FERNANDA LUCIO DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E POTENCIAL ATIVIDADE ADJUVANTE DO LIPÍDIO A DE *Bordetella pertussis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/ IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Flávia Saldanha Kubrusly

São Paulo
2011

RESUMO

SANTOS, F. L. **Avaliação da qualidade e potencial atividade adjuvante do Lipídio A de *Bordetella pertussis*.** 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Atualmente várias substâncias estão sendo avaliadas quanto à sua possível atividade adjuvante, apresentando alta potência, mas também alta toxicidade, que os impede de serem introduzidos numa rotina clínica, como o lipopolissacarídio (LPS), componente da parede celular das bactérias Gram negativas. A função do LPS de *B. pertussis* como um adjuvante torna-se evidente pelo aumento da produção de anticorpos quando este LPS é co-administrado durante a vacinação. Estudos têm estimulado o desenvolvimento de derivados de LPS com propriedades potencialmente úteis, um dos exemplos mais conhecidos é o monofosforil lipídio A (MPL), que foi desenvolvido como adjuvante para a aplicação em vacinas de uso humano. O objetivo deste estudo foi caracterizar um sub-produto do LPS de *Bordetella pertussis* (BpLipídioA), através do desenvolvimento e padronização de testes de controle de qualidade, visando a posterior utilização deste sub-produto como adjuvante vacinal. Este produto é obtido por extração orgânica de um concentrado de células de *Bordetella pertussis,* com posterior hidrólise ácida em alta temperatura, sendo submetido à testes de controle de qualidade que caracterizam suas propriedades fisico-químicas, biológicas e estruturais. O conhecimento adquirido sobre o produto durante as fases de pesquisa e desenvolvimento conduziu à seleção de testes físico-químicos, biológicos e microbiológicos, bem como sua faixa de aceitação e limites de detecção. A atividade adjuvante deste produto foi realizada com a Vacina de Hepatite B Recombinante e apresentou resultados promissores. O BpLipídioA foi formulado em emulsão óleo em água, onde foi verificada a estabilidade deste composto. A utilização deste produto em emulsão ou suspensão apresentou-se possível e permite a redução da quantidade de antígeno na dose vacinal, o que aumenta a capacidade de produção das vacinas.

Palavras-chave: Adjuvante. Lipídio A. *Bordetella pertussis*. LPS. Vacina Recombinante contra Hepatite B.

ABSTRACT

SANTOS, F. L. **Quality assessment and potential adjuvant activity of *Bordetella pertussis* Lipid A.** 2011. 99 p. Masters Thesis (Biotecnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Currently a number of substances are being evaluated for possible adjuvant activity, with high power but also high toxicity, which prevents them from being introduced into clinical routine, such as lipopolysaccharide (LPS), cell wall component of Gram negative bacteria. The role of *B. pertussis* LPS as an adjuvant is evident by the increased production of antibodies when the LPS is co-administered during vaccination. Studies have stimulated the development of derivatives of LPS with potentially useful, one of the best known examples is the monophosphoryl lipid A (MPL), which was developed as an adjuvant for use in human vaccines. The aim of this study was to characterize a byproduct of *Bordetella pertussis* LPS (BpLipídioA), through the development and standardization of quality control tests in order to later use this sub-product as an adjuvant vaccine. This product is obtained by LPS organic extraction of *B. pertussis* cells with subsequent acid hydrolysis at high temperature and subjected to quality control tests that characterize their physico-chemical, biological and structural features. The knowledge about the product during all phases of research and development led to the selection of optimal physico-chemical, biological and microbiological tests as well as its acceptable range and detection limits. The adjuvant activity of this product was performed with the recombinant hepatitis B vaccine, which showed promissory results. The BpLipídioA was formulated in oil-water emulsion and its stability checked. Using this product in emulsion or suspension forms had to be possible to reduce the amount of antigen in the vaccine dose, which increases the installed production capacity of vaccines.

Key words: Adjuvant. Lipid A. *Bordetella pertussis*. LPS. Recombinant Hepatitis B Vaccine.

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

Embora a primeira investigação científica para prevenção da varíola tenha sido conduzida por Edward Jenner em 1796 e a ele seja creditado o início da vacinação moderna, muito dos primeiros esforços para vacinar indivíduos ocorreu antes do século XVI na China, ou em casos como o do fazendeiro Benjamin Justy que inoculou sua família com pus de varíola bovina para prevenir a varíola humana, e são relatados bem antes de Edward Jenner (HILLEMAN, 2000; ESSER et al., 2003).

Desde a invenção da vacina contra varíola, formulações vacinais representam a estratégia com melhor custo benefício para o controle profilático de doenças infecciosas (Figura 1). Muitas doenças responsáveis por milhões de óbitos no passado (sobretudo entre crianças e idosos) estão hoje erradicadas, como a varíola, ou em vias de desaparecer, como a poliomielite, o sarampo, a coqueluche, a difteria, entre outras, como consequência direta da descoberta, produção e aplicação generalizada de vacinas. No entanto, o problema das doenças infecciosas ainda persiste e representa uma ameaça real para toda a humanidade.

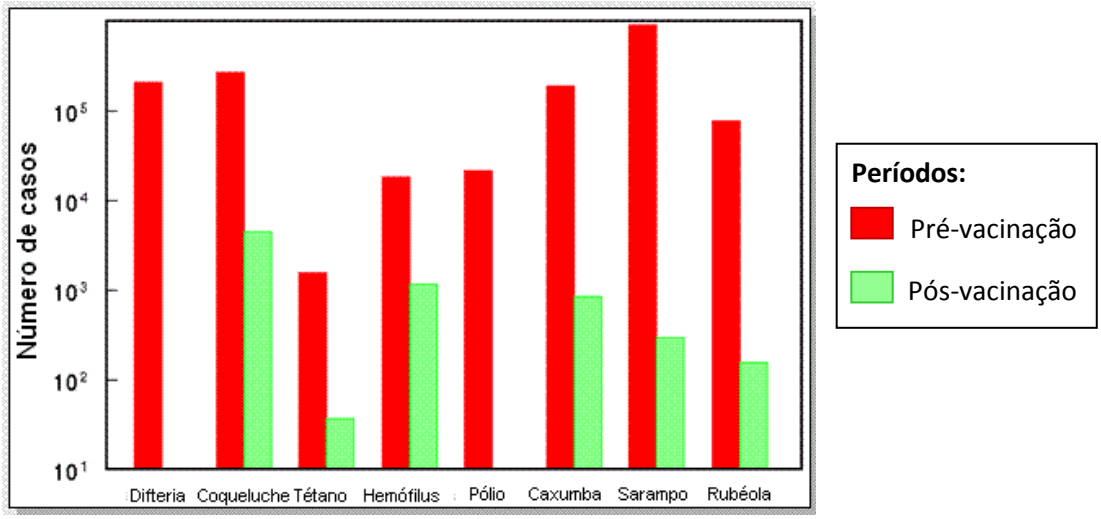

Figura 1: Número de casos de doenças infecciosas, período pré-vacinação e pós-vacinação, com a introdução das campanhas vacinais. O caso mais expressivo ocorreu na difteria, com uma redução de 99,99% do número de casos Fonte: Hopkins (2009).

Atualmente, entre os maiores desafios no campo da vacinologia incluem-se o desenvolvimento de vacinas com propriedades terapêuticas e a busca por novos adjuvantes, eficazes e seguros para emprego em animais e humanos (BIANCHI et al., 2007).

O sistema imune inato é capaz de reconhecer porções antigênicas presentes na superfície de patógenos, conhecidas como PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos). O objetivo da formulação vacinal é apresentar esses antígenos ao organismo, de maneira inofensiva e controlada, para geração de resposta imune adequada e duradoura (BIANCHI et al., 2007).

Vacinas baseadas em microganismos vivos são em geral imunogênicas, entretanto, o risco de reversão parcial ou total de virulência tem encorajado o emprego de proteínas purificadas como antígenos vacinais. Embora mais seguras, as vacinas de subunidades são pouco imunogênicas, gerando uma fraca resposta imune, associada principalmente à natureza das moléculas utilizadas, em geral, proteínas recombinantes. Nesse contexto surge a necessidade do uso de adjuvantes vacinais, que são substâncias capazes de aumentar ou modular a resposta imune a um determinado antígeno, que vêm sendo estudadas desde o início do século passado (DOUGAN; HORMAECHE, 2006).

