

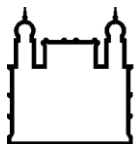
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR DIFERENTES ADJUVANTES E
SUA APLICAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE UMA VACINA DE SUBUNIDADE
CONTRA LEPTOSPIROSE.

PATRÍCIA CONCEIÇÃO GONZALEZ DIAS

Rio de Janeiro
Setembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PATRÍCIA CONCEIÇÃO GONZALEZ DIAS

Avaliação da resposta imune induzida por diferentes adjuvantes e sua aplicação no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros

RIO DE JANEIRO
Setembro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

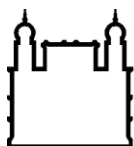
D541 Dias, Patrícia Conceição Gonzalez

Avaliação da resposta imune induzida por diferentes adjuvantes e sua aplicação no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose / Patrícia Conceição Gonzalez Dias. – Rio de Janeiro, 2016. xviii, 87 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.
Bibliografia: f. 71-86

1. Adjuvantes. 2. Vacina de subunidade. 3. Vacina contra leptospirose. 4. Proteína LigA 625-1224aa. I. Título.

CDD 616.959



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: PATRÍCIA CONCEIÇÃO GONZALEZ DIAS

Avaliação da resposta imune induzida por diferentes adjuvantes e sua aplicação no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marco Alberto Medeiros

Aprovada em: 05 / 09 / 2016

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Paula Mello de Luca - Presidente (Instituto Oswaldo Cruz – IOC/ FIOCRUZ)

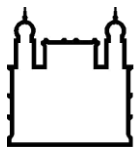
Prof. Dr^a. Maria Notomi Sato (Universidade de São Paulo - USP)

Prof. Dr. Patrícia Cristina da Costa Neves (Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ) **Prof.**

Dr. Renato Porrozzini de Almeida (Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ) **Prof.**

Dr. Douglas McIntosh (Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ)

Rio de Janeiro, 5 de setembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Anexar a cópia da Ata que será entregue pela SEAC já assinada.

Aos meus pais Luiza e Miguel.
Minha inspiração e exemplo de
caráter e determinação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, bom e misericordioso. Ele esteve sempre guiando meus passos e me protegendo. Quando me senti incapaz, n'Ele consegui forças para continuar. A Ele devo características que estão inseridas em minha alma: persistência e determinação! Contudo, não teria chegado até aqui sem a ajuda de alguns anjos que Ele me enviou, a saber:

Agradeço aos meus pais, Miguel Dias Garcia e Luiza Gonzalez Dias que mesmo distantes, estiveram sempre comigo, ensinando-me, apoiando-me, amando-me incondicionalmente e acreditando em meu potencial.

A meus irmãos Marcelo e Fabrício que sempre torceram por mim e me incentivaram.

Ao meu namorado e grande amigo Felipe Cavassana de Carvalho, por ser o grande entusiasta das minhas conquistas e ser o porto seguro que tantas vezes busquei quando as dificuldades pareciam maiores.

Aos meus amigos e familiares que entenderam (às vezes nem tanto) a minha ausência em muitas (quase todas) datas comemorativas.

Meu muitíssimo obrigado ao meu orientador Dr. Marco Alberto Medeiros. Por acreditar em mim e aceitar me orientar. Por ter prezado pelo andamento do meu trabalho, deixando toda a infraestrutura para que eu conseguisse trabalhar da melhor maneira possível.

Ainda no âmbito acadêmico, devo agradecer a Gabriela dos Santos Esteves que em vários momentos me orientou e me ouviu, e sempre se prontificou a me ajudar.

À Dra. Patrícia Cristina da Costa Neves, pela ajuda nos ensaios, no planejamento e realização de experimentos e discussão dos resultados de imunologia. À Tamiris pela ajuda nos experimentos intermináveis e discussão destes! Agradeço imensamente a toda a equipe do Laboratório de Tecnologia Imunológica que me acolheu e me auxiliou durante os experimentos lá realizados.

À Ana Paula e Fernanda, pela ajuda com a otimização e interpretação dos resultados de avidéz.

Gostaria de agradecer imensamente a todo o pessoal do Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) de Bio-Manguinhos, pela realização das etapas que envolviam o manejo de animais.

Agradeço imensamente aos amigos do Laboratório de Tecnologia Recombinante, meus colegas de trabalho e que fizeram deste lugar meu segundo lar, obrigada pela ajuda, pela colaboração e principalmente por serem grandes incentivadores e inspiração. A Cristiane Pinheiro Pestana, que é mais que uma amiga e que foi grande incentivadora desta minha conquista, A Carolina Lessa Aquino por toda atenção e ajuda, pela orientação, pelo apoio e pelo profissionalismo. A Ana Emília, Mariana Miguez, Amanda Nunes, Anna Erika, Ana Carolina Cajaravile, Ana Carolina Magalhães, Leonora, Maria Luiza Borges, Maria Luiza Fonseca, Haroldo e Thiago pelos momentos compartilhados e pela troca de experiências, obrigada por todas as vezes que tiveram que me ouvir cantando sem afinação, por todas as vezes que ouviram minhas lamentações e dramas e por todas as vezes que me auxiliaram e me cederam à mão amiga nos dias em que a luz não brilhava tanto.

Agradeço a todos os professores que dedicaram seu tempo para passar conhecimento e inspirar pessoas, tive professores excelentes e me lembrarei de cada um deles.

Obrigado a todos os companheiros de pós-graduação, por tornar as disciplinas mais leves e por serem companheiros de sonhos.

Não poderia esquecer a secretária da Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Julimar, pela paciência e pela imensa ajuda na parte burocrática do processo.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz e a todos os pesquisadores e professores do Instituto Oswaldo Cruz que lutam por uma educação digna e ensino de qualidade. Além de uma ciência de alto nível.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceitado o convite, pela atenção dispensada e pelas contribuições para a finalização deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Não poderia deixar de agradecer também aos próprios camundongos do meu estudo, que foram verdadeiros soldados, essenciais para o

desenvolvimento deste trabalho e que foram um grande incentivo para a conclusão e divulgação deste trabalho científico.

Gostaria de dedicar um espaço nos meus agradecimentos a todas as meninas que já moraram comigo no Rio, que dividiram comigo o Castelo, nosso lar, que foram amigas, confidentes e essenciais para eu conseguir concluir este trabalho. Agradeço a Ana Angélica, Andressa, Juliana, Lorraine, Nina, Raianne, Maria Eduarda, Thaís e Lívia. Vocês estarão para sempre em meu coração.

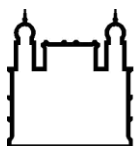
À FIOCRUZ, IOC, Bio-Manguinhos, CNPq e FAPERJ, pelo financiamento e todo suporte técnico-científico.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Divido com todos vocês mais uma etapa de minha vida.

Deus os abençoe!!!

“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”
(Henry Ford)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação da resposta imune induzida por diferentes adjuvantes e sua aplicação no desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose.

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Patrícia Conceição Gonzalez Dias

A leptospirose é uma enfermidade cosmopolita grave que acomete diferentes espécies de animais domésticos, silvestres e o homem. Sua ocorrência pode levar a elevados prejuízos econômicos na indústria pecuária e refletir significativamente na saúde pública. As vacinas convencionais contra a leptospirose humana e animal são baseadas na célula inteira inativada e possuem sucesso limitado, pois induzem imunidade de curta duração e proteção sorovar-específica. Um candidato com potencial para antígeno de vacinas de subunidades contra a leptospirose é a proteína rLigANI, que conferiu 90-100% de proteção contra o desafio letal em hamsters quando formulados com o Hidróxido de Alumínio ($Al(OH)_3$), mas não foi capaz de induzir imunidade estéril. Na tentativa de aumentar a imunogenicidade da vacina baseada na proteína rLigANI, neste trabalho realizamos um estudo comparativo entre os adjuvantes $Al(OH)_3$, $Ca_3(PO_4)_2$ (nanopartículas de Fosfato de Cálcio), Flagelina (proteína flagelar de *Salmonella typhimurium*) e ISCOM (baseado em saponina) com o intuito de avaliar e caracterizar a resposta imune induzida em camundongos pelos diferentes adjuvantes, através da avaliação da duração da resposta imune, do isotipo de imunoglobulina produzido e do perfil de citocinas associado. Todos os adjuvantes foram capazes de induzir resposta significativa de anticorpos com alta avidéz. O isotipo IgG1 foi o predominante em todas as formulações. No entanto, as formulações com os adjuvantes ISCOM e a combinação de Flagelina e $Al(OH)_3$ revelaram um maior equilíbrio entre as subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, sugerindo um possível balanço entre respostas Th1/Th2. ISCOM e $Al(OH)_3$ se destacaram no desencadeamento de resposta imune de células T com estimulação significativa de células produtoras de IFN- γ , IL-2, e IL-17. O adjuvante ISCOM se destacou entre os demais, induzindo maiores títulos de anticorpos com a menor dose vacinal, além de perfil balanceado de subclasses e estimulação de citocinas superior ao adjuvante $Al(OH)_3$, nosso adjuvante controle neste estudo, sendo assim o adjuvante escolhido para ser utilizado em desafio em hamsters. Este estudo forneceu informações importantes para entender a resposta imune induzida por cada adjuvante quando associado com a proteína rLigANI, que poderão ser utilizadas futuramente, auxiliando no desenvolvimento de vacinas contra leptospirose.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EVALUATION OF THE IMMUNE RESPONSE INDUCED BY DIFFERENT ADJUVANTS APPLIED IN THE DEVELOPMENT OF A SUBUNIT VACCINE AGAINST LEPTOSPIROSIS.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Patrícia Conceição Gonzalez Dias

Leptospirosis is a serious cosmopolitan disease that affects different species of domestic animals, wildlife and humans. Its occurrence can lead to high economic losses in livestock industry and reflect significantly on public health. Conventional vaccines against human and animal leptospirosis are based on inactivated whole cell and have limited success because induce short and serovar-specific protection immunity. A potential candidate antigen to compose a subunit vaccines against leptospirosis is the rLigANI protein, which conferred 90-100% protection against lethal challenge in hamsters when formulated with Al(OH)₃, but was not able to induce sterile immunity. In an attempt to optimize the immunogenicity of the vaccine based on rLigNI protein, in this work we conducted a comparative study between the adjuvants Al(OH)₃, Ca₃(PO₄)₂ (calcium phosphate nanoparticles), Flagellin (flagellar protein of *Salmonella typhimurium*), and ISCOMs (based saponin). We evaluated and characterized the immune response induced by different adjuvants in mice by evaluating the duration of immune response, the immunoglobulin G subclass produced after immunization and well as the associated cytokine profiles. All adjuvants were able to induce significant high avidity antibody responses. The IgG1 subclass was prevalent in all formulations. However, formulations with ISCOMs adjuvant and the combination of Flagellin and Al(OH)₃ showed a better balance between IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 subclasses, suggesting a possible balance between Th1 / Th2 responses. ISCOMs and Al(OH)₃ are highlighted in triggering an immune response of T cells with significant stimulation of cells producing IFN- γ , IL-2 and IL-17. The ISCOM adjuvant stood out among the others, inducing higher antibody titers with the lowest concentration of rLigANI protein. ISCOM Adjuvant induced a balanced profile of IgG subclasses and cytokine production superior than our control adjuvant Al(OH)₃ and for that reason was chosen for use in challenge experiments with hamsters. This study provided important information for understanding the immune response induced by each adjuvant when combined with rLigANI protein that may be used to assisting in the development of vaccines against leptospirosis.

Sumário

AUTOR: PATRÍCIA CONCEIÇÃO GONZALEZ DIAS	iii
Agradecimentos	vi
Índice de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xv
Lista de Siglas e Abreviaturas	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
1.1.1. Leptospirose	1
1.1.2. Importância Da Vacinação	8
1.1.3. Adjuvantes	10
1.1.4. Sais de alumínio	13
1.1.5. Agonistas de receptores Toll-like	16
1.1.6. Nanopartículas como adjuvantes	17
1.1.7. Complexos imunoestimulatórios	19
1.1.8. Combinações de adjuvantes	21
1.2. JUSTIFICATIVA	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. OBJETIVO GERAL	28
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Purificação da rLigANI por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos (IMAC)	29
3.2. Preparo das formulações vacinais	30
3.3. Produção de soro padrão hiperimune	31
3.4. Imunização e sangria dos camundongos	32
3.5. Determinação dos títulos de imunoglobulina G (IgG) anti-rLigANI	33
3.6. Análise das subclasses de imunoglobulina G (IgG) anti-LigANI	34

3.7. Determinação do índice de avidéz (IA) dos anticorpos anti-LigANI	34
3.8. Análise da resposta celular induzida pelas formulações vacinais	35
3.8.1. Ensaio de ELISPOT.....	35
3.9. Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Purificação da Proteína Recombinante LigANI e avaliação da homogeneidade	37
4.2. ELISA para avaliação da resposta de anticorpos	38
4.2.1. ELISA IgG Total	38
4.2.2. ELISA para avaliação da Avidéz de Anticorpos IgG com Ureia	45
4.2.3. ELISA para isotipos de IgG	47
4.3. ELISpot	50
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	69
7. PERSPECTIVAS	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
9. APÊNDICES E/OU ANEXOS	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de imunização dos modelos murinos (camundongos). 32	
Figura 2. Proteína recombinante LigANI.....	37
Figura 3. Títulos IgG anti-rLigANI (rLigANI sem adjuvante).....	38
Figura 4. Comparação doses de rLigANI.....	42
Figura 5. Comparação entre os níveis de IgG total em UE/mL obtidos com cada um dos adjuvantes.....	44
Figura 6. Subclasses do Isotipo IgG.....	48
Figura 7. Distribuição do perfil de subtipos de IgG obtidos com cada uma das formulações estudadas.....	49
Figura 8. Diferenças em relação à estimulação de células formadoras de spots (SFCs) para o IFN- γ	53
Figura 9. Diferenças em relação à estimulação de células produtoras de IL-2.....	54
Figura 10. Diferenças em relação a estimulação de células produtoras de IL-17.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações e doses administradas.	31
Tabela 2. Títulos de anticorpos IgG anti-rLigANI em UE/mL.	39
Tabela 3. Títulos de anticorpos IgG anti-rLigANI obtidos com e sem a utilização do agente caotrópico Ureia 3M e índice de avidéz para cada uma das formulações vacinais, no tempo de 120 dias.	46
Tabela 4. Avaliação da presença de células produtoras de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-17 nos grupos imunizados com formulações nas doses de 3 μ g e 30 μ g de proteína rLigANI em relação ao seu respectivo controle (Adjuvante sem a proteína rLigANI).....	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- aa – aminoácidos
- ALT – alanina aminotransferase
- ANOVA – análise de variância
- AS01 (Sistema Adjuvante 01)
- AS02 (Sistema Adjuvante 02)
- AS03 (Sistema Adjuvante 03)
- AS04 (Sistema Adjuvante 04)
- BCA – ácido bicinconínico
- Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
- BSA – albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)
- Ca₃(PO₄)₂- Fosfato de cálcio
- CCL2- do inglês - *chemokine (C-C motif) ligand*
- 2 CCL3- do inglês - *chemokine (C-C motif)*
- ligand* 3 CEUA – Comissão de Ética no Uso de
- Animais C_f – concentração final
- CO₂ – gás carbônico
- CSP (Circumsporozoito)
- D.O. – densidade ótica
- ELISA – ensaio imunoenzimático (do inglês *enzyme linked immunosorbent assay*)
- ELISPOT – imunospot enzimático (do inglês *enzyme linked immunospot*)
- EU – unidades de endotoxina (do inglês *endotoxin unit*)
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
- GSK – GlaxoSmithKline
- HBsAg – antígeno de superfície do vírus da Hepatite B
- HBV - Vírus da Hepatite C
- HSV-2 (Vírus da herpes simplex 2),
- HDP – do inglês, host defence peptides
- HPV – Papiloma Vírus Humano
- IA – índice de avidéz
- ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular-1
- IFN- γ – interferon gama

