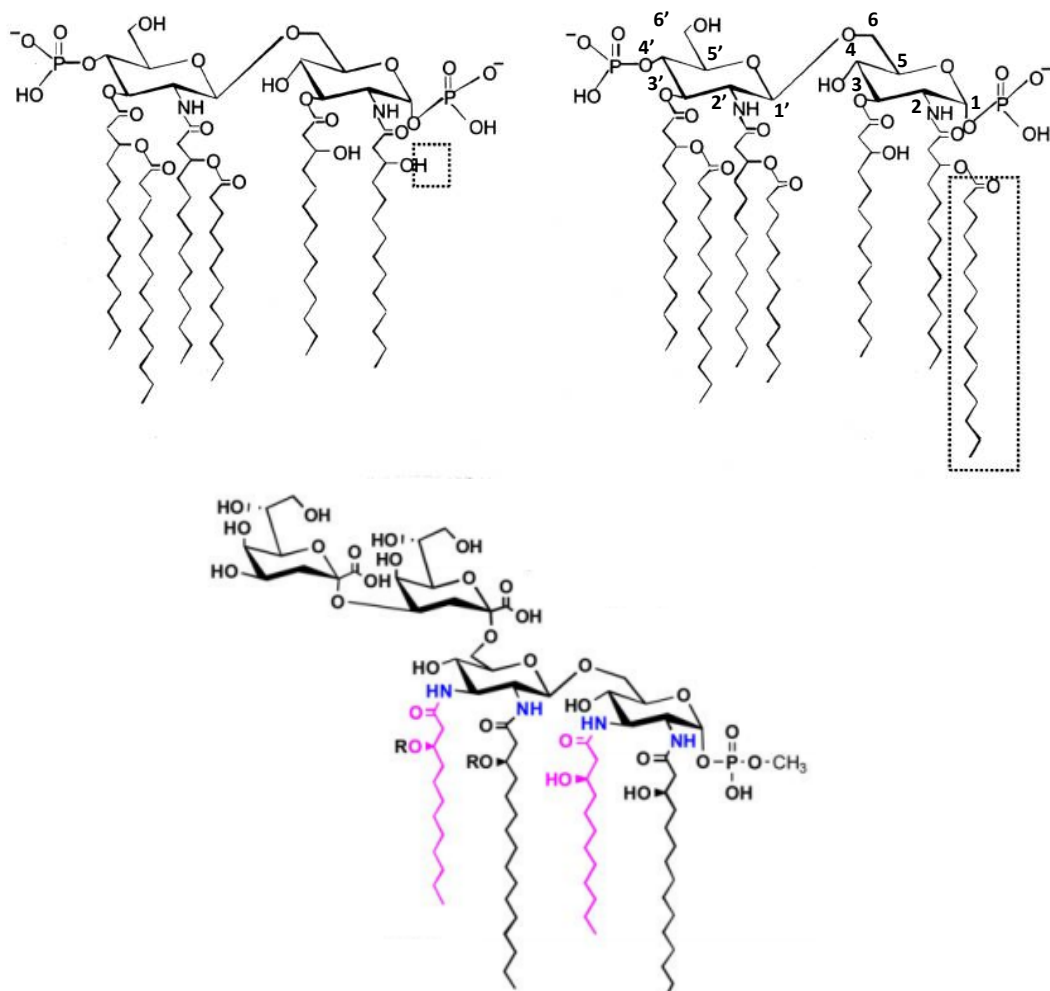


(A) Esquema da estrutura de membranas de bactérias Gram-negativas (RAETZ et al., 2009)
(B) Modelo de LPS de salmonela (WILKINSON, 1996). O círculo violeta está sobre o esquema do lipídeo A, círculo verde está sobre a região do KDO; círculo laranja destaca o núcleo conservado de açúcares e, círculo vermelho indica porção polissacarídica (antígeno-O)

O lipídeo A é a porção responsável pela atividade endotóxica do LPS (GALANOS; FREUDENBERG et al., 1984), enquanto a porção antígeno-O é responsável pela indução de anticorpos específicos, os quais são usados para a classificação dos sorovares bacterianos através de reconhecimento específico de anticorpos ao LPS, desta forma mais de 260 sorovares de leptospiros foram identificados (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; BULACH et al., 2000).

O LPS da maioria das bactérias Gram-negativas possui lipídeo A com dois grupos fosfatos, ligados aos açúcares glicosaminas proximal (posição 1) e distal (posição 4') (Figura 2) (RAETZ et al., 2007).

Figura 2 - Diferenças estruturais entre moléculas de lipídeo A.