O aumento do interesse em adjuvantes nas últimas duas décadas ocorreu em paralelo às novas tendências no desenvolvimento de vacinas, incluindo as vacinas compostas de subunidades e antígenos sintéticos, vacinas para indicações terapêuticas, e vacinas destinadas a estimular a imunidade da mucosa. É claro que o sucesso destas novas oportunidades contará com a utilização de adjuvantes que medeiam e promovem a indução de uma vasta gama de diferentes respostas imunes. Por exemplo, formulações com subunidades vacinais e vacinas sintéticas com um mínimo de epítopos antigênicos, são frequentemente pouco imunogênicas e promovem uma resposta imune insuficiente ou inadequada, sendo assim, os adjuvantes são necessários para melhorar e direcionar a resposta do sistema imunitário para o tipo de proteção encontrada na sequência de uma infecção natural (BALDRIDGE; CRANE, 1999).

Os adjuvantes aprovados atualmente para uso em humanos, a saber: os sais de alumínio, emulsões óleo em água e um antagonista de TLR “Toll-like receptor” (receptor do tipo Toll), não contemplam as necessidades de muitas formulações vacinais em desenvolvimento. A resposta a patógenos intracelulares, por exemplo,

requer a indução de resposta imune celular, com presença de linfócitos T citotóxicos, praticamente ausentes quando sais de alumínio, conhecidos por induzirem fortes respostas de anticorpos, são empregados como adjuvantes, sendo que a natureza do antígeno utilizado e a via de administração na resposta imune adequada também são fatores a serem considerados (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008).

1.2 Adjuvantes

A molécula ou substância que amplifica ou intensifica a série de eventos imunológicos que compõem a resposta imune pode ser classificada como adjuvante. Desde 1925, diversos adjuvantes vêm sendo usados com o objetivo de aumentar a resposta imune contra antígenos específicos. Ramon em 1925 demonstrou a possibilidade de aumentar artificialmente a potência das antitoxinas tetânica e diftérica pela formulação das vacinas com substâncias como o ágar, sais metálicos, óleo, lecitina ou saponina. Durante os últimos oitenta anos, algumas formulações de adjuvantes têm sido desenvolvidas, sendo que poucas foram testadas em triagens clínicas e a maioria delas nunca foi aceita para a vacinação, devido à toxicidade e aos efeitos adversos (GUPTA; SIBER, 1995).

Várias substâncias estão sendo avaliadas quanto à sua possível atividade adjuvante, e muitos candidatos têm avançado nos ensaios clínicos, alguns demonstrando alta potência, associada com alta toxicidade, impedindo sua introdução na rotina clínica (O'HAGAN; MACKICHAN, 2001; PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

São exemplos clássicos de adjuvantes: emulsões, saponinas, sais de alumínio ou cálcio, polímeros surfactantes não iônicos, derivados de lipopolissacarídeos (LPS), micobactérias entre outros (OGRA; FADEN; WELLIVER, 2001).

Os únicos adjuvantes aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) são os sais de alumínio (hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio), que têm ampla aplicação, tanto para uso humano quanto veterinário (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005), e o MF59 aprovado pelo Comitê Europeu de Regulamentação Farmacêutica, mesmo assim, em alguns testes estes adjuvantes demonstraram induzir a produção de anticorpos IgE, que estão associados às reações de hipersensibilidade (O'HAGAN; MACKICHAN, 2001).

1.2.1 Classificação dos adjuvantes

A heterogeneidade dos efeitos biológicos das muitas substâncias com propriedades adjuvantes torna muito complexa a seleção do adjuvante apropriado para uma finalidade específica e isto também se correlaciona com a grande

diversidade da conformação molecular destas substâncias que determina qual das cinco vias de ativação: 1) imunomodulação, capacidade dos adjuvantes modificarem a rede de citocinas, resultando na regulação do sistema imune como um todo, 2) apresentação ou capacidade do adjuvante de preservar a integridade do antígeno e apresentá-lo às células imunes efetoras apropriadas, 3) indução de linfócitos T citotóxicos $CD8^{+,}$ para facilitar a incorporação ou persistência de peptídeos apropriados dentro do MHC-1, 4) liberação ou entrega do antígeno que define a capacidade de um adjuvante de liberar o imunógeno para as células efetoras, geralmente as células apresentadoras de antígeno (APCs), 5) efeito depósito, que proporciona uma liberação prolongada do antígeno, podendo ser um depósito por curto tempo ou por longo prazo (COX; COULTER, 1997).

Os adjuvantes melhoram a resposta imune aos antígenos por diferentes maneiras: incremento da imunogenicidade de fracos imunógenos, aumento da velocidade e duração da resposta imune, modulação da especificidade, isotipo e distribuição das subclasses de anticorpos, estimulando resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL), promovendo a indução da imunidade de mucosa, aumentando a resposta imune de indivíduos imunologicamente imaturos ou senescentes, reduzindo o custo das vacinas pela diminuição das doses dos antígenos e ajudando a controlar a competição de antígenos em vacinas combinadas. Entretanto mesmo tendo estes conhecimentos, o mecanismo de ação de muitos adjuvantes permanece desconhecido, uma vez que a imunização desencadeia sucessão de respostas complexas, dificultando o entendimento do efeito primário dos adjuvantes (MOTA, 2006).

A seleção de um adjuvante deve ser baseada na via de administração e na resposta imune desejada (CLEMENTS; GRIFFITHS, 2002). A seleção do adjuvante não visa somente o aumento da resposta, mas sua modulação para o sistema Th1 ou Th2, ou seja, sua capacidade de induzir de maneira mais seletiva uma das subpopulações de células-T auxiliares (LIMA, 2008).

1.2.2 Avanços, problemas e perspectivas

A obtenção de novos adjuvantes é estimulada por um grande número de fatores, incluindo a fraca imunogenicidade dos antígenos puros e das vacinas de DNA, resposta imune geralmente baixa em certa faixa etária, como a fraca resposta

de idosos para antígenos de *H. influenza* e um melhor conhecimento dos mecanismos da resposta imune e das novas rotas de liberação que têm sido exploradas, tais como a intradérmica, mucosa e intranasal (SESARDIC; DOBBELAER, 2004). Alguns parâmetros devem ser avaliados para a escolha de novos adjuvantes e combinação adjuvantes/vacinas, tais como a qualidade, o mecanismo de ação e a compatibilidade do adjuvante com o antígeno, incluindo composição quantitativa e qualitativa, características físicas e bioquímicas, pureza química e microbiológica.

No caso dos adjuvantes, há uma necessidade de demonstrar a compatibilidade com os antígenos (adsorção estável e eficaz) e toxicidade aceitável. Além desses aspectos, faz-se necessário um estudo comparativo com modelo animal apropriado, na presença e na ausência do adjuvante, avaliando o perfil de segurança da combinação antígeno-adjuvante e da via de administração escolhida (COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS, 1997).

Alguns problemas podem ser citados durante o processo de obtenção de adjuvantes para vacinas, como capacidade limitada da função, modelos animais apropriados e problemas com os testes experimentais. Um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento de novos adjuvantes é a toxicidade, que tem restringido a liberação e o uso de novos adjuvantes. Atualmente o balanço entre segurança e efeitos adversos é avaliado diferentemente para uma vacina profilática e para uma vacina terapêutica. No primeiro caso, apenas os adjuvantes que induzem efeitos adversos mínimos são aceitos, já para o uso terapêutico, são aceitos níveis de efeitos adversos mais elevados.

Diversas formulações vêm sendo testadas e apresentaram forte potencial adjuvante, tais como as emulsões, lipossomos, microesferas, saponinas, complexos imunoestimulantes, dentre outros. O primeiro registro da utilização de emulsões de óleo em procedimentos de imunização foi feito por Le Moignic e Pinoy (1916) que mostraram um aumento da resposta imune contra o antígeno, vacinando camundongos com *Salmonella typhimurium* inativada e emulsificada com óleo mineral. No entanto, foi com a introdução do adjuvante completo de Freund (CFA) (FREUND, 1956) que o uso das emulsões em procedimentos de imunização tornou-se freqüente. O CFA é um dos mais potentes adjuvantes descritos sendo amplamente empregado para diversos antígenos e em procedimentos experimentais

com animais de laboratório, porém, em sua formulação original, mostrou-se inaceitável para uso em humanos.