Ig – imunoglobulina
IgG – imunoglobulina G
IL – interleucina
IL-2 – interleucina 2
IL-4 – interleucina 4
IL-17 – interleucina 17
IMAC – cromatografia de afinidade por íons metálicos (do inglês *immobilized metal ion affinity chromatography*)
IMC – imunidade mediada por células
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
ISCOM – complexo imunoestimulatório (do inglês *immunostimulating complex*)
ITAMs – imunoreceptores de tirosina
Kb – quilobases
kDa – quilodalton
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactosídeo
LAEAN – Laboratório de Experimentação Animal LFA-1 – Antígeno associado à função dos leucócitos-1
LATER – Laboratório de Tecnologia Recombinante
LATIM – Laboratório de Tecnologia Imunológica LB – Luria Bertani
LigANI – Proteína LigA 625-1224 aa
LPS – lipopolissacarídeos
M – molar
MAPK - mitógeno proteína quinase
MAT- Teste de Aglutinação Microscópica
MDP (muramildipeptídeo)
m/m – razão massa por massa
m/v – razão massa por volume
MPL – Monofosfatolipídeo MyD88- Fator de diferenciação mielóide 88 NBT/BCIP – substrato ELISPOT
NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information* NF-B – Fator nuclear-B

NLRs – do inglês, “NOD-Like Receptor” PAGE
– Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS – do inglês, Phosphate Buffer Saline (Solução tampão fosfato de sódio)
PBS-T – Solução tampão fosfato de sódio com Tween
20 p.i. – pós-infecção
PI3K – fosfoinositol-3-quinase
PNI – Programa Nacional de Imunizações
rpm – rotações por minuto
RT-PCR – transcrição reversa seguida por reação em cadeia pela polimerase (do inglês *reverse transcriptase polymerase chain reaction*)
RTS, S – Mosquirix™ (Candidato a vacina para malária)
SDS – dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulfate*)
SFB – soro fetal bovino
Syk – tirosina quinase esplênica
TA – temperatura ambiente
TB – Terrific Broth
TLR – do inglês, “Toll-Like Receptor”
TMB – tetrametilbenzidina
TRIF – do inglês, “TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β ”
UE – unidades de ELISA
UV – ultravioleta
VC – volumes de coluna
v/v – razão volume por volume

1. INTRODUÇÃO

1.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Leptospirose

1.1.1.1. Classificação e biologia do agente etiológico

A Leptospirose é causada por espiroquetas patogênicas do gênero *Leptospira* (Hartskeerl et al. 2011). A classificação das espécies empregada atualmente baseia-se na relação genética e indica a existência de pelo menos 20 espécies de leptospira: 9 patogênicas, 5 intermediárias e 6 saprofíticas. Sete das espécies patogênicas constituem os principais agentes da leptospirose humana e animal, são elas: *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilli*, *L. kirschneri* e *L. alexanderi* (Cerqueira & Picardeau, 2009; Evangelista & Coburn, 2010).

Leptospiras são filogeneticamente relacionadas a outras espiroquetas. Em geral, o genoma compreende aproximadamente 5 Mb divididos em 2 cromossomos circulares, um maior, com aproximadamente 4.4 Mb, e um menor, com aproximadamente 350 kb. Trata-se de um genoma relativamente extenso comparado a outras espiroquetas como *Treponema* spp. e *Borrelia* spp., indicando a habilidade das leptospiras em viverem em condições ambientais e hospedeiros diversos, como dentro do hospedeiro animal e livre no ambiente (Bharti et al., 2003).

As espécies de leptospiras reconhecidas atualmente são categorizadas em 24 sorogrupos e mais de 300 sorovares (Cerqueira & Picardeau, 2009). Esta classificação é baseada na detecção de anticorpos aglutinantes antígeno-específicos pelo teste de aglutinação microscópica (MAT) e a variação antigênica é atribuída principalmente à heterogeneidade estrutural do carboidrato do lipopolissacarídeo (LPS) (Adler B & de la Peña Moctezuma, 2010; Cerqueira & Picardeau, 2009). Embora os sorogrupos não apresentem relação taxonômica, são extremamente úteis para o entendimento de aspectos epidemiológicos da leptospirose (Evangelista & Coburn, 2010; Fraga et al., 2011).

As leptospiras são bactérias delgadas (6 a 20 µm de extensão por 0,15 µm de diâmetro), que compartilham características de bactérias Gram

negativas, como presença de membrana externa, espaço periplasmático e LPS, e de bactérias Gram positivas, como associação da membrana citoplasmática a uma espessa camada de peptidoglicano (Evangelista & Coburn, 2010; Fraga et al., 2011; Levett et al., 2001; Bharti et al., 2003).

São micro-organismos aeróbios estritos, com crescimento lento e ótimo a 30°C e que apresentam intensa motilidade através da ação de 2 flagelos, um em cada extremidade da bactéria, os quais permitem 3 diferentes tipos de movimento: progressivo, circular e ao redor do eixo central (Fraga et al., 2011; Bharti et al., 2003).

A visualização das leptospiras pode ser realizada pelo emprego de técnicas como microscopia de campo escuro ou contraste de fase (Faine et al., 1999), coloração pela prata, conjugados imunocorados com fluoresceína ou imuno-histoquímica (Adler & Moctezuma, 2009). São sensíveis à luz solar direta, aos desinfetantes comuns, aos antissépticos, à dessecação, às variações de pH (inferiores a 6,0 ou superiores a 8,4) e às temperaturas acima de 40 °C. As leptospiras podem ser diferenciadas de outras espiroquetas através da sua morfologia característica, com extremidade em forma de gancho ou ponto de interrogação (Evangelista & Coburn, 2010; Fraga et al., 2011; Levett et al., 2001).

1.1.1.2. Aspectos epidemiológicos

A leptospirose é a zoonose com maior distribuição mundial, acometendo animais silvestres, domésticos e o homem (Levett, 2001). A infecção por cepas patogênicas de leptospira ocorre geralmente através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados, sendo o contato indireto geralmente através de água ou solo contaminados, onde a bactéria pode sobreviver por semanas e até meses (KO et al., 2009; Levett, 2001; Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005). Formação de biofilme e agregados celulares podem contribuir para sua sobrevivência fora do organismo hospedeiro (KO et al., 2009).

A infecção pode ser causada através das membranas mucosas do trato respiratório superior por consumo de água contaminada, inalação de aerossóis contaminados e com menor frequência por mordida de animais (Levett, 2001).

Em países de clima tropical a incidência de leptospirose é significativamente maior em relação a países com clima temperado, devido ao fato de a bactéria sobreviver por períodos mais longos em ambientes com temperatura e umidade mais elevadas. A doença é sazonal, com pico de incidência no verão ou no outono, nas regiões temperadas e durante a estação das chuvas, nas regiões tropicais (Levett, 2001).

A infecção humana pode ocorrer através da exposição ocupacional ou recreativa (Levett, 2001; McBride et al., 2005; WHO, 2010). A exposição ocupacional é o principal fator de risco para humanos e, o contato direto se destaca como responsável pela maior parte das infecções em fazendeiros, veterinários, trabalhadores de controle de roedores, entre outros. No entanto, pessoas que estão em contato indireto com animais, como por exemplo trabalhadores da rede de esgoto, mineradores e limpadores de caixas-d'água, também estão propensos a contaminação por leptospiras (Levett, 2001). Já a exposição recreativa está associada principalmente à prática de esportes aquáticos e viagens a áreas de risco (Levett, 2001; McBride et al., 2005; WHO, 2010).

Quase todos os mamíferos podem ser portadores de leptospira, carreando a espiroqueta nos túbulos renais proximais e eliminando-as na urina (Levett, 2001; Bharti et al., 2003; McBride et al., 2005). A habilidade das cepas patogênicas de leptospira de estabelecerem o estado persistente de portador nos animais reservatórios é o componente essencial do seu ciclo de vida. Os ratos constituem o principal reservatório na leptospirose humana, excretando altas concentrações da bactéria mesmo após meses da infecção inicial (Palaniappan et al., 2007). Nestes animais, as leptospiras podem causar infecção sistêmica, no entanto são eliminadas de todos os órgãos em seguida, com exceção dos túbulos renais. Os últimos são um sítio imunoprivilegiado, característica essa que contribui para o alto grau de persistência do patógeno (KO et al., 2009). Por outro lado, humanos são considerados hospedeiros acidentais, desenvolvendo sinais e sintomas de leptospirose aguda e, até mesmo, formas fatais da doença (Fraga et al., 2011; Levett, 2001). Contudo,

não continuam em estado portador, necessário à transmissão. De tal maneira, a transmissão direta entre humanos é incomum, embora já tenha sido detectada a excreção de leptospiras na urina humana, meses após a recuperação do paciente. Acredita-se que a sobrevivência da bactéria excretada seja reduzida devido ao baixo pH (Levett, 2001).

Os animais reservatórios são chamados de hospedeiros de manutenção, ou seja, espécies nas quais a infecção é endêmica e geralmente transferida de animal para animal por contato direto. Estes animais são interessantes para a manutenção da doença, já que a circulação contínua do patógeno é requerida para a transmissão da leptospirose (KO et al., 2009). Os animais podem atuar como hospedeiros de manutenção ou como acidentais, e desenvolver leptospirose grave e até mesmo fatal (Levett, 2001).

Para a leptospirose são considerados três padrões epidemiológicos (Levett, 2001). Um deles ocorre nos países de clima temperado com poucos sorovares de leptospira. Neste perfil a Infecção humana ocorre, principalmente, pelo contato direto com animais infectados e, nesse caso, o controle por imunização dos animais e/ou humanos é possível (Levett, 2001).

O outro perfil epidemiológico ocorre em áreas tropicais, com a circulação de inúmeros sorovares simultaneamente e as infecções humana e animal relacionadas a um maior número de animais reservatórios, incluindo roedores, cães e gado. A exposição humana se resultada na maioria das vezes da contaminação ambiental, principalmente durante a temporada de chuvas. Nesse caso, o controle da população de roedores, higiene ocupacional e, drenagens nas áreas de inundação são necessários para prevenção da leptospirose humana. Estão inclusos nesta categoria os surtos causados por desastres naturais, como enchentes e furacões (Levett, 2001).

Na última configuração epidemiológica, a doença é causada principalmente por roedores urbanos. Embora esse perfil apresente menor importância na maior parte do mundo, é potencialmente importante em lugares com infraestrutura urbana precária. Por esse motivo, este tipo infecção raramente ocorre em países desenvolvidos, em contrapartida é bastante comum em países em desenvolvimento, que possuem áreas onde há altas concentrações de favelas (Levett, 2001).

1.1.1.3. Manifestações clínicas e impactos na saúde

A leptospirose pode apresentar uma enorme variedade de manifestações, sendo a severidade dependente da amostra do microrganismo, a espécie, sorovar envolvido e tamanho do inóculo, assim como de características do hospedeiro, como idade, saúde e situação imunológica. A infecção por leptospirose pode induzir de uma doença febril autolimitada à doença de Weil, a forma grave clássica da leptospirose. O aparecimento da doença no homem varia de 1 dia até 4 semanas após exposição ao patógeno e pode persistir por meses quando os pacientes sobrevivem à infecção (Fraga et al., 2011; Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Picardeau, 2013).

A apresentação clínica da leptospirose costuma ser bifásica, com uma fase aguda septicêmica, que dura aproximadamente uma semana, seguida de uma fase imune, que é caracterizada pela produção de anticorpos, excreção da bactéria pela urina e desaparecimento dos sintomas (Fraga et al., 2011; Levett, 2001; Bharti et al., 2003; Palaniappan et al., 2007; Picardeau, 2013). A maior parte das complicações, no entanto, está associada à localização do microrganismo nos tecidos durante a fase imune e, portanto, ocorrem geralmente durante a segunda semana da infecção (Levett, 2001). Os sintomas incluem dor de cabeça, calafrios, mialgia, náusea e vômitos. No entanto, em muitos dos casos documentados a doença se apresenta de forma branda, sendo difícil o diagnóstico clínico diferencial com outras doenças infecciosas.

A Síndrome de Weil, a forma mais severa da doença, é caracterizada por complicações sistêmicas em vários órgãos simultaneamente, incluindo icterícia, meningite, hemorragias, disfunção hepática e renal e colapso cardiovascular. Dano vascular e lesões endoteliais foram observados em todos os órgãos afetados (Evangalista & Coburn et al., 2010). Outra complicação é a Síndrome Pulmonar Hemorrágica, que foi associada à leptospirose em um surto na Nicarágua em 1995 e, desde então, vem sendo descrita como complicação grave da leptospirose e importante causa de febre hemorrágica em várias regiões do mundo (Trevejo et al., 1998; Marotto et al., 1999; Helmerhorst et al., 2012; Gouveia et al., 2008). A letalidade da Síndrome de Weil varia entre 5% e 15% já a da Síndrome Pulmonar Hemorrágica ultrapassa 50% (Bharti et al., 2003; Helmerhorst et al., 2012).