E. coli (esquerda) e de *Salmonella* (direita) (MUROI; OHNISHI; TANAMOTO, 2002). Estrutura monofosforil lipídeo A de *Leptospira interrogans* (abaixo) (ROBINS; WILLIAMS; RAETZ, 2009).

A porção lipídeo A do LPS de leptospiros apresenta-se atípica em relação a outras bactérias Gram-negativas: seu lipídeo A pode apresentar entre

quatro a seis cadeias lipídicas, de diferentes comprimentos com ligações insaturadas; quatro cadeias lipídicas são ligadas às glicosaminas por amidas; possui somente um grupo fosfato metilado na posição 1 do açúcar proximal (QUE-GEWIRTH et al., 2004). A endotoxicidade do lipídeo A de leptospiras é cerca de 100 vezes menor quando comparado ao lipídeo A de outras bactérias Gram-negativas, o que se confirma por não promover coagulação de limulus, a reação típica de dosagem de endotoxina (NAHORI et al., 2005).

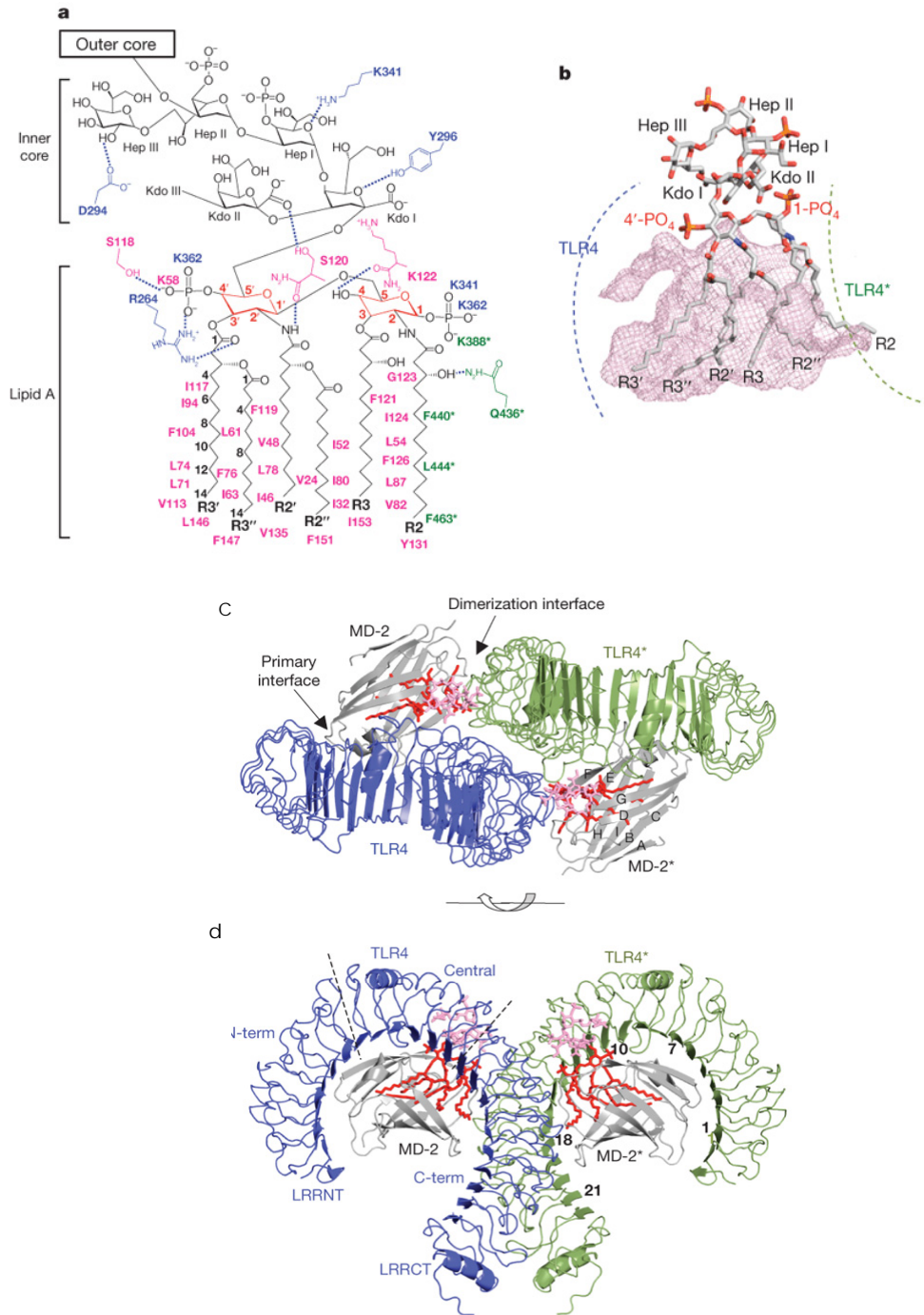
1.5 Ativação do sistema imune de mamíferos por LPS e seus derivados