As vacinas veterinárias com adjuvantes à base de óleo são utilizadas com sucesso em programas de controle de doenças na América do Sul (PATIL et al., 2002) e outras partes do mundo. As emulsões lipídicas são adjuvantes efetivos capazes de induzir uma resposta imune elevada e duradoura (HILLEMAN, 1966; EDELMAN; TACKET, 1980; GUPTA; SIBER, 1995). Um dos maiores problemas encontrados para vacinas com adjuvantes oleosos é que o uso freqüente pode resultar em reações adversas indesejáveis, tais como formação de granulomas e cistos, que são atribuídas a diversos fatores incluindo impurezas do óleo (BARTELING; VREESWIJK, 1991; GUPTA et al., 1993) e no caso do CFA e IFA, muitos dos efeitos adversos são creditados ao óleo mineral, pelo fato de não ser biodegradável, formando lesões ulcerativas no local da injeção. Devido a esses efeitos colaterais, outros óleos e derivados vem sendo testados, como o esqualeno, esqualano e óleos vegetais, (MOTA, 2006).

Os adjuvantes de alumínio, que são os únicos aprovados para uso em humanos, foram introduzidos há mais de 70 anos por Glenny et al. (1926). Eles induzem uma forte resposta Th2, uma boa liberação do antígeno e apresentam um moderado efeito-depósito. A atividade biológica destes sais baseia-se em pelo menos três aspectos: formação de depósito de antígenos nos tecidos para produzir uma exposição prolongada; produção de antígenos particulados para facilitar a apresentação para APC; ativação do complemento e estimulação dos macrófagos para induzir retenção e ativação de linfócitos.

Adjuvantes licenciados (Tabela 1) foram desenvolvidos utilizando métodos empíricos, assim, eles não são ideais para muitos dos desafios da vacinação atual (PASHINE; VALIANTE; ULMER, 2005).

Tabela 1 - Tipos de adjuvantes.

Adjuvante[a]	Exemplo	Descrição
Sais minerais	Alumínio e sais de cálcio	Licenciado para uso em humanos. Muitos antígenos virais e bacterianos têm sido adsorvidos em alumínio e sais de cálcio.
Emulsões e formulações surfactantes	MF59, AS02, montanide ISA-51 e ISA-720, QS21	Emulsões estáveis de detergente microfluidizados
Veículos carreadores de partículas	Micropartículas, complexos imunoestimulatórios, lipossomos, virossomos, partículas virais	Partículas revestidas na superfície por antígenos e/ou adjuvantes
Derivados microbianos	Monofosforil Lipídio A, oligonucleotídeos, toxina colérica, toxinas de *E.coli*; lipoproteínas – LPS.	Produtos bacterianos ou similares sintéticos são potentes estimuladores do sistema imune inato. Sinalização da maioria destes agentes por meio de TLRs.
Células e citocinas	Células dendríticas, IL-2 e GM-CSF	Células do sistema imune estimuladas por citocinas. Células dendríticas autólogas estimuladas por peptídeos derivados do tumos apresentam de forma eficiente epítopos antigênicos.

[a] As principais categorias de adjuvantes vacinais e veículos vacinais estão resumidos acima. A maioria destes está em estágios experimentais. Os únicos licenciados para uso humano são os sais de alumínio, a emulsão óleo em água MF59 e os virossomos.
FONTE: Pashine, Valiante e Ulmer (2005).

1.3 LPS

O LPS é uma molécula anfifílica que está localizada na membrana externa de bactérias Gram-negativas, sendo liberado para o meio externo durante a fase logarítmica de crescimento *in vivo* e *in vitro*.

O LPS é composto de três distintos domínios estruturais: (1) o lipídio A, que é uma região basal glicolipídica que está ancorada à membrana externa, (2) uma região conhecida como core, (3) cadeia polissacarídica lateral, o antígeno O (Figura 2). A estrutura do lipídio A é razoavelmente conservada entre os diferentes grupos bacterianos, indicando sua importância para o correto funcionamento da membrana externa.

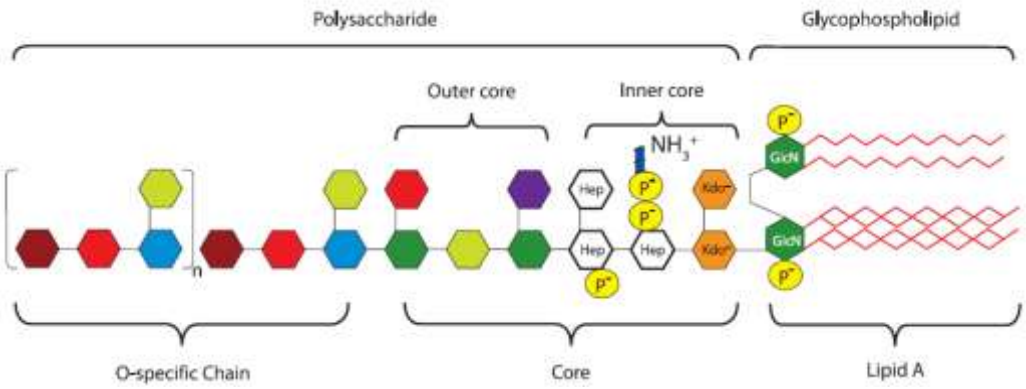

Figura 2: Representação esquemática da estrutura química do LPS bacteriano. GlcN - glucosamina; Kdo - ácido 2-keto-3-deoxioctonato; Hep - L-glicerol-D-manno-heptose; P - fosfato; EtN - etanolamina; ácidos graxos.
FONTE: Caroff et al. (2002).

Em contraste ao LPS de *B. bronchiseptica* e *B. parapertussis*, a molécula de LPS de *B. pertussis* não contém o domínio do antígeno-O. Portanto, o LPS de *B. pertussis* é muitas vezes referido como lipooligossacáride. A *B. pertussis* produz duas formas dominantes de LPS, uma delas contendo 1,5 mais fosfato do que a outra (LE DUR; CHABY; SZABO, 1980).

Por muito tempo, acreditava-se que as espécies do mesmo gênero partilhavam estruturas lipídicas quase idênticas. No entanto, quando as composições de vários LPS de espécies de *Bordetella* foram comparados, a estrutura do lipídio A varia significativamente (Figura 3), enquanto a composição e o arranjo do core permanece inalterado. Curiosamente, a heterogeneidade encontrada

no LPS que ocorre entre diferentes espécies de *Bordetella*, também pode ocorrer entre as diferentes cepas de uma mesma espécie (GEURTSEN, 2007).