A leptospirose tem um impacto significativo na saúde pública, particularmente nos países da Ásia e Américas e possivelmente nos países da África. Estimativas recentes indicam que há mais de 500.000 casos de leptospirose por ano ao redor do mundo (WHO, 2010). No Brasil, 4.706 casos de Leptospirose em humanos foram confirmados em 2014, com 327 óbitos. E em 2015, foram registrados 4.288 casos confirmados de leptospirose, distribuídos pelas 5 regiões do país nas seguintes proporções: Norte (1.297 casos), Nordeste (392 casos), Sudeste (947 casos), Sul (1.579 casos) e Centro-oeste (73 casos) (Sinan/SVS/MS, 2016). Estes números, porém, subestimam significativamente o impacto global da doença, já que a maioria dos casos relatados é relativa a manifestações graves da doença, pois a notificação é baseada na identificação de casos graves. Ao mesmo tempo, a leptospirose é comumente confundida com outras doenças febris de origem infecciosa devido ao amplo espectro de sinais e sintomas inespecíficos e ao fato de que poucos laboratórios no mundo estarem capacitados para realizar os testes diagnósticos padronizados (McBride et al., 2005; WHO, 2010). Portanto, é preciso considerar que o impacto total da leptospirose é significativamente maior do que o indicado por estimativas baseadas em vigilância passiva.

Com o aumento da globalização, a doença emergiu como um importante problema de saúde relacionado a viagens. Atualmente, a leptospirose é vista como uma doença emergente e vem se tornando uma ameaça à saúde pública em países desenvolvidos. Atividades recreativas, como natação, esportes aquáticos e viagens, tornaram-se as exposições de risco predominantes (Levett, 2001; McBride et al., 2005; WHO, 2010; Lau et al., 2010). Além disso, o Painel Intergovernamental sobre as Alterações Climáticas sugeriu que devido às mudanças climáticas que vêm ocorrendo como consequência do aquecimento global, muitas regiões estão susceptíveis a enchentes mais fortes e frequentes (WHO, 2010).

A leptospirose é uma doença negligenciada (Hotez et al., 2007), o que faz com que o seu maior impacto ocorra nas populações mais pobres de países em desenvolvimento. Tradicionalmente, a leptospirose é a principal causa de mortalidade e morbidade entre agricultores rurais de subsistência (McBride et al., 2005; WHO, 2010) e vem emergindo como um problema de saúde urbana. Atualmente, um bilhão de pessoas reside em favelas (Nations U,

2003), onde a falta de saneamento básico permitiu condições favoráveis para transmissão a partir dos ratos (De Faria, 2008). Estima-se que a população residente em favelas duplique nos próximos 25 anos (Nations U, 2003). Com o crescimento da população dos grandes centros urbanos, que é marginalizada e não possui acesso a serviços básicos de saúde e saneamento, é esperado que a leptospirose se configure como um problema de saúde global de importância crescente no futuro (WHO, 2010).

1.1.1.4. Aspectos imunológicos da leptospirose

A resposta humoral é o mecanismo primário de imunidade na infecção por leptospirose e medeia o mecanismo de resistência natural. Essa observação é evidenciada através da presença de anticorpos das classes IgM e IgG no soro de pacientes que convalesceram de formas graves da leptospirose em até 6 anos após a infecção inicial (Evangelista & Coburn, 2010).

O sistema imune inato constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro e desempenha papel crucial no reconhecimento e eliminação de leptospirose.

Os receptores semelhantes ao Toll (TLR, do inglês "Toll-like receptor") e os receptores semelhantes ao Nod (NLR, do inglês Nodlike receptor) são as duas famílias principais de receptores que desempenham papel decisivo no reconhecimento do patógeno pelo sistema imune inato hospedeiro (Evangelista & Coburn, 2010; Fraga et al., 2011).

Geralmente, LPS de bactérias Gram negativas ativam TLR4, resultando em uma resposta pró-inflamatória mediada por citocinas e quimiocinas. No entanto, o LPS de leptospirose ativa macrófagos humanos através de TLR2 ao invés de TLR4. Esse reconhecimento diferenciado é atribuído à composição incomum do lipídeo A e pode ser uma estratégia da bactéria patogênica para evitar a ativação adequada de células do sistema imune, contribuindo para o estabelecimento da infecção em humanos (Fraga et al., 2011; Palaniappan et al., 2007).

As leptospirose são microrganismos extracelulares, deste modo, a imunidade adquirida é dependente da produção de anticorpos e da ativação da via clássica do sistema complemento. A produção de anticorpos é importante na fagocitose da bactéria por neutrófilos e macrófagos, sendo efetiva somente

quando o patógeno encontra-se opsonizado por anticorpos IgG específicos, sugerindo que o envelope externo das leptospiras possui um componente antifagocítico (Ko et al., 2009; Fraga et al., 2011).

Estes anticorpos específicos podem aglutinar bactérias e ativar a via clássica do sistema complemento, sendo esta ativação um dos mecanismos efetores mais importantes durante as primeiras horas de infecção e as opsoninas geradas após ativação desse sistema podem também intensificar o processo de fagocitose pelas células do sistema imune inato (Fraga et al., 2011). Os anticorpos produzidos durante a infecção por leptospira, assim como ocorre para outras bactérias Gram negativas, são aglutinantes e direcionados principalmente contra o LPS bacteriano (Ko et al., 2009; Evangelista & Coburn, 2010; Fraga et al., 2011). Tal fato pode ser confirmado pela relação entre proteção e os níveis de anticorpos anti-LPS na transferência de imunidade passiva através de soro hiperimune ou de anticorpos monoclonais. Contudo, a imunidade anti-LPS é limitada aos sorovares homólogos ou intimamente relacionados e não se sabe se a resposta por anticorpos contra outros antígenos além do LPS também conferem proteção (Ko et al., 2009, Fraga et al., 2011; Levett, 2001).

Apesar de serem patógenos extracelulares, as leptospiras virulentas são microrganismos com grande capacidade invasiva e de adesão, penetrando na célula hospedeira mais eficientemente do que as cepas não virulentas ou não patogênicas. Além disso, elas podem escapar do fagolisossomo para o citosol de macrófagos humanos, comportamento clássico de patógenos intracelulares (Ko et al., 2009; Fraga et al., 2011).

Conseqüentemente, peptídeos bacterianos podem ser apresentados via MHC de classe I para linfócitos T CD8. De fato, linfócitos T CD8 específicos para peptídeos derivados de LigA foram identificados em humanos. No entanto, o papel da imunidade celular na leptospirose permanece pouco compreendido (Fraga et al., 2011; Palaniappan et al., 2007).

1.1.2. Importância Da Vacinação

A vacinação tem a finalidade de gerar uma resposta imune de memória protetora, de suficiente intensidade e duração, para prevenção ou atenuação

da virulência de organismos patogênicos (Petrovsky & Cooper, 2011). Há mais de 200 anos, a vacinação foi introduzida como uma estratégia de controle de doenças infecciosas, sendo considerada uma das maiores intervenções médicas nessa área. A vacinação tem se mostrado extremamente importante na redução da morbidade e mortalidade dessas patologias (De et al., 2013; Hilleman, 2000; Pashine et al., 2005), sendo sua importância reforçada pelo fato de que os programas de imunização levaram à erradicação completa, ou quase completa, de algumas destas doenças, tais como, varíola, difteria, poliomielite e tétano neonatal, na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Abbas et al., 2012; Nandedkar, 2009).

O Brasil dispõe de um Programa Nacional de Imunizações (PNI) desde 1973 e este visa integrar ações de imunização realizadas no país. Uma grande proporção de vacinas licenciadas no país é baseada em organismos vivos, e apesar da sua forte potência, estes sistemas vivos têm reações adversas que variam desde reações anafiláticas até encefalite, doença associada à vacina e até morte (Huang et al., 2004; Perrie et al., 2007). Por este motivo, os investimentos atuais estão direcionados a vacinas de subunidade, que são vacinas que possuem apenas os melhores antígenos estimulantes do sistema imune. Na maioria dos casos, estas vacinas estimulam epitopos muito específicos que reconhecem e se ligam a anticorpos ou células T. As vacinas de subunidade contêm apenas os antígenos essenciais para desencadear uma resposta efetiva contra o microrganismo, sendo assim, as chances de reação adversa são muito menores. Por outro lado, o desenvolvimento de novas vacinas que sejam simultaneamente seguras e efetivas, é um processo bastante complexo ainda nos dias de hoje, quando considerada a utilização de antígenos altamente purificados obtidos a partir de tecnologia recombinante e da utilização de peptídeos sintéticos. (Nabel, 2013; Mallapragada & Narasimhan, 2008).

Estes antígenos possibilitam a geração de vacinas seguras com menor ocorrência de eventos adversos decorrentes da sua administração. Contudo, a falta de características de um patógeno original, como por exemplo, a habilidade de replicação, de produção de altos níveis de antígenos e, de componentes imunoestimulatórios devido à presença de diferentes e

numerosos epítomos, resultam na baixa imunogenicidade dessas formulações (Reed et al., 2013; Janeway & Medzhitov, 2002).

Para aumentar a imunogenicidade destas formulações vacinais é necessária a utilização de substâncias com efeito adjuvante para potencializar a resposta gerada por estes antígenos (Tandrup Schmidt et al., 2016; Kazzaz et al., 2006; Perrie et al., 2008; Sharp et al., 2009; Vangala et al., 2006). Por consequência, há então a necessidade de estudos aprofundados sobre respostas desencadeadas por diferentes adjuvantes no contexto de vacinas recombinantes para doenças infecciosas.

Neste trabalho, avaliamos diferentes adjuvantes, com modos de ação distintos, associados à proteína recombinante LigANI, porção não-idêntica da molécula da LigA (*Leptospiral immunoglobulin-like protein A*) de *Leptospira interrogans*, uma adesina pertencente à família Big (Bacterial immunoglobulin-like) que é constituída de proteínas com domínios repetidos e que estão expostas na superfície da bactéria. Esta porção da molécula de LigA, trata-se de uma proteína de membrana externa (OMP), presente apenas em leptospiros patogênicas, característica considerada importante para o reconhecimento deste antígeno pelo sistema imune. Este fato associado aos resultados obtidos com esta proteína em ensaios de desafio, apontam para esta proteína como um importante candidato a antígeno para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose (Silva, 2007; Koizumi & Watanabe, 2004; Palaniappan et al, 2006; Coutinho, 2011). No entanto, a imunidade estéril continua um desafio, havendo a necessidade crítica da utilização de adjuvantes mais eficientes.

1.1.3. Adjuvantes

Adjuvantes foram originalmente descritos por Ramon como substancias que potencializam a resposta imune a um antígeno (Ramon, 1924). A palavra adjuvante deriva de *adjuvare*, do latim “ajudar” ou “auxiliar” (Cox & Coulter, 1997). São substâncias capazes de aumentar a resposta imune específica e auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune precoce, elevada e duradoura (Apostólico et al., 2016; Awate et al., 2013).

Formulações vacinais com novos adjuvantes são bastante atraentes para aperfeiçoar o desempenho de antígenos purificados. Nos últimos anos, os adjuvantes vêm recebendo muita atenção, devido ao desenvolvimento de vacinas sintéticas e purificadas, usando subunidades de antígenos, os quais são fracos imunógenos e requerem adjuvantes para desencadear uma resposta imunológica (Azmi et al., 2014). Os adjuvantes apresentam diversos mecanismos de ação e devem ser selecionados baseados na rota de administração e na imunidade requerida pelo tipo de vacina particular (imunidade humoral, celular ou mucosa). A seleção de adjuvantes para vacinas humanas é determinada por um balanço entre a adjuvantividade requerida e níveis de eventos adversos aceitáveis (Guy, 2007; apostólico et al., 2016).

Adjuvantes podem ser utilizados para aumentar a imunogenicidade, diminuir a dose necessária de antígeno, acelerar a resposta imune, reduzir o número de imunizações necessárias, aumentar a duração da proteção, ou ainda, otimizar a eficácia da imunização em respondedores fracos, como neonatos e idosos (Reed et al., 2013; Petrovsky & Aguilar, 2004). Apesar de servirem essencialmente para o mesmo propósito, ou seja, aumentar a resposta imune, os adjuvantes são diversos quanto à constituição química e estrutural, à atividade e ao modo de ação (De Gregorio et al., 2013; Guy, 2007; Mastelic et al., 2010). Uma extensa família de moléculas e substâncias, incluindo sais minerais, produtos microbianos (CpG, Monofosforil Lipídio A ou MPL, toxinas da cólera), emulsões (adjuvante de Freund, MF59), particulados (lipossomos), sintéticos (análogos de dipeptídeo muramil), saponina (QS-21) e imunomoduladores endógenos (citocinas, quimiocinas e moléculas co-estimuladoras), micro e nanopartículas têm sido avaliadas quanto à sua capacidade adjuvante, muitas vezes de forma empírica, sem o conhecimento dos mecanismos de ação específicos (Awate et al., 2013; Garlapati et al., 2009; Vogel & Powell, 1995; Singh & O'Hagan, 1999; Singh & O'Hagan, 2002; Kensil et al., 2004; Tritto et al., 2009; Vartak & Sucheck, 2016).

Desta forma, os adjuvantes são representados por muitas e diferentes substâncias sendo elas naturais ou sintéticas e podem ser divididos em duas principais classes baseadas no seu mecanismo de ação notado, sendo estas os adjuvantes carreadores e adjuvantes imuno-estimulatórios (Reed et al., 2013; Singh & O' Hagan, 2003).

1.1.3.1. Adjuvantes carreadores

Os adjuvantes carreadores geralmente são partículas *in natura* e incluem emulsões, micropartículas, complexos imunoestimuladores (ISCOMS), lipossomas e virossomas (Singh & O' Hagan, 2003). Os adjuvantes baseados em Alumínio (“Alums”) devem também ser incluídos nesta categoria, uma vez que induzem a formação de microcristais de ácido úrico. Estes adjuvantes atuam principalmente dirigindo antígenos para células apresentadoras de antígenos (APCs) e, podem também aumentar a apresentação cruzada. Além disso, podem proteger antígenos da degradação *in vivo* por proteases e nucleases, permitindo a sua passagem através da barreira epitelial, ou através da promoção do efeito de depósito, o que aumenta a absorção do antígeno, prolongando a sua exposição no local da injeção. No entanto, há evidências que sugerem que os sistemas de entrega de partículas também ativam a imunidade inata (Shi et al., 2001; Singh & O' Hagan, 2003; Pashine et al., 2005). Estes adjuvantes têm sido empregados com sucesso por muitos anos como adjuvantes em vacinas licenciadas.

Os sistemas de veiculação de vacinas são geralmente compostos de partículas de dimensões comparáveis a patógenos, como bactérias ou vírus (Perrie et al., 2008; Schwendener et al., 2010), primeiramente descritos como formadores de depósito do antígeno, embora existam atualmente evidências de que alguns desses adjuvantes possam ativar a resposta imune inata (Awate et al., 2013). O encapsulamento pode atuar aumentando a imunogenicidade e, permitindo a veiculação da formulação devido ao aumento da proteção contra degradação e reconhecimento pelas APCs (Malyala et al., 2008). Adjuvantes podem atuar por um ou vários mecanismos de ação, atuando na liberação controlada do antígeno no sítio de infecção (efeito depósito), estimulando a produção de citocinas e quimiocinas, recrutando as células relacionadas à resposta imune no sítio de injeção, aumentando o ingresso do antígeno nas APCs, ativando e maturando as APCs, aumentando a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II e das moléculas coestimulatórias e, ativando os inflamossomos (Awate et al., 2013; Cox; Coulter, 1997; De et al., 2013).