Toll like receptors (TLRs) são proteínas presentes na superfície de células do sistema imune de mamíferos que interagem com componentes bacterianos conservados, tal como LPS, resultando na ativação do sistema imune (FITZGERALD; ROWE; GOLENBOCK, 2004; NAHORI et al., 2005; PARK et al., 2009; WERTS, 2010). Muitos estudos vêm esclarecendo a complexidade da resposta imunológica ao LPS e seus derivados, revelando uma intrincada rede de informações moleculares entre as células do hospedeiro (AYBAY; IMIR, 1998; BEUTLER, 2004; KAWAI; AKIRA, 2011). O reconhecimento do LPS pelos receptores celulares é traduzido em sinais que comandam a produção de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e outros fatores associados tanto à inflamação quanto às respostas imunes, resultando em efeito tóxico ou de proteção imune contra os patógenos bacterianos (ROMERO et al., 2011).

A topografia do complexo LPS /moléculas adaptadoras /TLR4 foi estudada por cristalografia, como esquematizado na Figura 3. A estrutura do TLR4 que engloba a porção lipídeo A da molécula de LPS é chamada de “pocket” (PARK et al., 2009).

O LPS da maioria das bactérias Gram negativas ligam-se principalmente ao TLR4 (GORIS et al., 2011; NAHORI et al., 2005; WERTS, 2010), entretanto, o LPS de leptospira liga-se principalmente ao receptor TLR2 de células humanas (WERTS et al., 2001). Outros estudos também indicaram que há interação do LPS de leptospira com TLR2, TLR4 e TLR5 e que resulta em produção de IL-6 e TNF- α (GORIS et al., 2011).

Figura 3 - Esquema da ligação do LPS ao receptor TLR4 e proteína adaptadora MD2.



a - Estrutura química do LPS de *E. coli*; **b** - a superfície da proteína MD-2 desenhada em malha, ilustrando a interação do LPS no "pocket"; **c** - Vista superior do complexo TLR4-MD2-LPS; **d**, Vista lateral do complexo TLR4-MD2-LPS (PARK et al., 2009)

O MPLA tem capacidade adjuvante na resposta imune sem desencadear os efeitos endotóxicos do lipídeo A ou do LPS (GALANOS; LEHMANN, et al., 1984; MATA-HARO et al., 2007; MCALEER; VELLA, 2010; ROMERO et al., 2011). O MPLA é 99% menos tóxico que o lipídeo A (difosforil), o que torna

interessante o seu uso como adjuvante (ROMERO et al., 2011). Esta molécula também interage com as proteínas adaptadoras e o receptor TLR4, mas sinalizam diferentes vias da resposta imune, não induzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como NF- κ B, IL-1, IL-6, TNF- α , mas mantendo ou até aumentando fatores e atividades relacionadas com resposta imune celular (COATS et al., 2011; MATA-HARO et al., 2007; ROMERO et al., 2011).

Lipídeo A e MPLA podem ser obtidos por hidrólise de LPS, as condições de hidrólise podem determinar a perda de cadeias lipídicas ou de um grupo fosfato, gerando preparações heterogêneas de lipídeo A com moléculas que podem ser agonistas, antagonistas ou inativas na interação com os receptores (KARIBIAN; DEPRUN; CAROFF; 1993). Diferenças estruturais do lipídeo A, como número e posição dos grupos fosfatos ou cadeias lipídicas, determinam diferentes propriedades imunológicas (AYBAY; IMIR, 1998; COATS et al., 2011).

1.6 Modificação de LPS de salmonela pela enzima heteróloga LpxE

Foi mostrado que o lipídeo A pode ser obtido monofosforilado em salmonelas recombinantes expressando a proteína LpxE de *Francisella tularensis*. LpxE (lipídeo A 1-fosfatase) é uma enzima que remove o grupo fosfato da posição 1 do lipídeo A (Figura 2). Para diminuir a endotoxicidade de salmonelas usadas como vacinas vivas, o gene *lpxE* foi inserido no microrganismo para expressão constitutiva, resultando em efetiva defosforilação do lipídeo A do LPS na membrana externa do microrganismo durante o cultivo (KONG et al., 2011).

1.7 Antígenos vacinais contra leptospirose

Diversas proteínas de leptospira têm sido investigadas com relação ao seu potencial vacinal. Neste estudo utilizamos os antígenos recombinantes LigA e OmpA.