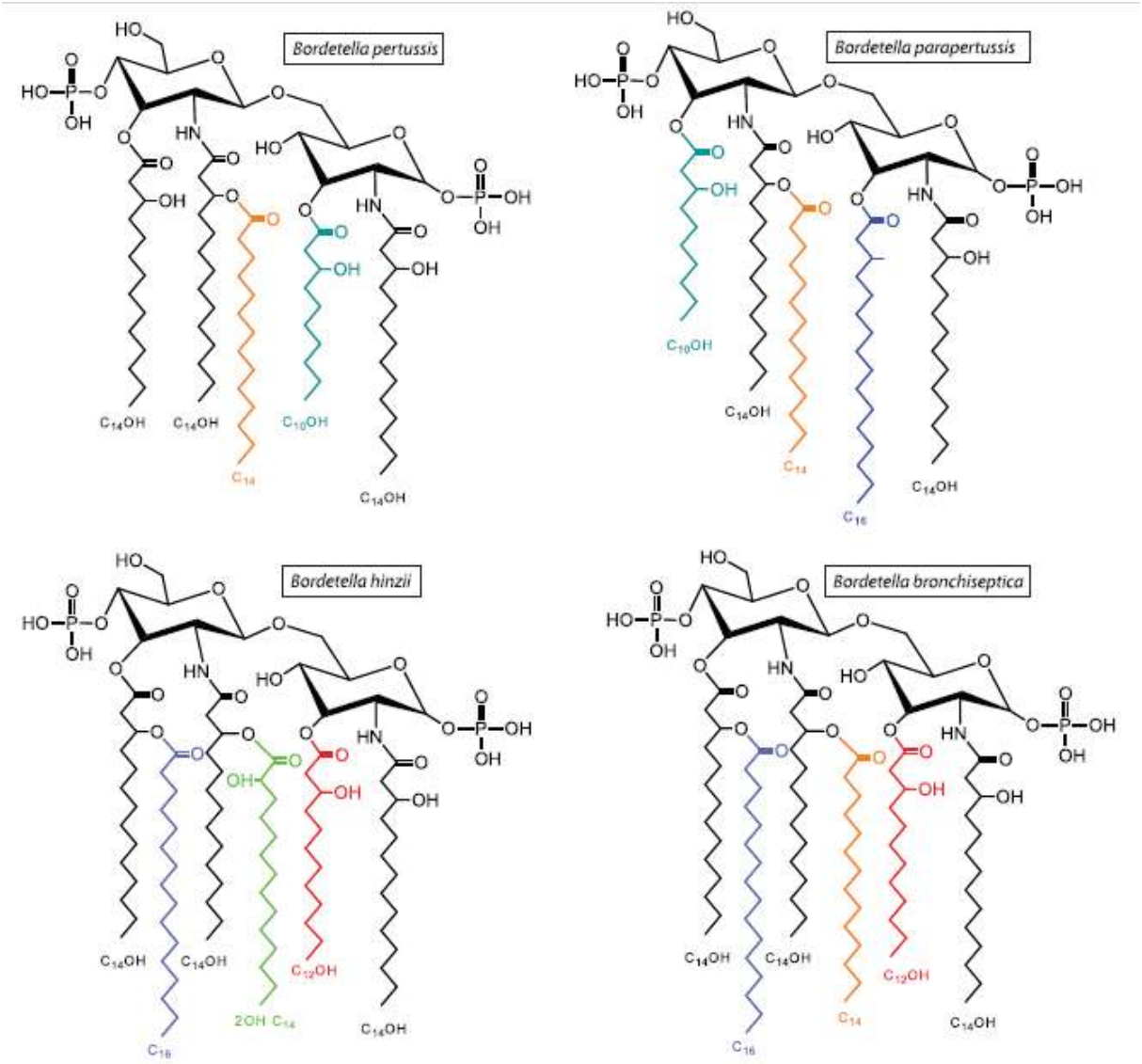

Figura 3: Estruturas do lipídio A de diferentes espécies de *Bordetella*, evidenciando as diferenças no número de cadeias de ácidos graxos.
FONTE: Caroff et al. (2002).

O LPS é uma potente molécula imunoestimulatória, apresentando tanto propriedade endotóxica como adjuvante, que juntamente com outras toxinas ativas, é o principal determinante para a reatogenicidade e efeito adjuvante da Vacina Pertussis. O LPS de *Bordetella* é pirogênico e tóxico e induz a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12 e IL-18 e a citocina anti-inflamatória IL-10 *in vivo*, durante uma infecção natural com *B.*

pertussis, e *in vitro*, por macrófagos após estimulação com LPS de *B. pertussis*. A função do LPS de *B. pertussis* como adjuvante é indicado pelo aumento da produção de anticorpos contra toxóides tetânicos e diftéricos, quando este LPS é co-administrado durante a vacinação (GEURTSEN, 2007).

A atividade endotóxica do LPS depende da composição do lipídio A (GALANOS et al., 1977; HOMMA et al., 1985). Estudos prévios indicaram que o grupo fosfato, bem como o número e o comprimento das cadeias acila são os determinantes críticos da atividade endotóxica (GEURTSEN et al., 2006). Esses estudos têm estimulado o desenvolvimento de derivados de LPS com propriedades potencialmente úteis. Alguns desses derivados apresentam reduzida atividade endotóxica, mantendo suas propriedades adjuvantes e imunostimulatórias (TAKAYAMA; RIBI; CANTRELL, 1981). Um dos exemplos mais conhecidos é o monofosforil lipídio A (MPL). O MPL foi desenvolvido como adjuvante para a aplicação em vacinas de uso humano, sendo que a diminuição da sua atividade endotóxica tem sido atribuída à reduzida capacidade de induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1β e TNF-α (OKEMOTO et al., 2006), e aumentar a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelos macrófagos (SALKOWSKI; DETORE; VOGEL, 1997).

1.4 Lipídio A

A lise de bactérias Gram-negativas faz com que estas liberem o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa de sua parede celular. A indução de anticorpos por LPS é bem conhecida, mas as reações adversas graves após a injeção em animais ou seres humanos fazem com que ele se torne impróprio para uso humano (RIETSCHEL et al., 1994).

O lipídio A é o componente mais endotóxico do LPS, e compreende uma série de espécies que têm a mesma estrutura global (dois resíduos acilados GIcNAc-P) mas que diferem no número de moléculas de ácidos graxos. A remoção por hidrólise das cadeias de polissacarídeos de LPS resulta no lipídio A, ou como o que ocorre naturalmente, a forma difosforil citotóxica ou a forma menos tóxica, o monofosforil (ERRIDGE; BENNETT-GUERRERO; POXTON, 2002).

A diversidade biológica do lipídio A destoxificado é exemplificada pela sua pluralidade funcional inclusive atuando cromo coadjuvante contra antígenos vacinais, seu peso aproximado (ou médio) molecular é 1,7-1,8 kDa, dependendo do número e identidade das cadeias de ácidos graxos presentes. A composição de ácidos graxos pode variar, dependendo do método de produção, que são vários, devido aos esforços para atenuar os atributos tóxicos do LPS, sem diminuir os benefícios imunoestimulatórios destes compostos.

Para avaliar as possíveis alterações na composição do LPS em mais detalhes, o lipídio A foi analisado por ESI-MS no modo negativo (Figura 4). Esta análise revelou a presença de quatro principais espécies de lipídio A no LPS de tipo selvagem. O pico de 1557 m/z representa uma espécie penta-acilada bis-fosfato que é tipicamente encontrada em *B. pertussis* (CAROFF et al., 1994), enquanto que o pico 1477 m/z corresponde a um penta-acilado mono-fosfato. Os dois picos restantes 1307 e 1251 m/z representam espécies deaciladas do lipídio A. Além destas quatro espécies de lipídios A importantes, várias espécies menores foram detectadas. Os picos 1331 e 1387 m/z correspondem às formas bis-fosforilada de íons moleculares 1251 e 1307 m/z, enquanto que o pico 1081 m/z corresponde a uma forma de mono-fosfato com perda de resíduo (GEURTSEN et al., 2006).