As emulsões oleosas e os sais de Alumínio são os adjuvantes mais utilizados em vacinas de uso veterinário e humano (Aucouturier et al., 2001; De et al., 2013).

1.1.3.2. Adjuvantes imunoestimulatórios

Adjuvantes imunoestimulatórios são aqueles que ativam preferencialmente a imunidade inata (Mutwiri et al., 2011). Os avanços na compreensão do papel que a imunidade inata desempenha na ativação da imunidade adaptativa forneceram uma maior compreensão sobre o mecanismo de ação destes adjuvantes (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Adjuvantes imunoestimulatórios são predominantemente derivados de patógenos e representam Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) tais como, CpG oligodeoxinucleotídeo (ODN), LPS e o seu derivado, monofosforil-lípido A (MPL), e dipéptido de muramilo (MDP), os quais estão presentes em organismos patogênicos, mas estão ausentes no hospedeiro (Mutwiri et al., 2011). Estas moléculas são reconhecidas por PRRs (receptores de reconhecimento de padrões) como TLRs (Receptores *Toll-like*) e NLRs (receptores NOD-like) expressos por células do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. O acoplamento destes receptores inicia uma cascata de atividades de sinalização intracelular que conduzem à superexpressão de genes de leucócitos envolvidos na secreção de citocina e quimiocina, e expressão de moléculas co-estimuladoras. Estes eventos constituem a fase inata da resposta imune, e são críticos para o controle da replicação do patógeno e iniciação da imunidade adaptativa (Janeway & Medzhitov, 2002; Pulendran & Ahmed, 2006).

1.1.4. Sais de alumínio

Os adjuvantes baseados em sais de Alumínio, comumente denominados “alum”, compreendem os adjuvantes de Fosfato de Alumínio, Hidróxido de Alumínio e Hidróxido-fosfato de Alumínio. São amplamente empregados, sendo aprovados para uso humano, inclusive pediátrico. Glenny foi o primeiro a publicar em 1926 o estudo com este adjuvante em modelos animais (Glenny,

1926). Esta classe de adjuvantes é componente de várias vacinas virais e bacterianas, como as vacinas contra difteria, tétano e coqueluche, vacinas contra os vírus das hepatites A e B, raiva, dentre outras.

Apesar do uso generalizado destes sais como adjuvantes, principalmente do Hidróxido de Alumínio, surpreendentemente, não há ainda total entendimento sobre seu mecanismo de ação. Os adjuvantes à base de alumínio incluem, entre outros, o efeito repositório, o efeito pró-fagocítico, e a ativação da via pró-inflamatória NLRP3 (Kool et al., 2008). Estes estimulam imunidade inata, bem como adquirida além de ativar o sistema complemento. Os antígenos vacinais são adsorvidos nas partículas de alumínio, o que resulta em um aumento da estabilidade do antígeno, levando à suposição inicial de que o alumínio criasse um depósito *in situ*, que permitiria a liberação prolongada do antígeno e conseqüente aumento da exposição deste ao sistema imune (Hem & White, 1995). Contudo, ensaios posteriores puseram em desconfiança o modo de ação desse adjuvante. Foi demonstrado que após injeção intramuscular, grande parte do antígeno difundia do local de injeção em algumas horas (Gupta et al., 1996). Corroborando este achado, foi também demonstrado que a administração do antígeno adsorvido ao alumínio não aumentava a meia vida deste *in situ* (Hem & Hogenesch, 2007).

Formulações vacinais particuladas, como os antígenos adsorvidos ao alumínio, são internalizadas pelas APCs mais rapidamente do que antígenos solúveis (De et al., 2013). O mecanismo de otimização do ingresso do antígeno pelos sais de alumínio ainda não está elucidado, mas um estudo realizado por Flach e colaboradores (2011) propõe que a apresentação do antígeno ocorra sem o ingresso de alumínio nas células dendríticas. Eles demonstraram que o alumínio é capaz de se ligar a lipídios de membrana das células dendríticas com substancial força e não aos receptores específicos destas (Flach et al., 2011). Essa ligação promove uma alteração na estrutura dos lipídios de membrana que envolve a agregação dos motivos ativadores baseados nos imunoreceptores de tirosina (ITAMs), com tirosina quinase esplênica (Syk) e fosfoinositol-3-quinase (PI3K), mediando uma subseqüente resposta fagocítica. Dessa forma, o alumínio não ingressaria na célula, mas, ao invés disso, “entregaria” o antígeno adsorvido através da membrana plasmática. De acordo com os autores, as células dendríticas ativadas pelo Hidróxido de Alumínio

desenvolvem uma forte afinidade pelas células T CD4, medida por ICAM-1 (Molécula de adesão intracelular-1) e LFA-1 (antígeno associado à função dos leucócitos-1), sendo esse um mecanismo essencial para a adjuvantividade dos sais de alumínio. No entanto, estes resultados se opõem a estudo prévio utilizando microscopia confocal, que mostra que o alumínio é sim internalizado pelas APCs (Hornung et al., 2008).

Tipicamente o alumínio induz predominantemente resposta imune tipo Th2, em relação à resposta imune celular tipo Th1. O mecanismo de como isso ocorre não é bem elucidado, entretanto, foi demonstrado que ao contrário do que ocorre com os agonistas de receptores “*Toll-like*” (agonistas TLR), que requerem moléculas adaptadoras fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e TRIF (do inglês, TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), o efeito adjuvante do alumínio não é diminuído na ausência dessas proteínas, sugerindo que o alumínio não sinaliza de maneira dependente de TLR (Gavin et al., 2006).

Formulações contendo alumínio como adjuvante estimulam a ativação do inflamossomo, envolvendo a sinalização mediada por NLRP3 e caspase-1 e consequente liberação de IL-1 beta e IL-18 pelas células dendríticas (DCs) (Sokolovska et al., 2007). As DCs ativadas desse modo estimulam as células T CD4(+) a secretarem IL-4 e IL-5, direcionando para uma resposta Th2. Por outro lado, o alumínio pode indiretamente promover a liberação de certas moléculas pelas células, as quais podem auxiliar na atividade adjuvante. Exemplo disso é a estimulação na produção de ácido úrico, o qual é produzido normalmente como um padrão molecular associado ao perigo (DAMP) após injúria celular (Kool et al., 2008). O efeito imunoestimulatório secundário em resposta à vacinação com vacinas contendo alumínio é devido ao ácido úrico liberado, que é então internalizado pelas APCs e as ativa via inflamossomo (Hornung et al., 2008). Sabe-se que o efeito imunoestimulatório do alumínio é amplo e parece envolver múltiplas vias, necessitando de mais estudos para a sua elucidação.

O alumínio não induz a produção de IFN- γ e estimulação de linfócitos T citotóxicos, importantes para o controle de infecções virais intracelulares (Kazzaz et al., 2006), e pode causar reações adversas locais, como nódulos subcutâneos, eritema e hipersensibilidade de contato (Perrie et al., 2008). No

entanto, este adjuvante continua sendo a referência em estudos que avaliam novas substâncias com potencial adjuvante, utilizado muitas vezes como um controle, já que é regularmente utilizado em vacinas humanas, com bom histórico de segurança (Wen & Shi, 2016).

1.1.5. Agonistas de receptores Toll-like

O sistema imunológico tem a tarefa complexa de separar componentes do próprio organismo de agentes externos que possam ser ameaças. Para cumprir esta missão, o sistema imunológico desenvolveu receptores que reconhecem moléculas presentes em organismos patogênicos, mas que demonstram ter uma interação limitada com componentes do hospedeiro (Gordon, 2002). Estes receptores, conhecidos como receptores de reconhecimento padrão (PRRs) têm como função promover uma resposta imune inata e incluem elementos tais como o receptor de manose (MR), receptores scavenger, TLRs, entre outros. Os PRRs se ligam a estruturas microbianas conservadas chamadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A expressão destes receptores permite que o sistema imune reconheça uma grande variedade de agentes patogênicos que expressam um ou mais destes PAMPs, e sua ligação inicia a resposta imunológica subsequente. Os PRRs são expressos em células do sistema imune inato, incluindo macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células *natural killers* (NK) (Takeuchi & Akira, 2002). Após ligação ao ligante, TLRs ativam as vias de transdução de sinal através do recrutamento de moléculas adaptadoras, tais como MyD88 (Akira et al., 2003; Kawai et al., 1999).

Diversas vacinas são constituídas por antígenos atuam como agonistas de receptor *Toll-like* (TLRAs) de como Bacilo de Calmette Guérin (TLR2 e TLR4) (Heldwein et al., 2003; Yadav & Schorey, 2006) a vacina oral contra a poliomielite (TLR3) (Harris & Coyne, 2013; Oshiumi et al., 2011), vacina contra febre amarela (TLR 7, 8, e 9) (Querec et al., 2006), a vacina de mucosa contra Tétano (TLR5) (Lee et al., 2015), entre outras.

Um importante agonista proteico natural de TLR5, que vem sendo estudado como adjuvante, é a Flagelina, que constitui o componente principal de flagelos bacterianos capaz de estimular a defesa de uma variedade de

organismos hospedeiros, incluindo mamíferos, insetos e plantas (Hayashi et al., 2001). A Flagelina ativa a resposta imune inata, que é considerada importante para a iniciação e a regulação imune adaptativa (Qi et al., 2015). Ao longo dos últimos anos surgiu um grande interesse no desenvolvimento de Flagelina como um adjuvante para uso em vacinas humanas para estimular resposta imune humoral e resposta mediada por células (Bates et al., 2011).

Atualmente a Flagelina é produzida por tecnologia do DNA recombinante, e a maioria das avaliações de Flagelina como estimulador do sistema imune tem usado uma das duas formas de Flagelina de *Salmonella typhimurium* (FliC e FljB), além disso, também vêm sendo estudados 6 genes estruturais de Flagelina de *Vibrio vulnificus* (FlaA, FlaB, FlaC, FlaD, FlaE e FlaF), demonstrando que a FlaB possa ter maior atividade adjuvante por via mucosa (Lee et al., 2006).

1.1.6. Nanopartículas como adjuvantes

Nanopartículas são partículas com diâmetro geralmente variando entre 1 e 100 nm. O seu ingresso nas células é facilitado justamente pelo seu tamanho reduzido e estas são em grande parcela biocompatíveis (Burgess, 2009). Nanopartículas podem ter efeito nas células imunes beneficiando no tratamento de desordens mediadas por respostas imunes indesejadas e reforçar a resposta imune à antígenos fracos. Nanovacinas podem oferecer muitas vantagens, incluindo a redução de eventos adversos, o *delivery* do antígeno no sítio específico e, o aumento da biodisponibilidade do antígeno (Zolnik et al., 2010). Além disso, as nanopartículas utilizadas em formulações vacinais tendem a apresentar tamanho comparável a patógenos reconhecidos pelo sistema imune (Xiang et al., 2008).

O uso de nanopartículas como adjuvante é possível graças as suas propriedades imunoestimulatórias e de carreamento de antígenos vacinais. Exemplos de algumas das principais nanopartículas utilizadas no desenvolvimento de nanovacinas incluem: nanopartículas metálicas relativamente inertes como o ouro coloidal, com 10 a 50 nm, nas quais o antígeno é conjugado ou associado; micelas compostas de polímeros anfifílicos que formam estruturas contendo 5 a 100 nm de diâmetro em solução aquosa;

lipossomas (20 nm a 1µm) que são estruturas compostas de um núcleo aquoso completamente encapsulado por uma bicamada lipídica; e nanotubos de carbono (2 a 100nm) compostos de anéis de benzeno formando um cilindro de carbono (Zaman et al., 2013).

Nanopartículas de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) são utilizadas em vacinas para uso humano desde 1960 na Europa e têm demonstrado uma excelente capacidade de absorção de moléculas bioativas, sendo estáveis durante anos em suspensão aquosa, como gel ou como pó de pulverização. Em estudos de toxicidade aguda em cobaias, este adjuvante tem se mostrado seguro para a administração via oral, muscular, subcutânea e inalação pulmonar (He et al., 2000).

Ao longo dos anos foram gerados extensos dados pré-clínicos que mostram a capacidade das nanopartículas de fosfato de cálcio em aumentar a imunogenicidade das vacinas já existentes, bem como, de novos antígenos vacinais após administração por via intramuscular por via mucosa. A segurança e a eficácia das nanopartículas de fosfato de cálcio em vacinas foi demonstrada utilizando diferentes antígenos virais e bacterianos, como o da herpes genital (HSV-2), do vírus de Epstein Barr (He et al., 2000), da gripe sazonal (H3N2, H1N1), da gripe aviária H5N1, da gripe suína H1N1, do HIV, do antraz, da malária, da hepatite B, do tétano e da tuberculose e recentemente em Leishmaniose experimental (Chaurasia et al., 2016).

Na Europa, nanopartículas de fosfato de cálcio foram utilizadas como um adjuvante de vacinas contra difteria e tétano e antígenos para reações alérgicas (Relyveld et al., 1985). Goto e colaboradores relataram que as reações locais nos tecidos causadas por injeção de gel e suspensão de nanopartículas de fosfato de cálcio cessaram completamente na quarta semana, enquanto a irritação causada por gel e suspensão de Hidróxido de Alumínio persistiu por 8 semanas (Goto et al., 1993).

Poucos estudos recentes demonstram a capacidade imunoestimulatória de adjuvantes baseados em nanopartículas de fosfato de cálcio, no entanto, há grande necessidade da realização de estudos utilizando este adjuvante associado a antígenos vacinais de diferentes origens, por ser um adjuvante que demonstrou segurança e grande estabilidade que são qualidades importantes na produção de vacinas para uso humano e veterinário.

1.1.7. Complexos imunoestimulatórios

Um grupo de imunoestimuladores de grande interesse são as saponinas, cuja forte atividade adjuvante foi descrita pela primeira vez em 1930 (Dalsgaard, 1970). As saponinas são triterpenóides naturais ou glicósidos de esteróides, que podem ser extraídos a partir da casca de uma árvore da América do sul chamada *Quillaja saponaria* (casca de sabão) (Sun et al., 2009; Osbourn et al., 2011).

O QS-21 já foi considerado o adjuvante baseado em saponina mais potente, sendo extensivamente utilizado em vários estudos, incluindo os de vacinas de uso terapêutico e de uso profilático para animais e humanos (Dey & Srivastava, 2011; Kim et al., 2000). O QS-21 demonstrou ser efetivo como adjuvante imunológico para vacinas humanas para uma variedade de antígenos (bacterianos, vírais e parasitários) e ter uma toxicidade relativamente baixa em estudos pré-clínicos em camundongos (Kensil & Kammer, 1998; Ragupathi et al., 2011). Demonstrando estimular tanto resposta imune humoral quanto celular composta por imunidade dos tipos Th1 e Th2 (Pearse & Drane, 2004).