Proteína LigA (leptospiral immunoglobulin – like protein) - está presente na membrana externa da leptospira e possui atividade antigênica, sendo reconhecida por soro de pacientes infectados. A proteína LigA é conservada

entre os sorovares patogênicos de leptospira e a perda de expressão do gene está relacionada com perda de virulência (MATSUNAGA et al., 2003). Estudos anteriores do laboratório e descritos na literatura (SILVA et al., 2007) mostraram que a imunização de hamsters com LigA resulta em alta proteção contra a leptospirose, embora não seja eficiente para evitar a colonização renal e assim determinar proteção esterilizante.

LigA possui domínios de aproximadamente 85 aminoácidos similares a imunoglobulinas de bactérias. Essa proteína tem a capacidade de se ligar a proteínas da matriz extracelular e a fibrinogênio sugerindo que estão envolvidas na colonização inicial e disseminação das leptospiras no hospedeiro (CHOY et al., 2007). A proteína nativa possui aproximadamente 128 kDa, proteínas de alto peso molecular são geralmente difíceis de purificar. Entretanto, neste trabalho, clonamos apenas a porção C-terminal da proteína (LigAc), com aproximadamente 62 kDa. A proteína LigAc foi capaz de induzir proteção contra infecção em hamsters imunizados (SILVA et al., 2007).

Proteína Omp A (Outer membrane protein) - também chamada Loa22, está presente na maioria das bactérias Gram-negativas ancorada aos peptidoglicanos. OmpA está envolvida em diversas funções da célula, tais como adesão celular, invasão tecidual (TENG et al., 2006) e atua na entrada e saída de solutos na célula (FINDLAY; MCCLAFFERTY; ASHLEY, 2005). Estudos prévios do laboratório demonstraram que OmpA de leptospira induziu proteção parcial dos hamsters contra leptospirose, corroborando dados da literatura (NALLY et al., 2007; TORRES et al., 2006).

2 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível extrair LPS de leptospiros e preparar MPLA por hidrólise branda. Também extraímos LPS de salmonelas, porém não obtivemos MPLA por hidrólise branda, mas apenas lipídeo A. Por isso propusemos a estratégia de gerar clones de salmonela expressando a proteína LpxE, a qual faz a defosforilação do lipídeo A da bactéria em cultivo, para gerar um LPS monofosforilado (KONG et al., 2011) e facilitar a obtenção do MPLA de salmonelas. Esses clones também podem ser interessantes para diminuir a endotoxidade na utilização como vacinas vivas atenuadas. Entretanto, pelos testes efetuados por espectrometria de massa ainda não obtivemos sucesso na expressão de LpxE e defosforilação do LPS.

Com relação aos antígenos estudados OmpA e LigA podemos considerar: a proteína OmpA está relacionada à virulência da leptospira durante a infecção (NALLY et al., 2007) e é reconhecida por soro de pacientes com leptospirose (GAMBERINI et al., 2005). Entretanto, em nossos resultados a imunização com a proteína OmpA não protegeu os hamsters contra leptospirose. Por k-ELISA verificamos que este antígeno foi fracamente imunogênico. Ao contrário de LigA, que é estudado como um bom potencial vacinal (KOIZUMI; WATANABE, 2004), pois nitidamente induz imunoproteção em hamsters contra leptospiros virulentos aumentando a sobrevivência (SILVA et al., 2007). Entretanto, a proteção foi parcial e não esterilizante, ou seja, os animais estavam infectados com rins colonizados. Em desafios com maior número de bactérias, alguns animais imunizados com LigA apresentaram sintomas de leptospirose nos 21 dias de observação.

Estudamos o potencial dos agentes MPLA e LPS em adjuvar a resposta imunológica dos antígenos OmpA e LigA para verificar possível indução de imunoproteção esterilizante, entretanto isso não foi verificado com qualquer dos adjuvantes testados.

A imunoproteção de animais por vacinas comerciais é sorovar específica, indicando que depende do LPS presente na formulação. Assim, seria esperado que a imunização com LPS de *L. interrogans* sv Copenhageni protegesse os animais contra o desafio com leptospiros do mesmo sorovar. De fato, imunizações com MPLA ou LPS de leptospira afetaram a resposta imune,

conferindo proteção contra a bactéria virulenta, sendo que o grupo controle, animais que receberam apenas MPLA ou LPS sem o antígeno, apresentaram 30% de sobrevivência (segundo ensaio em animais). Entretanto, a proteção foi parcial e indica que outros fatores da vacina também são importantes.

Observamos que o uso de MPLA de salmonela nas imunizações resultou em aumento de anticorpos específicos contra os antígenos, quando comparado com imunizações com somente Alhydrogel como adjuvante, entretanto esta resposta não refletiu na proteção renal contra a infecção. A atividade adjuvante de MPLA de salmonelas foi confirmada em outros estudos, em formulações de vacinas contra hepatite B, tétano e influenza (BALDRIDGE et al., 2000).