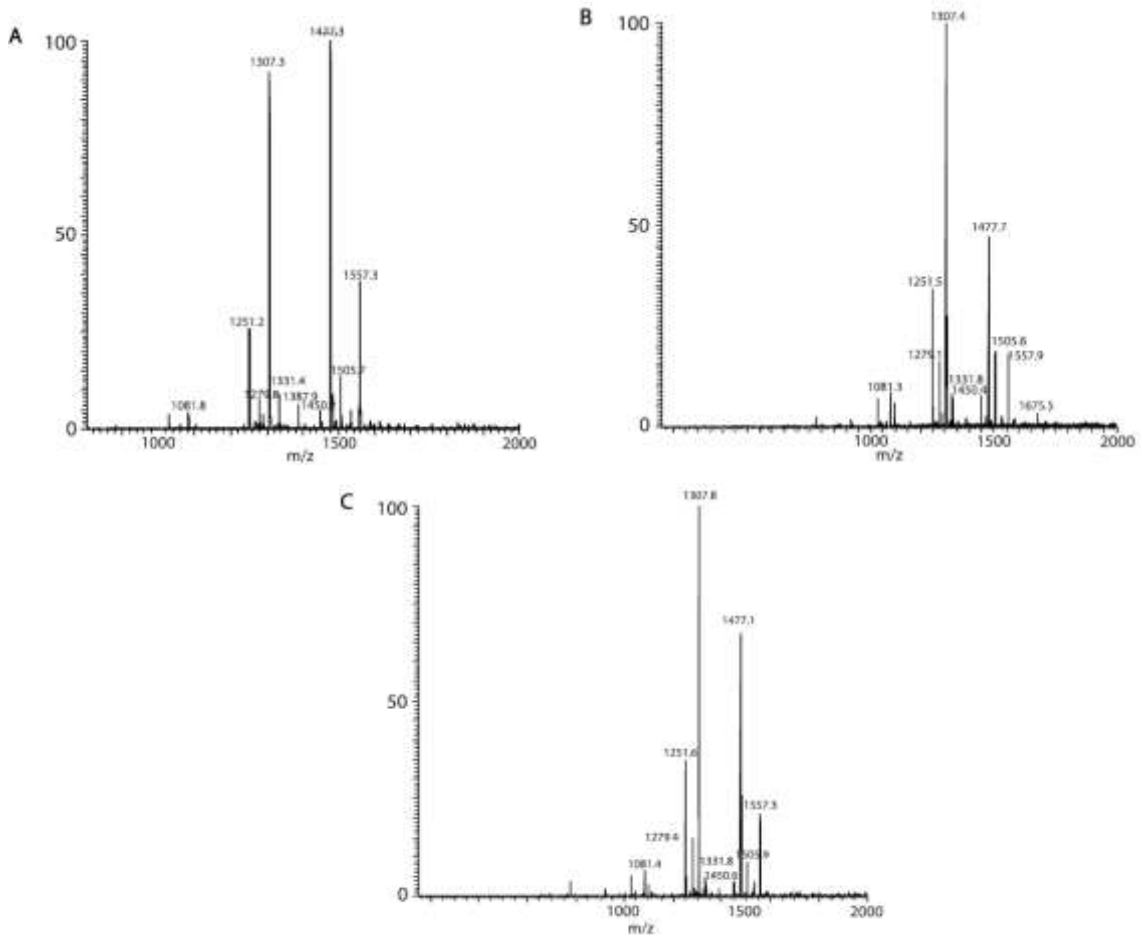

Figura 4: Análise estrutural do LPS purificado de *B. pertussis* por ESI-MS. (A) Picos principais: 1251, 1307.3, 1477.3, 1557.3 m/z. (B) 1251.5, 1307.4, 1477.7, 1505.6 m/z. (C) 1251.6, 1307.8, 1477.1, 1557.3 m/z. Sendo que estas variações representam o número de cadeias aciladas
FONTE: Geurtsen (2007).

O MPL é uma forma detoxificada de lipídio A, obtido à partir do LPS isolado da parede celular de bactérias Gram-negativas (BALDRICK et al., 2002).

A atividade adjuvante do MPL é atribuída principalmente a sua capacidade de interagir com TLR4 nas APCs induzindo a cascata de citocinas pro-inflamatórias (SINGH; O'HAGAN, 2002). Vários estudos têm demonstrado a capacidade do MPL de ativar monócitos e macrófagos, sendo que através da ativação destas células, antígenos vacinais são mais facilmente fagocitados, processados e apresentados. É provável que o MPL seja capaz de continuar a influenciar o desenvolvimento da imunidade celular a antígenos vacinais por meio da ação dessas citocinas. Esta capacidade do MPL de estimular uma cascata de citocinas necessárias para a indução da imunidade celular torna-o um adjuvante efetivo. Mas o MPL também pode ser utilizado para reforçar e complementar a atividade de veículos vacinais,

que funcionam como depósitos de antígeno adsorvidos em alumínio, lipossomos e emulsões contendo óleo (BALDRIDGE; CRANE, 1999).

O MPL mostrou boa “tolerabilidade” e atividade adjuvante em voluntários imunizados com formulações em combinação com hidróxido de alumínio ou em emulsões óleo em água (SINGH; O’HAGAN, 2002).

Devido à sua natureza anfifílica o MPL pode complementar e reforçar a atividade adjuvante das emulsões óleo em água, agindo como uma opsonina e ser entregue juntamente com o antígeno (BALDRIDGE; CRANE, 1999).

Estudos têm também demonstrado a eficácia do MPL quando formulado em emulsões óleo em água que são menos reatogênicas (MOMIN; GARCON, 2004), que as emulsões água em óleo do tipo Freund (MURRAY; COHEN; HARDEGREE, 1972). As partículas de óleo revestidas com o MPL são reconhecidas por macrófagos e células dendríticas, aumentando a apresentação de antígeno do complexo principal de histocompatibilidade classe I (MHC), resultando numa ativação dos linfócitos T citotóxicos (O’HAGAN; SINGH; GUPTA, 1998; KPVACSOVICS-BANKOWSKI et al., 1993).

Formulações com adjuvantes constituem vacinas potentes do ponto de vista imunológico, porém, com vários obstáculos a serem superados considerando, a segurança, a eficácia e a qualidade do processo produtivo.

É provável que derivados de LPS, sejam os primeiros adjuvantes vacinais a serem aprovados para uso generalizado desde o hidróxido de alumínio, porque gera clinicamente uma resposta imune, e tem aproximadamente 0,1% da toxicidade inflamatória da molécula de LPS (MATA-HARO et al., 2007). Em 2001 Baldrick, et. al, apresentou uma variedade de estudos pré-clínicos, que foram realizados com o MPL, para analisar o potencial toxicológico deste produto. A ausência de resultados tóxicos em modelos animais dá apoio à hipótese de que estes componentes sejam seguros para uso humano.

1.4.1 Lipídio A de Bordetella pertussis

O gênero *Bordetella* apresenta nove espécies. O lipídio A de pelo menos sete delas tem sua estrutura conhecida tendo sido ressaltada à notável variabilidade desta estrutura entre as espécies e mesmo entre as linhagens. Esta variabilidade estrutural tem sido atribuída à baixa especificidade enzimática. Isto torna a

Bordetella um gênero muito interessante para estes estudos de definição estrutural. Vários processos extrativos que diferem nas condições de hidrólise (brandas ou drásticas) utilizadas para a clivagem da ligação do lipídio A com o polissacarídeo, são descritos para o isolamento do lipídio A de *Bordetella pertussis*. Condições drásticas principalmente de pH e temperatura podem ocasionar perda do fosfato e/ou das cadeias aciladas do lipídio A resultando em modificações das atividades biológicas da molécula (CAROFF et al., 1986; CAROFF; TACKEN; SZABÓ, 1988; TIRSOAGA et al., 2007). Como sua atividade biológica depende desta estrutura peculiar, a injeção do lipídio A purificado pelos diferentes processos extrativos num modelo animal pode ou não desencadear a mesma resposta tóxica do LPS íntegro. A hidrólise do LPS de *Bordetella pertussis* com ácido acético (pH 3,4 por 1 hora a 100 ^{o}C) mesmo na ausência de detergentes, rende preparações de isolados de Lipídio A que perdem 80% de seu fosfato ácido-lábil (CAROFF; TACKEN; SZABÓ, 1988).

Vacinas DTP podem ser tóxicas, devido ao componente pertussis presente em sua formulação. O Instituto Butantan produz e administra sua vacina DTP com sucesso há quase 20 anos. O Japão desenvolveu uma Vacina Pertussis Acelular VPa (somente com componentes bacterianos) adotada por países desenvolvidos, mas incompatível para o orçamento dos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. O Instituto Butantan seguiu outra linha: remover o LPS bacteriano, responsável pela toxicidade, como inovação no processo produtivo da vacina tradicional (RAW, 2007, HIGASHI et al., 2009). Essa nova Vacina Pertussis Low (VP_L), que compõe a nova Vacina Tríplice Bacteriana (DTP_L), que tem a segurança da Vacina Acelular, foi testada num ensaio clínico induzindo resposta imune humoral e celular similar à vacina tradicional ou à Vacina Tríplice Acelular (DTPa) e sem aumento de custo.

Neste novo processo de produção, dois outros subprodutos foram obtidos, uma vacina pertussis acelular e o adjuvante BpMPLA, capaz de induzir a produção de interferon-β e aumentar a ativação das células T sem indução de resposta inflamatória. BpMPLA pode aumentar a capacidade de produção e diminuir o custo das vacinas contra influenza A, sazonal ou pandêmica (H5N1) (QUINTILIO et al., 2009, MIYAKI et al., 2010). O fato deste adjuvante ser praticamente composto por espécies tetraciladas (m/z de 1291) suscitou questionamentos sobre seu real potencial adjuvante incitando o grupo a continuar pesquisando a obtenção de outros

derivados tóxicos de LPS de *Bordetella pertussis* (BpLipídioA) e implementando os testes de caracterização destes.

O BpLipídioA foi obtido como subproduto da destoxificação da Vacina Pertussis (celular) por extração orgânica e submetido à hidrólise ácida, seguido por neutralização do pH, resfriamento, envase e liofilização.

A qualidade de BpLipídioA como de qualquer outro produto farmacêutico ou de um imunobiológico é estabelecida através de testes mínimos necessários, que visam a caracterização e especificação de sua estrutura, identidade, pureza, concentração, potência e inocuidade, que resumindo representam sua segurança e eficácia.