A capacidade de estimulação de resposta celular do QS-21 é especialmente importante para o desenvolvimento de vacinas contra câncer e patógenos intracelulares (Leroux-Roels, 2010). Uma série de ensaios de vacinas foram conduzidos usando o QS-21 como adjuvante, inicialmente para vacinas de câncer (melanoma, mama e próstata) e, subsequentemente, para vacinas contra doença de Alzheimer e doenças infecciosas, incluindo vírus da influenza, vírus da imunodeficiência humana (HIV)-1, vírus herpes simplex (HSV), malária e hepatite B (Dey & Srivastava, 2011; Ragupathi et al., 2011).

Contudo, a saponina natural QS-21 tem desvantagens inerentes como instabilidade química, fornecimento limitado, purificação difícil e de baixo rendimento, além da toxicidade limitante da dose, que a impede de ter uma utilização mais ampla (Adams et al., 2010). Além disso, há relatos de que QS-21 poderia causar hemólise *in vitro*, sendo também observados efeitos colaterais com sua utilização *in vivo* (Sun et al., 2009). Saponinas interagem com colesterol e podem formar poros na bicamada lipídica das membranas

celulares. Quando essa interação acontece aos eritrócitos, pode ocorrer hemólise (Kersten & Crommelin, 2003).

Com o intuito de reduzir a toxicidade relacionada à saponina, um complexo imunoestimulador (ISCOM) foi desenvolvido por Morein e colaboradores em 1984 (Behboudi et al., 1995).

Estes complexos imunoestimuladores (ISCOMs) foram desenvolvidos por uma combinação de raciocínio científico a um elemento do inesperado. A finalidade com o desenvolvimento do ISCOM era formular antígeno e adjuvante em uma mesma partícula (Morein et al., 2004; Sjölander et al., 1998).

ISCOMs são estruturas particuladas com aproximadamente 40-nm, que são formadas espontaneamente de colesterol, fosfolípidos, saponina e proteínas de envelope viral quando colocadas juntas (Cox et al., 1998; Azmi et al., 2014). Esta formulação mantém a atividade adjuvante da saponina com a estabilidade aumentada quando comparada com o QS-21. Além disso, a preocupação de hemólise é resolvida, eliminando a possibilidade de a saponina interagir com as membranas celulares (Lovgren et al., 2011; Sun et al., 2009).

Os ISCOMs são transportadores lipídicos que agem como adjuvantes, com toxicidade mínima. Estes adjuvantes carregam os peptídeos e proteínas ao citoplasma e induzem respostas de células T (MHC classe I) aos antígenos, constituindo importantes candidatos para uso em vacinas humanas (Hawkins et al., 2003; Agrawal et al., 2003). Estes compostos são capazes de produzir resposta imune humoral e celular balanceada, através da indução de múltiplos mediadores de resposta imune inata e adaptativa, de processos celulares e da interação entre estes elementos (Pearse & Drane, 2004).

Uma grande diversidade de vacinas experimentais tem sido formulada com ISCOMs, demonstrando capacidade de indução de fortes respostas imune humoral e celular em uma variedade de espécies animais (Sun et al., 2009). Estas formulações são preparadas com antígenos definidos, não existindo muitos relatos sobre a utilização de ISCOMs associados a bactérias inteiras (Camussone et al., 2013).

ISCOMs são adjuvantes que funcionam como novos apresentadores de antígenos e são considerados, até o momento, os sistemas de entrega de antígeno de maior sucesso para antígenos de origem viral, bacteriana e, até mesmo, parasitário (Agrawal et al., 2003; Kensil, 1996; Morein et al., 2004).

A principal característica das vacinas baseadas em adjuvantes ISCOM é a sua habilidade de induzir forte resposta imune humoral e celular, incluindo resposta do tipo CTL (Sanders et al., 2005). A primeira década de pesquisa demonstrou em uma variedade de modelos animais, incluindo primatas não humanos, e utilizando uma vasta gama de antígenos, que vacinas baseadas em adjuvantes ISCOM são seguras (Sjölander et al., 2001), altamente imunogênicas e eficazes (Lövgren Bengtsson et al., 2011).

Já a segunda década tem construído sobre base sólida de ciência básica, a garantia de que as vacinas baseadas em ISCOM são adequadas para uso no desenvolvimento de vacinas humanas. Estes estudos têm incluído o desenvolvimento de métodos para fabricação de vacinas baseadas em ISCOM que sejam robustas, reproduzíveis e capazes de serem produzidas em larga escala, resultando no desenvolvimento de vacinas baseadas em ISCOM, que foram avaliadas em testes clínicos de fase 1 e 2 em humanos demonstrando excelentes resultados (Sjölander et al., 2001).

Um estudo recente avaliou a segurança e tolerabilidade da QS-21 e os adjuvantes a base de saponina melhorados (ISCOM, ISCOMATRIX e Matrix -M™) a partir de testes de vacinas em humanos, e demonstrou segurança, com efeitos colaterais observados apenas em pacientes vacinados com formulações com QS-21 (Bigaeva et al., 2016).

Em resumo, a tecnologia baseada em adjuvantes ISCOM tem todas as características ideais para o desenvolvimento de novas vacinas profiláticas e terapêuticas eficazes para uso em humanos (Sjölander et al., 2001; Sanders et al., 2005).

1.1.8. Combinações de adjuvantes

Os adjuvantes podem modular a resposta imune e, além disso, os podem alvejar os antígenos às APCs, aumentando a absorção e o processamento antígeno ou prolongando a disponibilidade do antígeno para as APCs (Janeway & Medzhitov, 2002; Pulendran & Ahmed; 2006).

É importante salientar que até alguns adjuvantes experimentais promissores têm as suas próprias limitações. A tentativa de combinar diferentes adjuvantes é uma estratégia para tentar minimizar ou até mesmo

acabar com essas limitações. Na verdade, acredita-se que as combinações adjuvantes podem atuar de maneira complementar ou mesmo sinérgica (Garçon et al., 2007; Mutwiri et al., 2011). Esta abordagem pode ser benéfica para melhorar um grande número de vacinas. Por exemplo, a adição de um agonista de TLR para uma vacina contendo $\text{Al}(\text{OH})_3$ pode melhorar significativamente a sua eficácia.

Combinações adjuvantes podem proporcionar uma maior estimulação de resposta imune induzida, ao mesmo tempo que podem aumentar os efeitos secundários indesejáveis. Deste modo, devem passar por avaliações de segurança mais rigorosas (Mutwiri et al., 2011).

Extensos estudos pré-clínicos têm demonstrado que os agonistas de TLR são potentes adjuvantes vacinais. No entanto, por algum motivo, um único adjuvante pode não ser suficiente para estimular uma resposta imune protetora. Por esta razão, várias combinações de agonistas TLR com outras classes de adjuvantes têm sido testados em estudos pré-clínicos e clínicos. Alguns exemplos de vacinas com combinações de adjuvantes que foram testadas são formulações associando o $\text{Al}(\text{OH})_3$ ao MLP, esta combinação foi denominada AS04 (Sistema adjuvante 04). O AS04 é licenciado para uso em vacinas para HPV (Papiloma Vírus Humano) e HBV (Vírus da Hepatite C) (Mastelic et al., 2004). Quando combinado com $\text{Al}(\text{OH})_3$, o MPL (monofosfatolípídeo) ainda mantém a sua capacidade de interagir com TLR4 e ativar respostas imune inata. Isto conduz à ativação do NF- κ B e à produção transiente de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α e IFN- γ) e quimiocinas, tais como, CCL2 e CCL3 no local da injeção (Didierlaurent et al., 2009). Formulações com este sistema adjuvante foram testadas em camundongos e em humanos, com antígenos de HPV, HBsAg (antígeno de superfície do vírus da Hepatite B) e HSV-2 (Vírus do herpes simplex 2), demonstrando efeito no aumento dos títulos de anticorpos, aumento de memória e aumento da duração da resposta imune (Giannini et al., 2006; Didierlaurent et al., 2009). Outra combinação bem-sucedida foi o AS01 (Sistema Adjuvante 01) que consiste em uma formulação lipossomal composta pelos imunoestimuladores MPL e QS-21 (MPL e QS-21+ uma suspensão lipossomal). Quando testado em primatas não-humanos, RTS,S/AS01 promoveu maiores títulos de anticorpos antígeno-

específicos e de IFN- γ , com uma resposta do tipo Th1 mais intensa do que com as demais formulações testadas anteriormente (Stewart et al, 2007).

O AS02 (Sistema Adjuvante 02) é uma combinação de emulsão óleo-em-água com MPL e QS-21, forte indutor de anticorpos antígeno-específico, respostas mediadas por células e as respostas CTL, gerando memória imunológica em primatas-não humanos (Newman et al., 1992; Newman et al., 1997; Newman et al., 1992b). Redução em 37% da infecção da malária em ensaios clínicos usando o antígeno RTS,S de *Plasmodium falciparum* foi observada com a utilização deste adjuvante (Alonso et al., 2004).

Uma vez que as emulsões água-em-óleo foram também capazes de causar reações imunológicas em seres humanos, a GlaxoSmithKline (GSK) desenvolveu o AS03 (Sistema Adjuvante 03), uma emulsão de óleo-em-água que consiste em DL- α -tocoferol, esqualeno e polisorbato 80. Estas emulsões são mais seguras, sendo o MF59 uma dessas emulsões. Este adjuvante já é aprovado para uso humano em países europeus e consiste em um esqualeno, polissorbato 80 e Span 85 (Mastelic et al., 2010). O AS03 se diferencia pela presença de α -tocoferol, um óleo biodegradável e imunoestimulante, que é uma forma de vitamina, facilmente absorvida no corpo humano (Morel et al., 2011), além disso, essas emulsões são menos reatogênicas e têm melhores perfis de segurança. Estudos clínicos têm mostrado que o adjuvante formulado com o fragmento do vírus A(H1N1)pdm09 e H5N1 de vacina contra influenza é altamente imunogênico e seguro (Vaughn et al., 2014).

Outros exemplos de associações bem sucedidas são as associações de o Al(OH)₃ ao CpG ODN que foram testadas com o antígeno recombinante de superfície de Hepatite B (HBsAg) em camundongos ocasionando aumento nos títulos de anticorpos (Davis et al., 1998). Da mesma maneira, as vacinas de Al(OH)₃ e MPL ocasionaram aumento de anticorpos neutralizantes, além do aumento de memória e de duração da resposta imune quando formuladas com antígeno de HPV e administradas em primatas não-humanos e em humanos (Giannini et al., 2006; Didierlaurent et al., 2009). Além destas, combinações vacinais de Al(OH)₃ e MDP contra *Helicobacter pylori*, possibilitaram o aumento da resposta do tipo Th1 com aumentos das citocinas IL-2 e IFN- γ (Moschos et al., 2006). Foi relatado ainda que formulações com CpG e MF59 em camundongos possibilitaram o aumento de IgG2a e de IFN- γ contra o vírus da

Influenza (Wack et al., 2008). Não obstante, vacinas com combinações de MDP (muramildipeptídeo) com quitosan e MDP com lipossomo, com antígenos para *H. pylori* urease e HBsAg, respectivamente, geraram um aumento nas concentrações de IFN- γ em camundongos (Moschos et al., 2005; Jain et al., 2009). Do mesmo modo, CpG quando associado a HDP (*host defence peptides*) com ovalbumina e antígeno de influenza, desencadeou o aumento dos títulos de IgG2a e dos níveis de IFN- γ (Riedl et al., 2008). Outro relato de aumento de resposta foi o de que lipossomos combinados com o MPL e QS-21 em formulações vacinais contra Malária (CSP – Proteína Circumsporozoito) foram responsáveis pelo aumento nos títulos de anticorpos, aumento da imunidade mediada por células e aumento de proteção de camundongos, primatas não humanos e em humanos (Garçon et al., 2007).

No nosso trabalho avaliamos a combinação do adjuvante imunoestimulatório, Flagelina - agonista de TLR-5, com o adjuvante carreador Al(OH)₃. Estudos recentes demonstraram que essa formulação vacinal foi capaz de proteger hamsters em desafios, além de reduzir a colonização renal de leptospiros nestes animais, quando associados com a proteína rLigANI (Monaris et al., 2015).

Dados clínicos têm destacado a importância de adjuvantes para as vacinas de subunidades eficazes. É previsível que novas combinações de adjuvantes já existentes com novas classes de adjuvantes alvejando alvos moleculares emergentes possam aperfeiçoar a eficácia de novas vacinas preventivas contra doenças infecciosas (Mbow et al., 2010).

1.2. JUSTIFICATIVA

A leptospirose, uma zoonose causada pela espiroqueta do gênero *Leptospira sp.*, tem sido reconhecida como um importante problema de saúde pública no mundo inteiro (Adler & de la Peña-Moctezuma, 2010).

O gênero *Leptospira* inclui espécies saprofiticas e patogênicas (Ko et al., 2009; Evangelista & Coburn, 2010). A classificação das espécies, atualmente baseia-se na relação genética e indica a existência de pelo menos 19 espécies de leptospira, sendo 14 patogênicas e 6 saprofiticas (Evangelista & Coburn, 2010). As espécies reconhecidas atualmente estão categorizadas em 24 sorogrupos e mais de 300 sorovares, considerando para a classificação a heterogeneidade estrutural do carboidrato do lipopolissacarídeo (LPS) (Evangelista & Coburn, 2010).

As leptospiras estabelecem uma colonização crônica nos túbulos renais do hospedeiro e persistem por semanas a meses no ambiente após sua excreção (Trevejo, 1998), sendo esse o principal veículo de transmissão da doença (McBride et al., 2005).

A necessidade crítica de novas estratégias de intervenção é uma prioridade em saúde pública, a fim de prevenir desfechos graves da doença. O principal impacto da leptospirose sobre a saúde pública reflete-se no alto custo do tratamento, além da letalidade, da ordem de 5 a 20% (Adler & de la Peña-Moctezuma, 2010).

Vários problemas confrontam o desenvolvimento de uma vacina para prevenir a leptospirose. As vacinas baseadas na célula inteira inativada (bacterinas) estimulam imunidade restrita e pouco duradoura (6 a 12 meses), sendo pouco imunogênicas e produzindo proteção sorovar-específica, uma vez que a resposta imune desencadeada é contra o lipopolissacarídeo (LPS) e, portanto, restrita a sorovares antigenicamente relacionados (Petersen et al., 2001; Bharti et al., 2003). Além disso, vale mencionar que até os dias atuais, os mecanismos protetores envolvidos na infecção humana por leptospira permanecem pouco conhecidos, dificultando o desenvolvimento de vacinas contra a doença.