Estudos de outros pesquisadores mostraram que imunização com doses entre 2,5 e 100 µg de LPS ou PS induziram alta proteção aos animais contra leptospirose (Jost, Adler e Faine, 1989) e também conferiram proteção cruzada, quando hamsters foram imunizados com LPS de *L. biflexa* sorovar Patoc e foram desafiados com *L. interrogans* sorovar Manilae (MATSUO; ISOGAI; ARAKI, 2000).

As dosagens de anticorpos nos soros dos animais imunizados com LigA com os adjuvantes MPLA de salmonela, de leptospira ou de bordetela ou LigA com LPS de leptospira mostraram grande variação na quantidade de anticorpos anti-LigA por animal dentro do mesmo grupo, em comparação com os soros dos animais imunizados com LigA com adjuvante hidrato de alumínio.

Apesar da variação biológica entre os animais, nossos resultados indicam que o MPLA e o LPS podem interferir positivamente ou negativamente na resposta imune. Um dos fatores que podem contribuir para esta dispersão na resposta são alterações na estrutura da molécula de MPLA, como número e comprimento das cadeias lipídicas, variações no número de insaturações ou presença de grupos fosfatos, interagindo de diferentes formas com os receptores Toll like e modulando as diversas respostas (AYBAY; IMIR, 1998).

Outro fator que pode influenciar a interação com os receptores e a resposta imunológica são as formas de apresentação das moléculas adjuvantes, como a formação de micelas ou lipossomos. As formulações preparadas no laboratório foram homogeneizadas vigorosamente no momento da aplicação no hamster, entretanto alguns adjuvantes usados na produção de

vacina comercial passam por uma etapa conhecida como microfluidização. Este processo é feito principalmente em emulsões de água e óleo submetidas a alta pressão, formando arranjos moleculares com tamanhos mais homogêneos. Essas partículas podem interagir de maneiras diferentes com os receptores e induzir diferentes respostas imunológicas (O'HAGAN et al., 2013).

Os animais que foram imunizados com a vacina comercial não apresentaram sintomas da doença, mesmo no desafio com maior número de bactérias virulentas. Além disso, os resultados dos cultivos dos macerados dos rins dos animais sobreviventes em meio Fletcher semi-sólido indicaram que a vacina comercial foi capaz de induzir proteção esterilizante, impedindo a colonização dos rins pela bactéria. O mesmo resultado foi obtido por Rinehart que imunizou novilhos com a vacina comercial pentavalente. Após o desafio, os animais sobreviveram e a análise histológica dos rins indicou que não houve colonização pela leptospira (RINEHART et. al., 2012).

A vacina comercial é baseada em bacterina e a proteína LigA é apresentada na porção externa das leptospiros, mas interessantemente, os animais que receberam a vacina comercial não apresentaram anticorpos anti-LigA, como verificado por western blot e por k-ELISA. Nesse grupo experimental, os anticorpos anti-LigA foram induzidos apenas após o desafio com leptospira, mostrando que a proteção conferida pela vacina não foi mediada por LigA. Outra observação importante foi que neste grupo a indução de anticorpos anti-LigA foi muito menor que nos grupos onde a infecção se estabeleceu, mostrando que anti-LigA pode ser um marcador de infecção. Diferentemente, o antígeno OmpA é apresentado na vacina comercial, embora seja uma proteína pouco imunogênica.

O grupo de animais imunizados com o antígeno LigA apresentada pela salmonela viva atenuada e expressando a proteína in vivo sob controle do promotor nir indicou proteção contra a infecção por leptospira, com sobrevivência de 83%.

De forma semelhante, Lourdault e colaboradores realizaram imunização por via oral com vacina viva de *E. coli* expressando a proteína LigA. Nesse estudo, também foi observada alta proteção dos animais, mas estes pesquisadores também observaram colonização e alteração histológica dos rins (LOURDAULT et al., 2014).

A apresentação de antígenos por microrganismos vivos é investigada considerando à capacidade imunomoduladora devido à atuação como adjuvantes. Neste contexto, estamos avaliando as modificações no LPS recuperado de salmonelas SL3261 expressando a proteína LpxE para confirmar a obtenção do clone com mais baixa endotoxicidade.

Nossos ensaios confirmam que as moléculas de MPLA e LPS têm atividade sobre o sistema imune e que podem atuar como adjuvantes, porém isto requer mais estudos, em especial da maneira de formular os imunógenos, para maior compreensão e controle de parâmetros que podem interferir negativamente na resposta imune.