1.5 Vacina recombinante contra Hepatite B

A Hepatite B (HB) é uma doença imunopreveníveel e de notificação compulsória que se constitui um importante problema de saúde pública mundial. Estima-se que 45% da população mundial viva em áreas onde a infecção crônica pelo vírus da HB é altamente endêmica (> 7% da população é HBsAg+), 43% em regiões de endemicidade intermediária (2 a 7%) e 12% em locais de baixa endemicidade (< 2%) (WHO, 2001; SHEPARD et al., 2006).

Entre as medidas para o controle da HB e de suas complicações, a vacinação tem se mostrado de grande impacto. No Brasil, 13 anos após a introdução da vacinação, regiões endêmicas apresentam uma redução de até cinco vezes o número de indivíduos portadores de HBsAg na comunidade (BRAGA et al., 2004).

O Instituto Butantan é produtor da vacina recombinante contra hepatite B, que foi desenvolvida a partir da tecnologia do DNA recombinante. A vacina é constituída pelo antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg) altamente purificado (produzido através da inserção de um plasmídeo contendo o gene do antígeno em células de levedura) e adsorvido em hidróxido de alumínio (COSTA et al., 1997; MARTINS et al., 2004).

Um estudo preliminar da potencial atividade adjuvante de BpLipídioA em modelo animal foi realizado através de formulações com o antígeno recombinante de superfície do vírus da hepatite B produzido no Instituto.

Os outros produtores da vacina recombinante contra hepatite B, a fim de melhorar as taxas de soroconversão (91-100%) das populações de não respondedores (pacientes que fazem hemodiálise ou idosos), desenvolveram um novo sistema adjuvante contendo sal de alumínio e o lipídio A monofosforilado (SBAS4) que melhorou a resposta imune humoral *in vivo* e celular *in vitro*, sendo o sistema considerado eficaz, seguro e com boa tolerabilidade (THOELEN et al., 1998; THOELEN; DE CLERCQ; TORNIEPORTH, 2001).

CAPÍTULO V

5 CONCLUSÃO

O produto BpLipídioA é heterogêneo, e o padrão de fragmentação apresentado está também relacionado ao processo de hidrólise ácida, com espécies iônicas de relação m/z de acordo com os dados obtidos na literatura (CAROFF et al., 1994, 2000; CAROFF; KARIBIAN, 2003; GEURTSEN, 2007; TIRSOAGA et al., 2007; MARR et al., 2008; EL HAMID et al., 2009, GEURTSEN et al., 2009, MARR et al., 2010).

A heterogeneidade pode ser melhor controlada pela definição e robustez do método de produção. O percentual de compostos acima de 2000m/z precisa ser definido e preferencialmente abaixo de 10%.

Os testes de toxicidade demonstraram que o produto apresentou-se atóxico nas concentrações estudadas, mesmo nas concentrações mais elevadas de 200µg/mL, não ocasionando nenhum tipo de lesão dermonecrótica, febre ou morte dos animais, podendo então ser submetido à ensaios clínicos de formulações vacinais em estudo.

As metodologias analíticas realizadas permitiram caracterizar tanto a matéria-prima quanto o produto final obtido, que apresentam variações que estão diretamente relacionadas ao processo produtivo. A dosagem de fósforo permite no produto final (BpLipídioA) constatar sua defosforilação. A TLC também pode caracterizar o produto sob este ângulo.

O ensaio para verificação de atividade adjuvante do BpLipídioA demonstrou que este produto não é imunogênico e a formulação deste com a Vacina recombinante contra Hepatite B, apresentou um título de anti-HBsAg similar ao da vacina tradicional, utilizando somente a metade da concentração de antígeno vacinal, ou seja, o emprego do adjuvante BpLipídioA, de baixo custo, por ser um

sub-produto da Vacina Pertussis, aumentaria a capacidade de produção da Vacina recombinante contra Hepatite B.

Estes resultados de capacidade adjuvante nos levaram a testar o adjuvante em diferentes concentrações em uma emulsão óleo em água. Estas emulsões formuladas passaram em todos os testes de controle de processo e toxicidade, apresentando-se estáveis durante um período de seis meses, o que nos leva a uma perspectiva futura de testar estas formulações com diferentes antígenos vacinais.

Em 2010 foi realizado um estudo de atividade adjuvante do MPLA em emulsão e suspensão, para a vacina contra influenza H5N1. Este adjuvante é um outro derivado de LPS de *Bordetella pertussis*, onde o título de anticorpos das formulações de MPLA em emulsão foi superior ao das formulações com o MPLA em suspensão (MIYAKI et al., 2010).

REFERÊNCIAS*

AVANTI POLAR LIPIDS. **Lipid A Detoxified (*Salmonella minnesota* R595).** Bioactive Lipids. Alabaster, USA & Canadá, 2011. Disponível em: http://www.avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=405&Itemid=318&catnumber=699200. Acesso em: 10 fev. 2009.

BALDRICK, P.; RICHARDSON, D.; ELLIOTT, G.; WHEELER, A. W. Safety Evaluation of Monophosphoryl Lipid A (MPL): An Immunostimulatory Adjuvant. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 35, p. 398-413, 2002.

BALDRIDGE, J. R.; CRANE, T. Monophosphoryl Lipid A (MPL) Formulations for the Next Generation of Vaccines. **Methods,** v. 19, p. 103-107, 1999.

BARAFF, L. J.; LEAKE, R. D.; BURSTYN, D. G.; PAYNE, T.; CODY, C. L.; MANCLARK, C. R.; GEME, J. W. Analyses of adverse reactions to diphtheria and tetanus toxioids and pertussis vaccine by vaccine lot, endotoxin content, pertussis vaccine potency and percentage of mouse weight gain. **Pediatrics Infect. Dis. J.,** v. 8, p. 502-507, 1989.

BARTELING, S. J.; VREESWIJK, J. Developments in foot-and-mouth disease vaccines. **Vaccine**, v. 9, p. 75-88, 1991.

BIANCHI, M. E. DAMPS, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, n. 1, p, 1-5, 2007.

BRAGA, W. S. M.; BRASIL, L. M.; SOUZA, R. A. B.; MELO, M. S.; ROSAS, M. D. G.; CASTILHO, M. C.; FONSECA, J. C. F. Prevalence of Hepatitis B Virus (HBV) and Hepatitis D Virus (HDV) Infections. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 13, p. 35-46, 2004.

CAMERON, J. Pertussis vaccine: mouse-weight-gain (toxicity) test. **Dev. Biol. Stand.,** v. 34, p. 213-215, 1976.

CAROFF, M.; BRISSON, J.; MARTIN, A.; KARIBIAN, D**.** Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. **FEBS Lett.,** v. 477, p. 8-14, 2000.

CAROFF, M.; CAVAILLON, J. M.; FITTING, C.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Inability of pyrogenic, purified *Bordetella pertussis* lipid A to induce interleukin-1 release by human monocytes. **Infect. Immun.,** v. 54, p. 465-471, 1986.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de janeiro, 2002.

CAROFF, M.; DEPRUN, C.; RICHARDS, J. C.; KARIBIAN, D. Structural characterization of the lipid A of *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. **J. Bacteriol.,** v. 176, p. 5156-5159, 1994.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D.; CAVAILLON, J. M.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes Infect**., v. 4, p. 915-926, 2002.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 2431-2447, 2003.

CAROFF, M.; TACKEN, A.; SZABÓ, L. Detergent-accelerated hydrolysis of bacterial endotoxins and determination of the anomeric configuration of the glycosyl phosphate present in the "isolated lipid A" fragment of the *Bordetella pertussis* endotoxin. **Carbohydr Res.,** v. 175, p. 273-282, 1988.

CLEMENTS, C.; GRIFFITHS, E. The global impact of vaccines containing aluminium adjuvants. **Vaccine**, v. 20, n. 3, p. 24-33, 2002.

COMMITTEE FOR PROPRIETARY MEDICINAL PRODUCTS - CPMP. **Note for Guidance on the Pre-clinical Pharmaceutical and Toxicological Testing of Vaccines**, (CPMP/SWP/465.95), 1997. Disponível em: < http://www.emea.eu.int>. Acesso em: 22 nov. 2010.

COSTA, A. A.; INENAMI, M.; JUAREZ, E.; LLACEN, P. D.; RAW, I. Preliminary Report of the Use of a Recombinant Yeast derived Hepatitis B Vaccine Manufactured by Instituto Butantan. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** v. 39, n.1, p. 39-42, 1997.