As vacinas de subunidade oferecem uma série de vantagens: (a) menor risco de reações adversas associadas ao Lipopolissacarídeo (LPS) devido ao

uso de proteínas definidas; (b) indução de resposta imune de longa duração devido a determinantes proteicos; e (c) possibilidade de uma vacina baseada em proteínas conservadas entre diferentes sorovares patogênicos, sendo então uma grande aposta contra doenças infecciosas (Haake et al, 1993). As proteínas de *leptospira* do tipo Imunoglobulina (Ligs) são proteínas de membrana externa presentes em todos os sorovares de leptospiros patogênicos, cuja expressão ocorre somente durante a infecção (Matsunaga et al. 2003; Koizumi & Watanabe, 2004), sendo, portanto, candidatas vacinais em potencial.

Em 2006 e 2007, o nosso grupo inicialmente demonstrou que um único fragmento LigA 625-1224aa (LigANI), o qual corresponde aos seis domínios carboxi-terminais da molécula LigA, conferiu imunoproteção contra mortalidade (90-100%) em hamsters que foram desafiados com dose letal (Silva et al., 2007; Medeiros et al., 2006). Outros dados do nosso grupo demonstraram que a imunização com fragmentos de proteína recombinante LigANI formulada com o adjuvante Hidróxido de Alumínio [Al(OH)₃], conferiu 90-100% de proteção contra desafio letal quando administrada por via intramuscular e subcutânea com 20 µg de proteína. Contudo, a preparação não foi capaz de conferir imunidade estéril (Medeiros et al., 2006; Medeiros et al., 2005).

Adjuvantes são substâncias capazes de intensificar a resposta imune, contribuindo para o desencadeamento de uma imunidade precoce, duradoura e específica contra o antígeno. De modo a conferir maior biossegurança às vacinas, a comunidade científica vem pesquisando novos adjuvantes, inclusive com o intuito de reduzir a concentração de antígeno empregada, número de doses e aumentar a termoestabilidade das formulações na cadeia de estocagem e transporte. Estas características estão ligadas a aspectos econômicos do produto e, também a uma maior aceitação da vacina (Awate et al., 2013; Apostólico et al., 2016).

Neste trabalho foram avaliados os adjuvantes Hidróxido de Alumínio (Al(OH)₃), Flagelina (FliC), Ca₃(PO₄)₂ (baseado em nanopartículas de fosfato de cálcio), e ISCOM (complexo imunoestimulatório baseado em saponina) em formulações vacinais empregando a proteína recombinante LigANI como antígeno para caracterização da resposta imune induzida em camundongos. O Al(OH)₃ é amplamente empregado como adjuvante em vacinas, induzindo uma

boa resposta de células T *helper* 2 (Th2) e intensa produção de anticorpos. Entretanto, a fraca estimulação de resposta células T *helper* 1 (Th1) limita seu uso contra diversos patógenos. A Flagelina, por sua vez, é um agonista para receptores “*Toll-Like*” 5 (TLR5) e é explorada como adjuvante em estudos pré-clínicos e clínicos em formulações vacinais para diversos patógenos (Huleatt et al., 2007; Mbow et al., 2010; Skountzou et al., 2010; Steinhagen et al., 2011; Coffman et al., 2010). Do mesmo modo, o ISCOM demonstrou ser capaz de gerar respostas tipo Th1 e Th2, induzir produção de anticorpos de todas as classes e subclasses e respostas de linfócitos T citotóxicos (CTL) (Martina et al.; Miyamoto et al., 2003). O $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, por sua vez é capaz de induzir resposta Th1 com níveis mais elevados de Imunoglobulina G (IgG) e IgG2a que o Hidróxido de Alumínio (Qing et al, 2000).

Desta maneira, um estudo comparativo detalhado sobre as variadas respostas imunes, desencadeadas por diversas formulações com estes diferentes adjuvantes foi realizado com o objetivo de definir uma formulação vacinal com menor concentração de antígeno para ser empregada em ensaio de proteção utilizando hamsters, como modelo experimental, visando à indução de proteção estéril contra o desafio com leptospiros patogênicas. Além disso, o estudo teve como objetivo explorar o potencial destes adjuvantes, quando associados ao antígeno de origem microbiana, proteína rLigANI, agregando ainda mais conhecimento à área de adjuvantes e de vacinais de subunidade contra leptospirose.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar e caracterizar a resposta imune induzida em camundongos pelos diferentes adjuvantes formulados com a proteína recombinante LigA 625-1224aa (rLigANI), com objetivo de selecionar o melhor esquema vacinal (formulação, número de doses ideal e a menor concentração de antígeno por dose).

2.2. Objetivos Específicos

- Purificar a proteína recombinante LigANI;
- Formular as vacinas experimentais com os adjuvantes: Hidróxido de Alumínio [Al(OH)₃], Flagelina, Nanopartículas de Fosfato de Cálcio [Ca₃(PO₄)₂] e ISCOM;
- Caracterizar a resposta imune induzida por cada adjuvante;
- Estudar a resposta imune produzida pelas diferentes formulações vacinais com duas diferentes concentrações de LigANI.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Purificação da rLigANI por Cromatografia de Afinidade por Íons Metálicos (IMAC)

Para expressão da proteína recombinante LigA 625-1224aa (rLigANI) em *Escherichia coli* (*E. coli*) foi realizado o crescimento de biomassa a partir da construção pET100/LigA 625-1224aa, estocado no Laboratório de Tecnologia Recombinante de Bio-Manguinhos – Fiocruz (LATER). O crescimento da biomassa foi realizado a 37°C até atingir a densidade ótica de 0.8, para indução da expressão da construção BL21 Star(DE3) pET100/LigA 625-1224aa com Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a 28°C, por quatro horas, em Biorreator de volume 2 litros (*Newbruswick*). O cultivo celular obtido foi lisado por sonicação e a proteína rLigANI expressa foi purificada por IMAC usando colunas modelo Histrap HP (GE Healthcare) através do equipamento AKTA Purifier 10 (GE Healthcare) de acordo com as recomendações do fabricante. A proteína recombinante purificada foi então dessalinizada com coluna HisTrap Desalting (GE Healthcare), a concentração da rLigANI foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA), utilizando o *kit* Pierce[®] BCA Protein Assay (Thermo Scientific), Em seguida, o lipopolissacarídeo (LPS) inicial da amostra foi removido com kit comercial Pierce High Capacity Endotoxin Removal Resin e em seguida, foi quantificado utilizando kit comercial Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (Endosafe[®]- Portable Test System, Charles River Laboratories). A proteína recombinante foi novamente quantificada pelo método de BCA (Pierce – Thermo Scientific) e avaliada por SDS-PAGE 12,5%, para observação da homogeneidade e então armazenada - 80° C, até o momento do uso, em formulações com os diferentes adjuvantes.

3.2. Preparo das formulações vacinais

Para o preparo das formulações foram utilizados 0,2 mg de Hidróxido de Alumínio – $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Para Alhydrogel, Brenntag Biosector, 216145-51-2) de acordo com protocolos já estabelecidos (Medeiros et al., 2005; Medeiros et al., 2006). Para formulação com ISCOM, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e Flagelina C (Braga et al., 2010) foram utilizados 12 μg , 50 μg e 5 μg de adjuvante, respectivamente, conforme indicação dos fabricantes. As formulações foram avaliadas em ensaio de imunogenicidade com as concentrações de 3 μg e 30 μg da proteína recombinante LigANI em PBS (pH 7,4), por dose. Em seguida, o material foi estocado a 4° C.

Camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com 6 semanas de idade, foram utilizados para o ensaio de imunogenicidade. Grupos contendo 6 animais (n= 6) foram imunizados com 3 μg ou 30 μg da rLigANI combinada a 4 adjuvantes distintos - Hidróxido de Alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$; Alhydrogel[®], Brenntag), adjuvante ISCOM a base de saponina, adjuvante baseado em nanopartículas de fosfato de cálcio [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$], Flagelina - e adjuvantes $\text{Al}(\text{OH})_3$ e Flagelina combinados.

Com o intuito de facilitar o entendimento de dose e composição de cada uma das formulações vacinais administradas, segue a descrição: (i) 3 μg da rLigANI adsorvida em 0,2 mg de Hidróxido de Alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$), (ii) 30 μg da rLigANI adsorvida em 0,2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$, (iii) 0,2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$, (iv) 3 μg da rLigANI combinada a 12 μg de ISCOM, (v) 30 μg da rLigANI combinada a 12 μg de ISCOM, (vi) 12 μg de ISCOM, (vii) 3 μg da rLigANI adsorvida em 50 μg de adjuvante $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (viii) 30 μg da rLigANI adsorvida em 50 μg de adjuvante $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (ix) 50 μg de adjuvante $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (x) 3 μg da rLigANI combinada com 5 μg de Flagelina, (xi) 30 μg da rLigANI combinada com 5 μg de Flagelina, (xii) 5 μg de Flagelina, (xiii) 3 μg da rLigANI adsorvida em 0,2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ combinada com 5 μg de Flagelina, (xiv) 30 μg da rLigANI adsorvida em 0,2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ combinada com 5 μg de Flagelina, (xv) 0,2 mg $\text{Al}(\text{OH})_3$ combinada com 5 μg de Flagelina e (xvi) 30 μg da rLigANI. Estas formulações estão descritas resumidamente na tabela 1.

Tabela 1. Formulações e doses administradas.

	rLigANI (3 µg)	rLigANI (30 µg)	PBS 1x
<i>ISCOM</i>	12 µg	12 µg	12 µg
<i>Flagelina</i>	5 µg	5 µg	5 µg
<i>Flagelina + Al(OH)₃</i>	5 µg + 0,2 mg	5 µg + 0,2 mg	5 µg + 0,2 mg
<i>Al(OH)₃</i>	0,2 mg	0,2 mg	0,2 mg
<i>Ca₃(PO₄)₂</i>	50 µg	50 µg	50 µg

3.3. Produção de soro padrão hiperimune

Para a obtenção de uma quantidade de soro suficiente para a realização das curvas padrões dos ensaios de ELISA, foi realizado um protocolo para a produção de soro hiperimune. Foram utilizados 30 camundongos Balb/C fêmeas (n= 30) com 6 semanas de idade de acordo com o projeto aprovado no Comitê de Ética Animal da Fiocruz (CEUA LW-18/13). Estes animais foram imunizados com três doses de 30 µg de proteína rLigANI adsorvida em 0,2 mg Al(OH)₃ (100µL/dose) administradas por via intramuscular com intervalos de 7 dias entre as doses. Após 30 dias de experimentação foi realizada a punção cardíaca e eutanásia dos animais.

Os tubos contendo o sangue dos camundongos foram centrifugados por 10 minutos a 2000 *rpm* e os soros obtidos foram armazenados a -20°C. Destaca-se que todas as etapas envolvendo o manejo de animais foram realizadas no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) de Bio-Manguinhos - FIOCRUZ, por profissionais treinados.

3.4. Imunização e sangria dos camundongos

Foram utilizados camundongos Balb/C fêmeas com 6 semanas de idade de acordo com o projeto aprovado no Comitê de Ética Animal da Fiocruz (CEUA LW-18/13). Grupos de 6 animais foram imunizados inicialmente com duas doses administradas com 14 dias de intervalo, via intramuscular, com as formulações descritas acima (100 μ L/dose). Como controles, foram utilizados um grupo inoculado com cada um dos adjuvantes na ausência de antígeno, um grupo inoculado com 30 μ g de proteína rLigANI na ausência de adjuvantes e um grupo inoculado apenas com PBS (Solução tampão fosfato de sódio). Amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo venoso retro-ocular nos dias 0, 14, 29, 59, 89 e ao final da experimentação (119 pós-vacinação) foi realizada a punção cardíaca com eutanásia e coleta do baço.

Os tubos contendo o sangue dos camundongos foram centrifugados por 10 minutos a 2000 *rpm* e os soros obtidos foram armazenados a -20°C. Destaca-se que todas as etapas envolvendo o manejo de animais foram realizadas no Laboratório de Experimentação Animal (LAEAN) de Bio-Manguinhos - FIOCRUZ, por profissionais treinados.



Figura 1. Esquema de imunização dos modelos murinos (camundongos).

Dia 0 - Coleta de sangue (pré-imune); dia 1 - Primeira imunização; dia 14 - Segunda sangria; dia 15 - Segunda imunização; dia 29 - terceira sangria; dia 59 - quarta sangria; dia 89 - quinta sangria; dia 119 - punção cardíaca e coleta do baço.

3.5. Determinação dos títulos de imunoglobulina G (IgG) anti-rLigANI

Placas de 96 poços (MaxiSorp[®], Nunc) foram sensibilizadas com 100 ng de rLigANI por cavidade. Para isso, a proteína foi diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) até a Concentração final (C_f) de 1 ng/μL e 100 μL foram aplicados em cada cavidade. As placas foram incubadas durante 18 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram submetidas a 4 ciclos de lavagem com PBS + Tween 20 0,05% (PBS-T). Em seguida, as placas foram bloqueadas com 300 μL de tampão de bloqueio (SFB 5% / BSA 0,1% / leite desnatado 5% em PBS-T) por 2 horas a 37°C. A solução de bloqueio foi removida e 4 ciclos de lavagem foram realizados.

Para a determinação dos títulos de IgG, os soros das sangrias de cada grupo foram avaliados individualmente. O soro padrão, que foi obtido de acordo com o descrito no item 3.3, na diluição de 1:2000, foi adicionado às placas e diluições seriadas na base 2 foram realizadas. Os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais foram diluídos da mesma forma, contudo, partindo da diluição inicial de 1:100. Os soros diluídos foram adicionados à placa e incubados por 1 hora a 37°C. Após a incubação, as amostras foram removidas e, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T. Em seguida, adicionou-se 100 μL do anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluição de 1:30.000, Sigma-Aldrich) e, prosseguiu-se com incubação a 37°C por 1 hora. As placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T e, por fim, foi adicionado 100 μL da solução de TMB. As placas foram mantidas sob ausência de luz por 15 minutos e a reação colorimétrica foi interrompida com 50 μL de solução 2 N de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o leitor para placas de ELISA (Sunrise, Tecan). O título de anticorpos foi expresso em Unidades de ELISA por mililitro (UE/mL) obtidos por meio do parâmetro logístico-4 com a utilização do programa SoftMax-Pro, o soro padrão foi utilizado com uma diluição conhecida e as UE/mL foram definidas arbitrariamente, todos os demais soros analisados foram definidos a partir dos valores de UE/mL do soro padrão.