REFERÊNCIAS*

ABEYRATHNE, P. D.; LAM, J. S. Conditions that allow for effective transfer of membrane proteins onto nitrocellulose membrane in Western blots. **Can. J. Microbiol.**, v. 53, n. 4, p. 526-532, Apr 2007.

ADLER, B.; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, A. Leptospira and leptospirosis. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, Jan 2010.

ATHANAZIO, D. A. et al. Rattus norvegicus as a model for persistent renal colonization by pathogenic Leptospira interrogans. **Acta Trop.**, v. 105, n. 2, p. 176-180, Feb 2008.

AYBAY, C.; IMIR, T. Comparison of the effects of Salmonella minnesota Re595 lipopolysaccharide, lipid A and monophosphoryl lipid A on nitric oxide, TNF-alpha, and IL-6 induction from RAW 264.7 macrophages. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 22, n. 3, p. 263-273, Nov 1998.

BALDRIDGE, J. R. et al. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. **Vaccine**, v. 18, n. 22, p. 2416-2425, May 2000.

BAROCCHI, M. A. et al. Rapid translocation of polarized MDCK cell monolayers by Leptospira interrogans, an invasive but nonintracellular pathogen. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6926-6932, Dec 2002.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.**, v. 40, n. 12, p. 845-859, Feb 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, v. 37, n. 8, p. 911-917, Aug 1959.

BROWN, P. D. et al. Evaluation of the polymerase chain reaction for early diagnosis of leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 43, n. 2, p. 110-114, Aug 1995.

BULACH, D. M. et al. Lipopolysaccharide biosynthesis in *Leptospira*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 2, n. 4, p. 375-380, Oct 2000.

CHAGAS-JUNIOR, A. D. et al. An imprint method for detecting leptospire in the hamster model of vaccine-mediated immunity for leptospirosis. **J. Med. Microbiol.**, v. 58, n. Pt 12, p. 1632-1637, Dec 2009. ISSN 1473-5644.

CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. **Microdetermination of phosphorus** 1956.

CHEVILLE, N. F.; HUHN, R.; CUTLIP, R. C. Ultrastructure of renal lesions in pigs with acute leptospirosis caused by *Leptospira pomona*. **Vet. Pathol.**, v. 17, n. 3, p. 338-351, May 1980.

CHOY, H. A. et al. Physiological osmotic induction of *Leptospira interrogans* adhesion: LigA and LigB bind extracellular matrix proteins and fibrinogen. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 5, p. 2441-2450, May 2007.

COATS, S. R. et al. The lipid A phosphate position determines differential host Toll-like receptor 4 responses to phylogenetically related symbiotic and pathogenic bacteria. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 1, p. 203-210, Jan 2011.

DE GREGORIO, E.; TRITTO, E.; RAPPUOLI, R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. **Eur. J. Immunol.**, v. 38, n. 8, p. 2068-2071, Aug 2008.

DIDIERLAURENT, A. M. et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. **J. Immunol.**, v. 183, n. 10, p. 6186-6197, Nov 2009.

EL HAMIDI, A. et al. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. **J. Lipid. Res.**, v. 46, n. 8, p. 1773-8, Aug 2005.

FAINE, S. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd. Melbourne, Vic. Australia: MediSci, 1999.

FAINE, S. et al. **Leptospira and Leptospirosis**. 1999. 272.

FINDLAY, H. E.; MCCLAFFERTY, H.; ASHLEY, R. H. Surface expression, single-channel analysis and membrane topology of recombinant Chlamydia trachomatis Major Outer Membrane Protein. **BMC Microbiol.**, v. 5, p. 5, 2005.

FITZGERALD, K. A.; ROWE, D. C.; GOLENBOCK, D. T. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. **Microbes. Infect.**, v. 6, n. 15, p. 1361-1367, Dec 2004.

GALANOS, C. et al. Immunogenic properties of lipid A. **Rev. Infect. Dis.**, v. 6, n. 4, p. 546-552, 1984 Jul-Aug 1984.

GALANOS, C. et al. Endotoxic properties of chemically synthesized lipid A part structures. Comparison of synthetic lipid A precursor and synthetic analogues with biosynthetic lipid A precursor and free lipid A. **Eur. J. Biochem.**, v. 140, n. 2, p. 221-227, Apr 1984.

GALANOS, C.; LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides. **Eur. J. Biochem.**, v. 9, n. 2, p. 245-249, Jun 1969.

GAMBERINI, M. et al. Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 244, n. 2, p. 305-13, Mar 2005.

GANOZA, C. A. et al. Determining risk for severe leptospirosis by molecular analysis of environmental surface waters for pathogenic *Leptospira*. **PLoS Med.**, v. 3, n. 8, p. e308, Aug 2006.