COX, J. C.; COULTER, A. R. Adjuvants - a classification and review of their modes of action. **Vaccine,** v. 15, p. 248-256, 1997.

DE GREGORIO, E.; TRITTO, E.; RAPPUOLI, R. Alum adjuvanticity: unraveling a century old mystery. **European Journal of Immunology**, v. 38, p. 2068-2071, 2008.

DI PAOLO, D.; LENCI, I.; CEROCCHI, C.; MONACO, A.; LOTTI, L; TISONE, G.; ANGELICO, M. One-year vaccination against hepatitis B virus with a MPL-vaccine in liver transplant patients for HBV-related cirrhosis. **Transplant International,** v. 23, p. 1105-1112, 2010.

DOUGAN, G.; HORMAECHE, C. How bacteria and their products provide clues to vaccine and adjuvant development. **Vaccine**, n. 24, p. 13-19, 2006.

EDELMAN, R.; TACKET, C. O. Adjuvants. **International Review in Immunology,** v. 7, p. 51-66, 1990.

EL HAMIDI, A.; NOVIKOV, A.; KARIBIAN, D.; PERRY, M.; CAROFF, M. Structural characterization of *Bordetella parapertussis* lipid A. **Journal of Lipid Research,** v. 50, p. 854-859, 2009.

EL HAMIDI, A.; TIRSOAGA, A.; NOVIKOV, A.; HUSSEIN, A; CAROFF, M. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. **Journal of Lipid Research,** v. 46, p. 1173-1178, 2005.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E.; POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes Infec.,** v. 4, p. 837-851, 2002.

ESSER, M. T.; MARCHESE, R. D.; KIERSTEAD, L. S. TUSSEY, L. G.; WANG, F. CHIRMULE, N.; WASHABAUGH, M. W. Memory T Cells Vaccines. **Vaccine,** v. 21, p. 419-430, 2003.

EUROPEAN PATENT. P. M. Momin; M. J. Garcon. **Vaccines comprising oil/water emulsion with tocopherol and squalene.** Patente n°. EPO868918 B1 Application number: 98201308.8, 28 abr. 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guideline on validation of the *Limulus Amebocyte* Lysate test as an end-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices**. Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, USA. December, 1987.

FOX, C. B.; DUTILL, T. S.; CHESKO, J.; REED, S. G.; VEDVICK, T. S. Monitoring the effects of component structure and source on formulation stability and adjuvant activity of oil-in-water emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 65, p. 98-105, 2008.

FREUND, J. The mode of action of immunologic adjuvants. **Adv. Tuberc. Res.,** v. 7, p. 130-148, 1956.

GALANOS, C.; LEHMANN, V.; LUDERITZ, O.; RIETSCHEL, E.; WESTPHAL, O.; BRADE, H.; BRADE, L.; FREUDENBERG, M. A.; HANSEN-HAGGE, T.; LUDERITZ, T.; McKENZIE, G.; SCHADE, U.; STRITTMATTER, W.; TANAMOTO, K. I.; ZAHRINGER, U.; IMOTO, M.; YOSHIMURA, H. 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, p. 221-227, 1984.

GAO, B.; WANG, Y.; TSAN, M. F. The heat sensitivity of cytokine-inducing effect of Lipopolysaccharide. **Journal of Leukocyte Biology,** v. 80, p. 259-266, 2006.

GARÇON, N.; CHOMEZ, P.; VAN MECHELEN, M. Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. **Expert Rev. Vaccines,** v. 6, p. 723-739, 2007.

GEURTSEN, J. **Improving pertussis vaccines by lipopolysaccharide engineering.** 2007. 303 p. Ph. D Thesis (Biochemistry) - University of Utrecht, Utrecht, 2007.

GEURTSEN, J.; DZIECIATKOWSKA, M.; STEEGHS, L.; HAMSTRA, H. J.; BOLEIJ, J.; BROEN, K.; AKKERMAN, G.; EL HASSAN, H.; LI, J.; RICHARDS, J. C.; TOMMASSEN, J.; VAN DER LEY, P. Identification of a Novel Lipopolysaccharide Core Biosynthesis Gene Cluster in *Bordetella pertussis*, and Influence of Core Structure and Lipid A Glucosamine Substitution on Endotoxic Activity. **Infection and Immunity,** v. 77, p. 2602-2611, 2009.

GEURTSEN, J.; STEEGHS, L.; HAMSTRA, H. J.; TEN HOVE, J.; DE HAAN, A.; KUIPERS, B.; TOMMASSEN, J.; VAN DER LEY, P. Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of *Bordetella pertussis*. **Infect. Immun**., v. 74, p. 5574-5585, 2006.

GLENNY, A. T.; POPE, C. G.; WADDINGTON, H.; WALLACE, U. Immunological notes. XXII. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum**. The Journal of Pathology and Bacteriology,** v. 29, p. 38-45, 1926.

GUPTA, R. K.; RELYVELD, E. H.; LINDBLAD, E. B.; BIZZINI, B.; BEN-EFRAIM, S.; GUPTA, C. K. Adjuvants - a balance between toxicity and adjuvanticity. **Vaccine**, v. 11, p. 293-306, 1993.

GUPTA, R. K.; SIBER, G. R. Adjuvant for human vaccines- current status, problems and future prospects. **Vaccine**, v. 13, p. 1263-1276, 1995.

HENDRIKSEN, C. F. M. **Laboratory animals in vaccine production and control replacement, reduction and refinement.** Boston, USA: Kluwer Academic Publishers, 1988.

HIGASHI, H. G.; LUNA, E.; PRECIOSO, A. R.; VILELA, M.; KUBRUSLY, F. S.; DIAS, W. O.; RAW, I. Acellular and "Low" Pertussis Vaccines: Adverse events and the role of mutations. **Rev. Inst. Med. Trop.,** v. 51, p. 131-134, 2009.

HILLEMAN, M. R. Critical appraisal of emulsified oil adjuvants applied to viral vaccine. **Progress in Medical Virology**, v. 8, p. 131-182, 1966.

HILLEMAN, M. R. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccines discoveries. **Vaccine**, v. 18, p. 1436-1447, 2000.

HOMMA, J. Y.; MATSURA, M.; KANEGASAKI, S.; KAWAKUBO, Y.; KOJIMA, Y.; SHIBUKAWA, N.; KUMAZAWA, Y.; YAMAMOTO, A.; TANAMOTO, K.; YASUDA, T.; IMOTO, M.; YOSHIMURA, H.; KUSUMOTO, S.; SHIBA, T. Structural Requirements of Lipid A Responsible for the Functions: A Study with Chemically Synthesized Lipid A and Its Analogues. **Biochemistry,** v. 98, p. 395-406, 1985.

HOPKINS, M. Imunização. In:_____. **Imunologia**. South Carolina, USA: University of South Carolina, 2009. Cap. 14. Disponível em: http://pathmicro.med.sc.edu/portuguese/immuno-port-chapter14.htm. Acesso em: 19 dez. 2010.

INVIVOGEN INSIGHT. **Agonistic & Antagonistic Effects of LPS on TLR4**. San Diego, California, USA. Maio, Junho, 2007. Disponível em: http://www.invivogen.com/docs/Insight200705.pdf. Acesso em: 15 set. 2010.

KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M.; CLARK, K.; BENACERRAF, B.; ROCK, K. L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 90, p. 4942-4946, 1993.

LE DUR, A.; CHABY, R.; SZABO, L. Isolation of Two Protein-Free and Chemically Different Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* Phenol-Extracted Endotoxin. **Journal of Bacteriology**, v. 143, p. 78-88, 1980.

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. **Analytical Biochemistry**, v. 267, p. 161-168, 1999.

LEIVE, L.; SHOVLIN, V. Physical, Chemical, and Immunological Properties of Lipopolysaccharide Released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 243, n. 24, p. 6384-6491, 1968.

LE MOIGNIC, D.; PINOY, E. Les vaccins en emulsion dans les corps gras ou “lipo-vaccins”. **Comp. Rend. Soc. Biol.**, v. 79, p. 201-203, 1916.

LIMA, M. G. S. **Uso de óleos vegetais como adjuvantes da resposta imunológica em procedimentos de imunização.** Departamento de Bioquímica e Biologia molecular. Disponível em: http://64.233.169.104/search?q=cache:jqM2WE1K04J:sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/palestras/028.pdf+sbbq.iq.usp.br/arquivos/regional/2002/cdresumo/palestras/028.pdf&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=1&gl=br. Acesso em: 15 mar. 2010.