3.6. Análise das subclasses de imunoglobulina G (IgG) anti-LigANI

Os procedimentos para a análise das subclasses de IgG foram seguidos conforme descrito para a titulação de IgG total (item 3.5), mas com alteração do anticorpo secundário. Para a detecção de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foram utilizados os anticorpos listados a seguir: anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3 de camundongo conjugado com peroxidase. Todos os conjugados foram adquiridos da empresa Santa Cruz Biotechnology e, utilizados na diluição 1:12000.

3.7. Determinação do índice de avidéz (IA) dos anticorpos anti-LigANI

A avidéz dos anticorpos anti-rLigANI foi analisada por ELISA *in house*. Os procedimentos para a sensibilização e o bloqueio das placas de 96 cavidades (MaxiSorp[®], Nunc) foram realizados conforme previamente descrito (item 3.4). Após essas etapas, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C com o soro padrão e os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais descritas no item 3.2. O soro padrão, na diluição de 1:2000, foi adicionado às placas e diluições seriadas na base 2 foram realizadas. Os soros dos camundongos imunizados com as formulações vacinais foram diluídos da mesma forma, contudo, primeiramente diluídos 1:100 e após partindo de diluições iniciais diferentes, de acordo com a D.O (densidade óptica) obtida, ou seja, quanto maior a D.O.obtida com cada uma das formulações, maior foi a diluição inicial utilizada, a fim de evitar o efeito *platô* na curva de titulação de anticorpos. Após o tempo de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com tampão PBS-T. Em seguida, as amostras foram incubadas na presença e na ausência de ureia 3 M (agente caotrópico), por 15 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas e incubadas a 37°C por 1 hora com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (diluição 1:30.000, Sigma-Aldrich). Os procedimentos para revelação e leitura das placas foram conduzidos conforme descrito no item 3.4. O programa SoftMaxPro foi empregado para calcular a concentração dos soros nas condições utilizadas, com e sem ureia. O índice de avidéz (IA) foi calculado a partir da fórmula descrita abaixo:

$$\text{Índice de Avidéz (IA)} = \left(\frac{[\text{soro com ureia 3M}]}{[\text{soro sem ureia 3M}]} \right) \times 100$$

Ressalta-se que o soro hiperimune anti-LigANI, produzido em camundongos (item 3.3), também foi utilizado como soro padrão neste ensaio. A faixa de aceitação para o IA desse soro foi de 29% a 31% de dissociação dos anticorpos anti-LigANI do soro hiperimune padrão e, a dissociação foi padronizada em 30% do soro hiperimune padrão. Testes com valores fora da faixa de aceitação para o soro padrão não foram considerados.

3.8. Análise da resposta celular induzida pelas formulações vacinais

3.8.1. Ensaio de ELISPOT

Para a avaliação de resposta imune celular, os camundongos foram anestesiados e eutanasiados 120 dias após a primeira dose e os baços coletados assepticamente como descrito no protocolo CEUA LW-18/13. Após a coleta, os órgãos foram macerados e as hemácias foram lisadas com solução de lise comercial (BD Pharmingen). As células foram quantificadas, com verificação da viabilidade celular, com a utilização do corante Azul de Tripan, no contador automatizado Cell Counter (Invitrogen) e, logo após, ressuspensas em meio RPMI (Invitrogen) completo (contendo 1% HEPES 1M, 2 mM L-Glutamina, 5 μ M β -mercaptoetanol, 1 mM de piruvato de sódio, 1% de solução de aminoácidos não essenciais, 1% (V/V) de vitamina e 10 % SFB, Invitrogen).

Foram utilizados kits comerciais para detecção de IFN- γ , IL-4, IL-2 e IL-17, com placas pré-sensibilizadas (Mabtech), de acordo com a recomendação do fabricante. Antes da coleta dos órgãos, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS e, então, foram incubadas com 200 μ L/poço de RPMI + 10% SFB à 37°C por, no mínimo, 30 minutos.

Os esplenócitos de cada camundongo foram recuperados como descrito acima e submetidos à cultura individualmente. Foram plaqueadas 2×10^5 células/poço em placas previamente preparadas na presença de: (1) Proteína recombinante LigANI, (2) de Concanavalina A e (3) na ausência de qualquer estímulo por 48 h à 37°C em estufa com atmosfera de 5% CO₂. Após a incubação, as placas foram lavadas 5 vezes com PBS e incubadas com

anticorpo anti-IFN- γ , IL-4, IL-2 e IL-17 biotinizados por 2 horas à temperatura ambiente (TA). Após nova etapa de lavagem, as placas foram incubadas com Estreptavidina HRP por 1 hora à TA. A incubação foi seguida de lavagem e, a revelação foi realizada utilizando-se o substrato NBT/BCIP fornecido no kit. Após lavagem em água corrente, as placas secaram à TA e os clones produtores de IFN- γ , IL-4, IL-2 e IL-17, contabilizados com o auxílio do equipamento Immunospot (AMBRIEX, Cellular Technology). A realização do ensaio e a análise dos resultados foram realizadas com a colaboração do grupo do Laboratório de Tecnologia Imunológica de Bio-Manguinhos - FIOCRUZ.

3.9. Análise estatística

O teste Mann Whitney foi empregado para análise da significância entre duas formulações ao mesmo tempo a partir dos dados dos ensaios de ELISA. Para a comparação da significância entre os diferentes adjuvantes foi utilizado o teste Kruskal-wallis com pos-teste Dunn para cada um dos tempos estudados. Os dados foram apresentados por média e desvio padrão obtidos com 6 animais avaliados individualmente (n=6), sendo 3 animais (n=3) de cada um dos 2 experimentos independentes. Para os ensaios de ELISPOT, a análise estatística foi realizada pelo teste Kruskal-Wallis com pos-teste Dunn. Os dados obtidos foram também apresentados através da média e desvio padrão. Para todos os testes, $p < 0.05$ foi considerado significativo. As análises foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.03 (GraphPad, Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. Purificação da Proteína Recombinante LigANI e avaliação da homogeneidade

A proteína recombinante LigA 625-1224aa (LigANI) corresponde aos 6 domínios carboxiterminais da molécula LigA (Silva, 2007), conforme supracitado.

Esta proteína foi expressa e purificada a partir de clone *E.coli* BL21(DE3) Star pET100/ LigA 625-1224aa, estocado no nosso laboratório. Na figura 2 é mostrado um gel de poliacrilamida, no qual a proteína recombinante apresentou o tamanho esperado de aproximadamente 70 kDa. A proteína recombinante foi obtida com homogeneidade acima de 90%, a partir de análise por densitometria. O lote purificado foi identificado e o LPS foi retirado.

Todos os experimentos foram realizados utilizando este mesmo lote de proteína recombinante purificada. A concentração da proteína recombinante LigANI purificada foi de 3,3 mg/ mL.

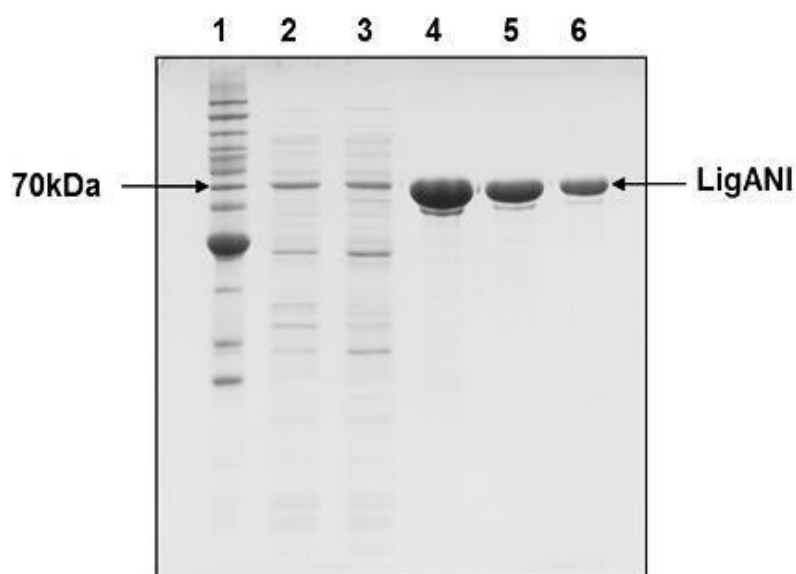


Figura 2. Proteína recombinante LigANI.

A figura mostra o gel SDS PAGE corado com Comassie Blue das amostras da purificação da proteína recombinante LigANI. 1- Marcador de peso molecular (Bench marker – Invitrogen). 2- Extrato Total. 3- Fração Solúvel. 4- Proteína LigANI diluída $\frac{1}{2}$. 5- Proteína LigANI diluída $\frac{1}{4}$. 6- Proteína LigANI diluída $\frac{1}{8}$.

4.2. ELISA para avaliação da resposta de anticorpos

4.2.1. ELISA IgG Total

Foram avaliados os títulos de anticorpos anti-rLigANI a partir de amostras de soro de seis camundongos Balb/C, de maneira individual, imunizados com cada uma das formulações vacinais estudadas. Os títulos de anticorpos IgG anti-rLigANI em unidades de ELISA por mL (UE/mL) e o desvio padrão da média, obtidos com as formulações em cada um dos tempos analisados são mostrados na Tabela 1. Na parte superior da tabela são mostrados os títulos obtidos com a dose de 3 µg de proteína recombinante LigANI e na parte inferior os títulos obtidos com 30 µg de proteína recombinante LigANI, quando formuladas com cada um dos adjuvantes.

Um grupo de camundongos foi imunizado com a proteína recombinante LigANI, na dose de 30µg, formulada apenas com PBS, ou seja, sem a utilização de adjuvantes. Resultados demonstraram que esta proteína sozinha é capaz de gerar resposta por anticorpos, mas com baixos títulos, não sendo capaz de mantê-los ao longo do tempo (Figura 3).

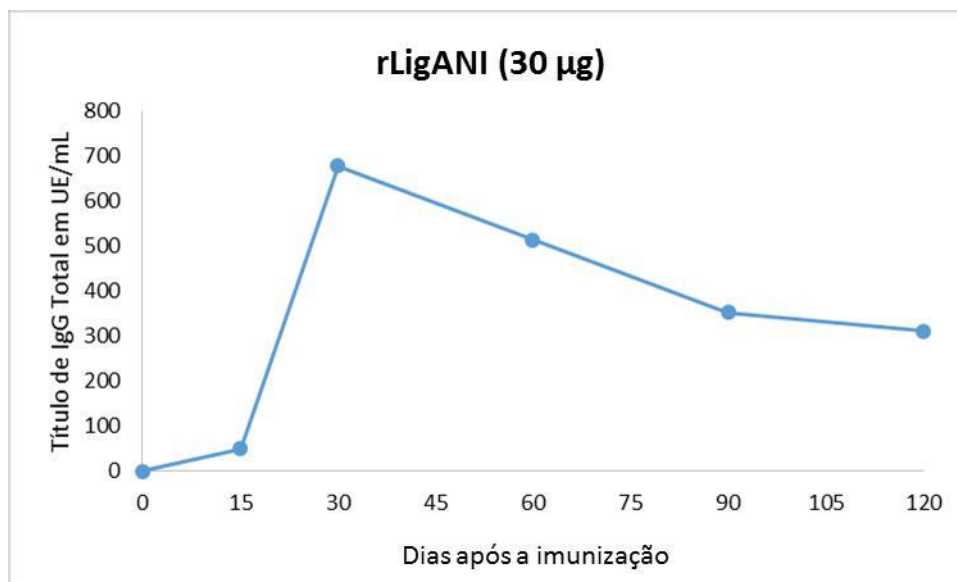


Figura 3. Títulos IgG anti-rLigANI (rLigANI sem adjuvante)

Níveis de IgG total anti-rLigANI (eixo y) obtidos com as formulações da proteína recombinante LigANI na dose de 30 µg em PBS 1x, nos tempos de 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias após imunização (eixo x).

Tabela 2. Títulos de anticorpos IgG anti-rLigANI em UE/mL.

Dias após a primeira imunização	Títulos de anticorpos IgG anti-rLigANI (UE/mL)				
	3µg rLigANI + ISCOM	3µg rLigANI + Flagelina	3µg rLigANI + Flagelina + Al(OH) ₃	3µg rLigANI +Al(OH) ₃	3µg LigANI + Ca ₃ (PO ₄) ₂
	Média ± Desvio Padrão				
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
15	791,15 ± 49,37	94,60 ± 22,91	577,28 ± 57,085	402,568 ± 89,289	75,160 ± 15,425
30	40165,62 ± 5946,53	4974,97 ± 554,25	11956,34 ± 306,65	3751,18 ± 170,013	1998,843 ± 343,443
60	31785,97 ± 9472,08	2507,352 ± 580,685	6003,12 ± 577,23	4710,95 ± 192,091	1573,980 ± 413,395
90	22041,91 ± 6131,68	2204,518 ± 545,474	2646,57 ± 1044,23	5230,543 ± 840,788	1447,110 ± 309,938
120	20438,99 ± 2626,45	3906,997 ± 1456,312	2909,82 ± 988,13	6287,499 ± 325,395	1412,627 ± 349,649
	30µg rLigANI +				
	30µg rLigANI + ISCOM	Flagelina	30µg rLigANI + Flagelina + Al(OH) ₃	30µg rLigANI + Al(OH) ₃	30 µg rLigANI + Ca ₃ (PO ₄) ₂
	Média ± Desvio Padrão				
0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
15	942,824 ± 188,401	244,156 ± 22,826	740,968 ± 230,758	343,149 ± 76,841	163,335 ± 16,679
30	36674,388 ± 7970,696	9327,020 ± 1547,976	10762,606 ± 2443,847	1792,687 ± 966,962	1356,407 ± 175,184
60	19476,434 ± 3536,220	3187,601 ± 1088,615	10395,268 ± 1655,265	1556,961 ± 956,887	686,605 ± 49,540
90	13936,765 ± 3733,005	2123,012 ± 605,586	7938,208 ± 729,551	1390,707 ± 955,061	569,465 ± 56,579
120	14689,119 ± 7580,644	2888,281 ± 1231,002	7448,293 ± 1265,150	1297,238 ± 977,244	479,446 ± 54,404

Analisando cada um dos adjuvantes separadamente, foi observado um aumento significativo nas respostas imunológicas dos camundongos para todas as formulações vacinais em todos os tempos, quando comparados ao pré-imune (tempo 0), principalmente no tempo 30 dias (que corresponde a 15 dias após a segunda imunização), onde pode ser observado um pico nos títulos de IgG total para todos os adjuvantes analisados, com exceção do adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$, cujos títulos de IgG induzida foram crescentes até o tempo de 120 dias, na formulação com 3 μg da proteína rLigANI (Fig. 4).