GORIS, M. G. et al. Potent innate immune response to pathogenic *leptospira* in human whole blood. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18279, 2011.

HARTSKEERL, R. A.; COLLARES-PEREIRA, M.; ELLIS, W. A. Emergence, control and re-emerging leptospirosis: dynamics of infection in the changing world. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 4, p. 494-501, Apr 2011.

HEINRICHS, D. E.; YETHON, J. A.; WHITFIELD, C. Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. **Mol. Microbiol.**, v. 30, n. 2, p. 221-32, Oct 1998.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 31-32, p. 5787-99, Jul 2006.

INOUYE, S.; INOUYE, M. Up-promoter mutations in the *lpp* gene of *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 13, n. 9, p. 3101-3110, May 1985.

JACKSON, R. J. et al. Oral vaccine models: multiple delivery systems employing tetanus toxoid. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 730, p. 217-234, Aug 1994.

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

KARIBIAN, D.; DEPRUN, C.; CAROFF, M. Comparison of lipids A of several Salmonella and Escherichia strains by 252Cf plasma desorption mass spectrometry. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 10, p. 2988-2993, May 1993.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-650, May 2011.

KO, A. I. et al. Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, v. 354, n. 9181, p. 820-825, Sep 1999.

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

KONG, Q. et al. Salmonella synthesizing 1-dephosphorylated [corrected] lipopolysaccharide exhibits low endotoxic activity while retaining its immunogenicity. **J. Immunol.**, v. 187, n. 1, p. 412-423, Jul 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 1970.

LEE, C. H.; TSAI, C. M. Quantification of bacterial lipopolysaccharides by the purpald assay: measuring formaldehyde generated from 2-keto-3-deoxyoctonate and heptose at the inner core by periodate oxidation. **Anal. Biochem.**, v. 267, n. 1, p. 161-168, Feb 1999.

LOURDAULT, K. et al. Oral immunization with Escherichia coli expressing a lipidated form of LigA protects hamsters against challenge with Leptospira interrogans serovar Copenhageni. **Infect. Immun.**, v. 82, n. 2, p. 893-902, Feb 2014.

MANIATIS, T. **Molecular cloning - A laboratory manual**. Fritsch, E. F.: 438 p. 1982.

MATA-HARO, V. et al. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. **Science**, v. 316, n. 5831, p. 1628-1632, Jun 2007.

MATSUNAGA, J. et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Mol. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 929-945, Aug 2003.

MATSUO, K.; ISOGAI, E.; ARAKI, Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. **Microbiol. Immunol.**, v. 44, n. 11, p. 887-890, 2000.

MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 3, p. 411-416, Jun 2010.

MCALÉER, J. P.; VELLA, A. T. Educating CD4 T cells with vaccine adjuvants: lessons from lipopolysaccharide. **Trends Immunol.**, v. 31, n. 11, p. 429-435, Nov 2010.

MUROI, M.; OHNISHI, T.; Tanamoto, K. MD-2, a novel accessory molecule, is involved in species-specific actions of *Salmonella* lipid A. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 7, p. 3546-3550, Jul 2002.

NAHORI, M. A. et al. Differential TLR recognition of leptospiral lipid A and lipopolysaccharide in murine and human cells. **J. Immunol.**, v. 175, n. 9, p. 6022-6031, Nov 2005.

NALLY, J. E. et al. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 766-773, Feb 2007.

NASCIMENTO, A. L. et al. Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 4, p. 459-477, Apr 2004.

O'CALLAGHAN, D.; CHARBIT, A. High efficiency transformation of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* by electroporation. **Mol. Gen. Genet.**, v. 223, n. 1, p. 156-158, Aug 1990.

O'HAGAN, D. T.; DE GREGORIO, E. The path to a successful vaccine adjuvant--'the long and winding road'. **Drug Discov. Today**, v. 14, n. 11-12, p. 541-551, Jun 2009.

O'HAGAN, D. T. ET AL. The history of MF59(®) adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. **Expert Rev. Vaccines**, v. 12, n. 1, p. 13-30, Jan 2013.

PARK, B. S. et al. The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191-1195, Apr 2009.

QUE-GEWIRTH, N. L. et al. A methylated phosphate group and four amide-linked acyl chains in *leptospira interrogans* lipid A. The membrane anchor of an unusual lipopolysaccharide that activates TLR2. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 24, p. 25420-25429, Jun 2004.

QUINTILIO, W. et al. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, n. 31, p. 4219-4224, Jun 2009.

RAETZ, C. R. et al. Discovery of new biosynthetic pathways: the lipid A story. **J. Lipid. Res.**, v. 50 Suppl, p. S103-108, Apr 2009.

RAETZ, C. R. et al. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 295-329, 2007.