MACKICHAN, M. L.; SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 69-85, 2001.

MARQUES, J. C. **TLC - Cromatografia de camada delgada**. Química Analítica. Universidade da Madeira, 2009. Disponível em: www3.uma.pt/jcmarques/research.htm. Acesso em: 13 maio 2010.

MARR, N.; HAJJAR, A. M.; SHAH, N. R.; NOVIKOV, A.; YAM, C. S.; CAROFF, M; FERNANDEZ, R. C. Substitution of the *Bordetella pertussis* Lipid A phosphate groups with glucosamine is required for robust NF-kB activation and release of pro-inflammatory cytokines in cells expressing Human but not Murine Toll-Like Receptor 4-MD-2-CD14. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 2060-2069, 2010.

MARR, N.; TIRSOAGA, A.; BLANOT, D.; FERNANDEZ, R.; CAROFF, M. Glucosamine found as a substituent of both phosphate groups in *Bordetella pertussis* lipid A backbones: role of a BvgAS-activated ArnT ortholog. **Journal of Bacteriology**, p. 4281-4290, 2008.

MARTINS, R. M.; BENSABATH, G.; ARRAES, L. C.; OLIVEIRA, M. L. A.; MIGUEL, J. C.; BARBOSA, G. G.; CAMACHO, L. A. B. Multicenter Study on the Immunogenicity and Safety of Two Recombinant Vaccines Against Hepatitis B. **Mem Inst. Oswaldo Cruz,** v. 99, n. 8, p. 865-871, 2004.

MATA-HARO V.; CEKIC C.; MARTIN M.; CHILTON, P. M; CASELLA, C. R.; MITCHELL, T. C. The Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A as a TRIF-Biased Agonist of TLR4. **Science**, v. 316, 2007.

METZ, B.; HENDRIKSEN, C. F. M.; JISKOOT, W.; KERSTEN, G. F. A. Reduction of animal use in human vaccine quality control: opportunities and problems. **Vaccine,** v. 20, p. 2411-2430, 2002.

MIYAKI, C.; QUINTILIO, W.; MIYAJI, E. N.; BOTOSSO, V. F.; KUBRUSLY, F. S.; SANTOS, F. L.; IOURTOV, D.; HIGASHI, H. G.; RAW, I. Production of H5N1 (NIBRG-14) inactivated whole virus and split virion influenza vaccines and analysis of immunogenicity in mice using different adjuvant formulations. **Vaccine,** v. 28, p. 2505-2559, 2010.

MORALES, R. P. Ensayo del lisado de amebócitos del *Limulus* (LAL). **Rev. Cub. Farm.** v. 38, n.1, p.1-1, 2004.

MORRISON, D. C.; BETZ, S. J.; JACOBS, D. M. Isolation of a Lipid A bound polypeptide responsible for "LPS-initiated" mitogenesis of C_3H/HeJ spleen cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 144, p. 840-846, 1976.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. **Ciência Animal***,* v. 16, n. 2, p. 79-88, 2006.

MURRAY, R.; COHEN, P.; HARDEGREE, M. C. Mineral oil adjuvants: biological and chemical studies. **Ann. Allerg.** v. 30, p. 146-151, 1972.

O'HAGAN, D. T. **Vaccine adjuvants:** Preparation Methods and Research Protocols. New Jersey, USA: Humana Press, 2000. v. 42. cap. 16.

O'HAGAN, D. T.; MACKICHAN, M. L.; SINGH, M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. **Biomolecular Engineering**, v. 18, p. 69-85, 2001.

O'HAGAN, D. T.; SINGH, M.; GUPTA, R. K. Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines. **Adv. Drug Del. Rev.** v. 32, p. 225-246, 1998.

OGRA, P. L.; FADEN, H.; WELLIVER, R. C. Vaccination strategies for mucosal immune responses. **Clin. Microb**., v. 14, p. 430-445, 2001.

OKEMOTO, K.; KAWASAKI, K.; HANADA, K.; MIURA, M.; NISHIJIMA, M. A potent adjuvant monophosphoryl lipid A triggers various immune responses, but not secretion of IL-1beta or activation of caspase-1. **J. Immunol**., v. 176, p. 1203-1208, 2006.

PASHINE, A.; VALIANTE, N. M.; ULMER, J. B. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. **Nature Medicine**, v. 11, n. 4, 2005.

PATIL, P. K.; BAYRY, J.; RAMAKRISHNA, C.; HUGAR, B.; MISRA, L. D.; NATARAJAN, C. Immune response of goats against foot-and-mouth disease quadrivalent vaccine: comparison of double oil emulsion and aluminium hydroxide gel vaccines in eliciting immunity. **Vaccine**, v. 20, p. 2781-2789, 2002.

QUINTILIO, W.; KUBRUSLY, F. S.; IOURTOV, D.; MIYAKI, C.; SAKAUCHI, M. A.; LUCIO, F.; DIAS, S. C.; TAKATA, C. S.; MIYAJI, E. N.; HIGASHI, H. G.; LEITE, L. C. C.; RAW, I. *Bordetella pertussis* monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. **Vaccine**, v. 27, p. 4219-4224, 2009.

RAMON, G. Procedes pour accroitre la production des antitoxines. **Annales de Institut Pasteur**, v. 40, p. 1-10, 1926.

RAMON, G. Sur l'augmentation anormale de l'antitoxine chez les chevaux producteurs de serum antidipherique. **Bull. Soc. Cent. Med. Vet.,** v. 101, p. 227-234, 1925.

RAW I. Biotecnologia e saúde pública. **Revista USP**, v. 75, p. 6-17, 2007.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H.; BRADE, L.; BRANDENBURG, K.; SCHADE, U.; SEYDEL, U.; ZÄHRINGER, U.; GALANOS, C.; LÜDERITZ, O.; WESTPHAL, O. Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. **Prog Clin Biol Res.,** v. 231, p. 25–53, 1994.

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

SALKOWSKI, C. A.; DETORE, G. R.; VOGEL, S. N. Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. **Infect. Immun.,** v. 65, p. 3239-3247, 1997.

SESARDIC, D.; DOBBELAER, R. European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. **Vaccine**, v. 22, p. 2452-2456, 2004.

SHEPARD, C. W.; SIMARD, E. P.; FINELLI, L.; FIORE, A. E.; BELL, B. P. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. **Epidemiol Rev.,** v. 28, p. 112-125, 2006.

SINGH, M.; O'HAGAN, D. T. Recent Advances in Vaccine Adjuvants. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 6, 2002.

TAKAYAMA, K.; RIBI, E.; CANTRELL, J. L. Isolation of a nontoxic lipid A fraction containing tumor regression activity. **Cancer Res**., v. 41, p. 2654-2657, 1981.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. **Biological tests and assays: Pyrogen Test.** In: _____., 2006. v. 1. cap. 151, p. 135-136. Disponível em:http://www.anvisa.gov.br/reblas/bio/anali/analitico_008.htm. Acesso em: 15 out. 2010.

THOELEN, S.; DE CLERCQ, N.; TORNIEPORTH, N. A prophylactic hepatitis B vaccine with a novel adjuvant system. **Vaccine**, v. 21, p. 2400-2403, 2001.

THOELEN, S.; VAN DAMME, P.; MATHEI, C.; LEROUX-ROELS, G.; DESOMBERE, I.; SAFARY, A.; VANDEPAPELIERE, P.; SLAOUI, M.; MEHEUS, A. Safety and immunogenicity of a hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. **Vaccine**, v. 16, p. 708-714, 1998.

TIRSOAGA, A.; EL HAMIDI, A.; PERRY, M. B.; CAROFF, M.; NOVIKOV, A. A rapid, small-scale procedure for the structural characterization of lipid A applied to *Citrobacter* and *Bordetella* strains: discovery of a new structural element. **J Lipid Res.,** v. 48, p. 2419-2427, 2007.

VERHEUL A, F. M.; SNIPPE, H.; POOLMAN, J. T. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potencial vaccine component. **Microbiol. Rev**., v. 57, p. 34-49, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services Management guidelines, including information for health workers and parents**. Department of Vaccines and Biologicals. Geneva, Switzerland, 2001. Disponível em: www.who.int/vaccines-documents/. Acesso em: 03 fev. 2011.