RIAZI, M. et al. A low molecular weight lipopolysaccharide antigen preparation reactive to acute leptospirosis heterologous sera. **Trop. Biomed.**, v. 27, n. 2, p. 241-253, Aug 2010.

RINEHART, C. L. et al. Efficacy of vaccination of cattle with the *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjoprajitno component of a pentavalent *Leptospira bacterin* against experimental challenge with *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo type hardjo-bovis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 73, n. 5, p. 735-740, May 2012.

ROBINS, L. I.; WILLIAMS, A. H.; RAETZ, C. R. Structural basis for the sugar nucleotide and acyl-chain selectivity of *Leptospira interrogans* LpxA. **Biochemistry**, v. 48, n. 26, p. 6191-6201, Jul 2009.

RODRIGUEZ-GONZALEZ, I. et al. [Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents]. **Med. Mal. Infect.**, v. 34, n. 5, p. 196-200, May 2004.

ROMERO, C. D. et al. The Toll-like receptor 4 agonist monophosphoryl lipid a augments innate host resistance to systemic bacterial infection. **Infect. Immun.**, v. 79, n. 9, p. 3576-3587, Sep 2011.

ROUSER, G.; FKEISCHER, S.; YAMAMOTO, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. **Lipids**, v. 5, n. 5, p. 494-496, May 1970.

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

SLACK, A. Leptospirosis. **Aust. Fam. Physician**, v. 39, n. 7, p. 495-498, Jul 2010.

SOLLY, F. et al. **Leptospira and leptospirosis**. 2nd. Melbourne, Vic. Australia: MediSci, 1999.

STALHEIM, O. H. Biological effects of leptospiral lipids. **J. Bacteriol.**, v. 95, n. 2, p. 465-468, Feb 1968.

TAGLIABUE, A.; RAPPUOLI, R. Vaccine adjuvants: the dream becomes real. **Hum. Vaccin.**, v. 4, n. 5, p. 347-349, 2008 Sep-Oct 2008.

TENG, C. H. et al. Effects of ompA deletion on expression of type 1 fimbriae in Escherichia coli K1 strain RS218 and on the association of E. coli with human brain microvascular endothelial cells. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 10, p. 5609-5616, Oct 2006.

TORRES, A. G. et al. Outer membrane protein A of Escherichia coli O157:H7 stimulates dendritic cell activation. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 5, p. 2676-2685, May 2006.

TREVEJO, R. T. et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. **J. Infect. Dis.**, v. 178, n. 5, p. 1457-1463, Nov 1998.

TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v. 119, n. 1, p. 115-119, Jan 1982.

TSANG, V. C.; WILSON, B. C.; PERALTA, J. M. Quantitative, single-tube, kinetic-dependent enzyme-linked immunosorbent assay (k-ELISA). **Methods Enzymol.**, v. 92, p. 391-403, 1983.

VIHN, T.; ADLER, B. Ultrastructure and chemical composition of lipopolysaccharide extracted from *Leptospira interrogans* serovar copenhageni.. **J. Gen. Microbiol.**, p.103-109, 1985.

VINH, T. U. et al. Characterization and taxonomic significance of lipopolysaccharides of *Leptospira interrogans* serovar hardjo. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, n. 10, p. 2663-2673, Oct 1989.

WANG, Z.; JIN, L.; WEGRZYN, A. Leptospirosis vaccines. **Microb. Cell Fact.**, v. 6, p. 39, 2007.

WERTS, C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. **Chang Gung Med. J.**, v. 33, n. 6, p. 591-601, 2010 Nov-Dec 2010.

WERTS, C. et al. Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. **Nat. Immunol.**, v. 2, n. 4, p. 346-352, Apr 2001.

WILKINSON, S. G. Bacterial lipopolysaccharides--themes and variations. **Prog. Lipid Res.**, v. 35, n. 3, p. 283-343, Sep 1996.

WU, C. J.; CHEN, L. C.; KUO, M. L. Attenuated *Salmonella typhimurium* reduces ovalbumin-induced airway inflammation and T-helper type 2 responses in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, n. 1, p. 116-122, Jul 2006.

WU, L. H.; TSAI, C. M.; FRASCH, C. E. A method for purification of bacterial R-type lipopolysaccharides (lipooligosaccharides). **Anal. Biochem.**, v. 160, n. 2, p. 281-289, Feb 1987.

YI, E. C.; HACKETT, M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from gram-negative bacteria. **Analyst**, v. 125, n. 4, p. 651-656, Apr 2000.

ZUERNER, R. L.; ALT, D.; BOLIN, C. A. IS1533-based PCR assay for identification of *Leptospira interrogans sensu lato* serovars. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 12, p. 3284-3289, Dec 1995.