Foi realizada uma comparação das formulações com cada um dos adjuvantes quando formulados com 3 μg e 30 μg de proteína recombinante LigANI. Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos imunizados com formulações com o adjuvante ISCOM combinado com as duas doses da proteína recombinante (3 μg e 30 μg) em nenhum dos tempos analisados (Fig. 4A). Com o adjuvante Flagelina houve diferença significativa na intensidade da resposta entre os grupos de camundongos imunizados com as concentrações de 3 μg e 30 μg de proteína recombinante LigANI apenas no tempo de 30 dias. Após este período, os grupos que receberam as formulações com diferentes concentrações passam a ter títulos de IgG total anti-rLigANI semelhantes (Fig. 4B). Quando o adjuvante Flagelina foi formulado em associação ao $\text{Al}(\text{OH})_3$ houve diferença significativa no título de IgG Total nos tempos de 60, 90 e 120 dias, após a primeira imunização (Fig. 4C). Em contrapartida, os títulos de IgG obtidos para camundongos imunizados somente com o adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ com as duas concentrações de antígeno foram significativamente diferentes em todos os tempos estudados, exceto no tempo de 15 dias (Fig. 4D). Observa-se também que grupos formulados com a menor dose de antígeno (3 μg de rLigANI) tiveram títulos de IgG total crescentes ao longo de todo o período de experimentação. Em contrapartida, os títulos de anticorpos IgG total decresceram ao longo do período quando este adjuvante foi associado com a maior dose de proteína rLigANI (30 μg). Para o adjuvante $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ foram observadas diferenças significativas em todos os tempos analisados (Fig. 4E).

Para todos os grupos que apresentaram diferenças significativas de dose resposta, as formulações com doses menores de antígeno (3 μg de rLigANI), demonstraram a obtenção de maiores títulos de anticorpos IgG anti-

LigA, exceto para as formulações com os adjuvantes Flagelina e $\text{Al}(\text{OH})_3$ quando associados. Para este grupo, a formulação com 30 μg de rLigANI foi capaz de alcançar títulos de anticorpos significativamente maiores em comparação com a dose menor.

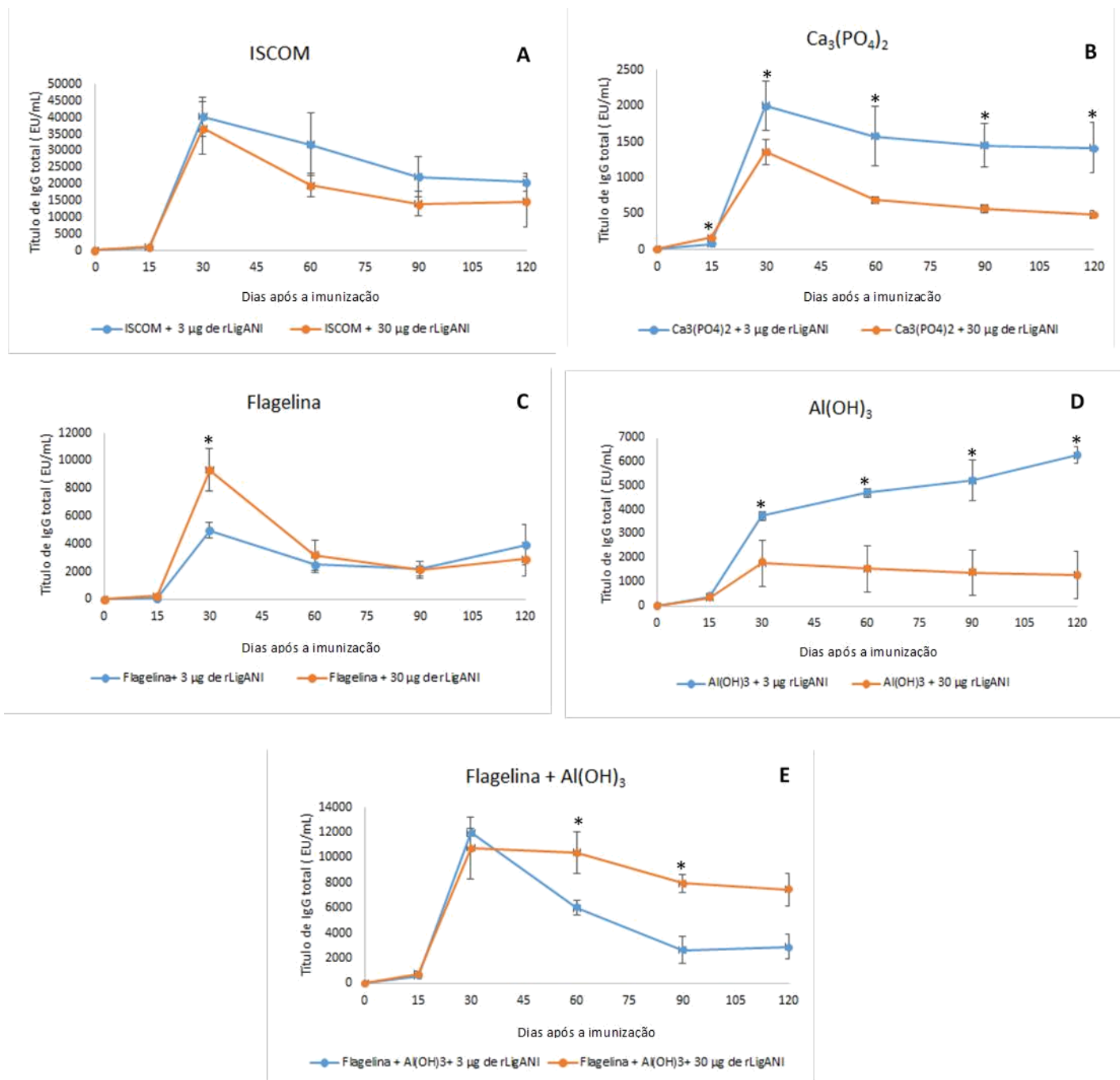


Figura 4. Comparação doses de rLigANI.

Os níveis de IgG total anti-rLigANI obtidos com as formulações da proteína recombinante LigANI nas concentrações de 3 µg (linha azul) e 30 µg (linha laranja) associadas a **A-** Adjuvante ISCOM; **B-** Adjuvante baseado em Nanopartículas de Ca₃(PO₄)₂; **C-** Adjuvante Flagelina **D-** Adjuvante Al(OH)₃; **E-** Adjuvante Flagelina combinado com o adjuvante Al(OH)₃ em diferentes tempos. A significância entre as doses em cada tempo obtida com o teste Mann Whitney foi representada com o asterisco (*).

Comparando os diferentes adjuvantes quando formulados com a mesma dose de antígeno recombinante, foi observado que a formulação com adjuvante ISCOM na dose de 3 ug de proteína rLigANI induziu títulos significativamente mais altos do que formulações com $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em todos os tempos analisados. ISCOM superou também a formulação com Flagelina, no tempo de 15 e 60 dias e a formulação com $\text{Al}(\text{OH})_3$, no tempo de 30 dias. Ainda para dose 3 ug, foram observadas diferenças significativas, aos 30 e 60 dias, entre $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e Flagelina associada a $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Fig. 5A).

Já quando formulado com 30 μg de LigA625-1224aa, foram observadas diferenças significativas entre os adjuvantes ISCOM e $\text{Al}(\text{OH})_3$ no tempo 30 dias e entre ISCOM e nanopartículas de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ em todos os tempos analisados. Também foram observadas diferenças entre $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e Flagelina combinada com $\text{Al}(\text{OH})_3$ nos tempos 60, 90 e 120 dias (Fig. 5B).

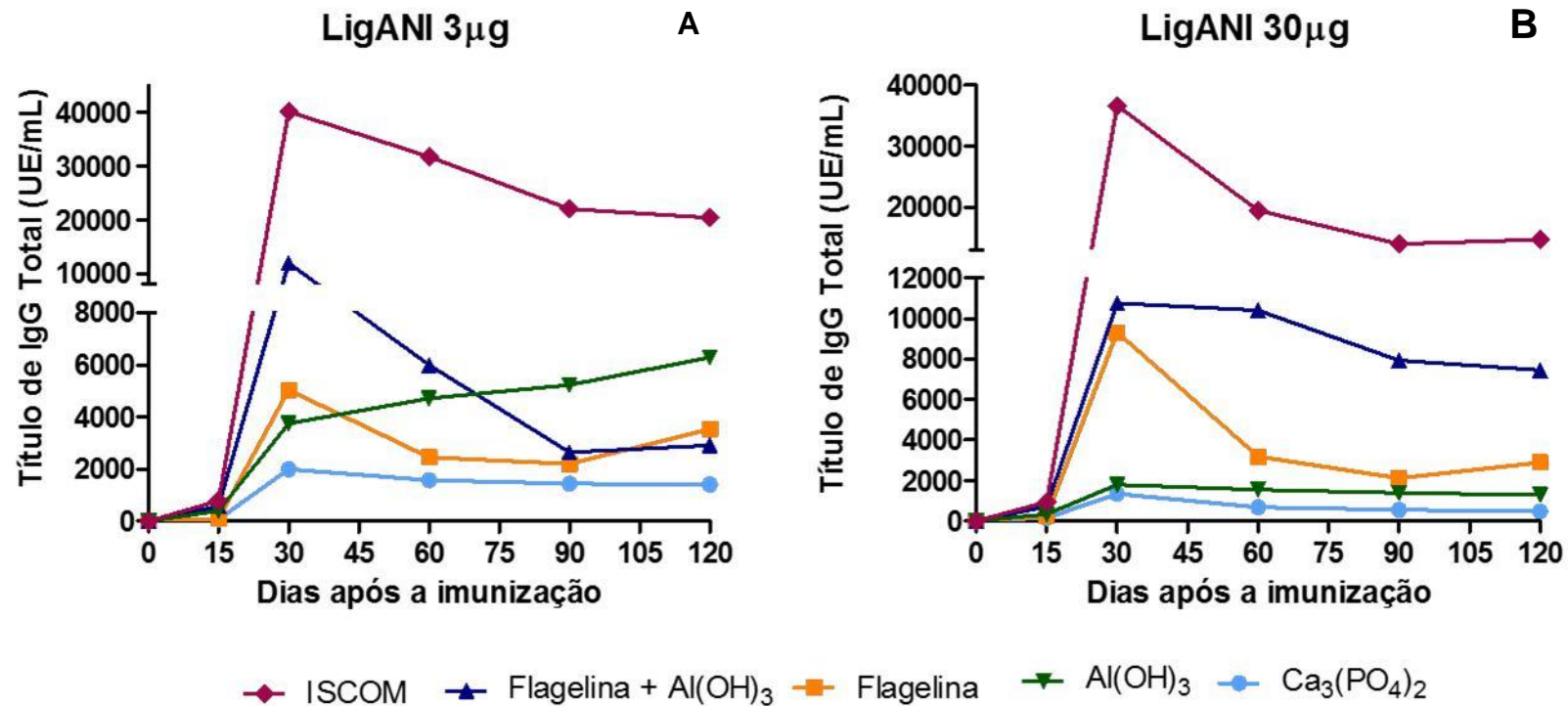


Figura 5. Comparação entre os níveis de IgG total em UE/mL obtidos com cada um dos adjuvantes.

São mostrados nos gráficos os títulos de IgG anti-rLigANI detectados em grupos imunizados com os adjuvantes ISCOM (vermelho), Flagelina em associação com Al(OH)₃ (azul escuro), Flagelina (Alaranjado), Al(OH)₃ (verde), Ca₃(PO₄)₂ (azul claro) associados com **A-** 3 µg de LigANI e **B-** 30 µg de LigANI, em todos os tempos avaliados (0,15,30,60,90 e 120 dias).

4.2.2. ELISA para avaliação da Avidéz de Anticorpos IgG com Ureia

Levando-se em consideração que o ensaio ELISA avalia a soroconversão e a intensidade da resposta imune, mas não a qualidade biológica dos anticorpos induzidos pelas formulações em estudo, ensaios adicionais foram realizados de modo a caracterizar as suas funções de avidéz. Foram avaliados os grupos imunizados com todas as formulações estudadas no tempo de 120 dias (final da experimentação).

Na tabela 2 são mostrados os valores de unidades de Elisa obtidos com as formulações de 3 μ g e 30 μ g de proteína rLigANI com os adjuvantes Flagelina, combinação de Flagelina e Al(OH)₃, ISCOM, Ca₃(PO₄)₂ e Al(OH)₃, com e sem a adição do agente caotrópico Ureia (3M) e o índice de avidéz, razão entre os valores obtidos com e sem adição e ureia, multiplicados por 100, no tempo de 120 dias de experimentação.

Todas as formulações estudadas geraram anticorpos com avidéz, considerando a tabela de índice de avidéz menor que 49% como baixo, entre 50 e 79% como médio e maior que 80% como alto (Liesenfeld et al., 2001). Os índices variaram entre 81 e 92%, dependendo da formulação, e não foram observadas diferenças significativas entre eles.

Tabela 3. Títulos de anticorpos IgG anti-rLigANI obtidos com e sem a utilização do agente caotrópico Ureia 3M e índice de avides para cada uma das formulações vacinais, no tempo de 120 dias.

	3µg de rLigANI			30µg de rLigANI		
	UE COM UREIA	UE SEM UREIA	ÍNDICE DE AVIDEZ (%)	UE COM UREIA	UE SEM UREIA	ÍNDICE DE AVIDEZ (%)
Flagelina	1289,76	1555,881	82,89	1782,46	2070,57	86,08
Flagelina + Al(OH)3	4348,56	4807,898	90,44	5192,08	5649,17	91,91
ISCOM	14216,53	17440,118	81,51	8768,12	10459,31	83,83
Ca3(PO4)2	1116,42	1281,539	87,12	477,87	551,99	86,57
Al(OH)3	2448,99	2779,79	88,09	765,01	853,04	89,68

4.2.3. ELISA para isotipos de IgG

Resultados de isotipagem demonstraram uma forte predominância de isotipo IgG1 em comparação com os isotipos IgG2a, IgG2b e IgG3 para todas as formulações estudadas (Fig. 6).

Para os grupos imunizados com formulações com os adjuvantes $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e ISCOM foram obtidas maiores concentrações de anticorpos do subtipo IgG1 seguido dos subtipos IgG3, IgG2a e IgG2b. Já para os grupos imunizados com o adjuvante Flagelina, quando formulado sozinho ou em combinação com $\text{Al}(\text{OH})_3$ a predominância foi de IgG1, seguida de IgG2b, IgG2a e por fim IgG3.

Os grupos imunizados com formulações vacinais contendo o adjuvante ISCOM e os adjuvantes Flagelina e $\text{Al}(\text{OH})_3$ associados desencadearam uma resposta mais balanceada para todos as subclasses analisados (Fig. 6E; Fig. 6F; Fig6I e Fig. 6J).

Para melhor ilustrar os resultados, na figura 7 foi apresentada a porcentagem de cada um dos subtipos do isotipo IgG analisados, para cada um dos grupos imunizados.

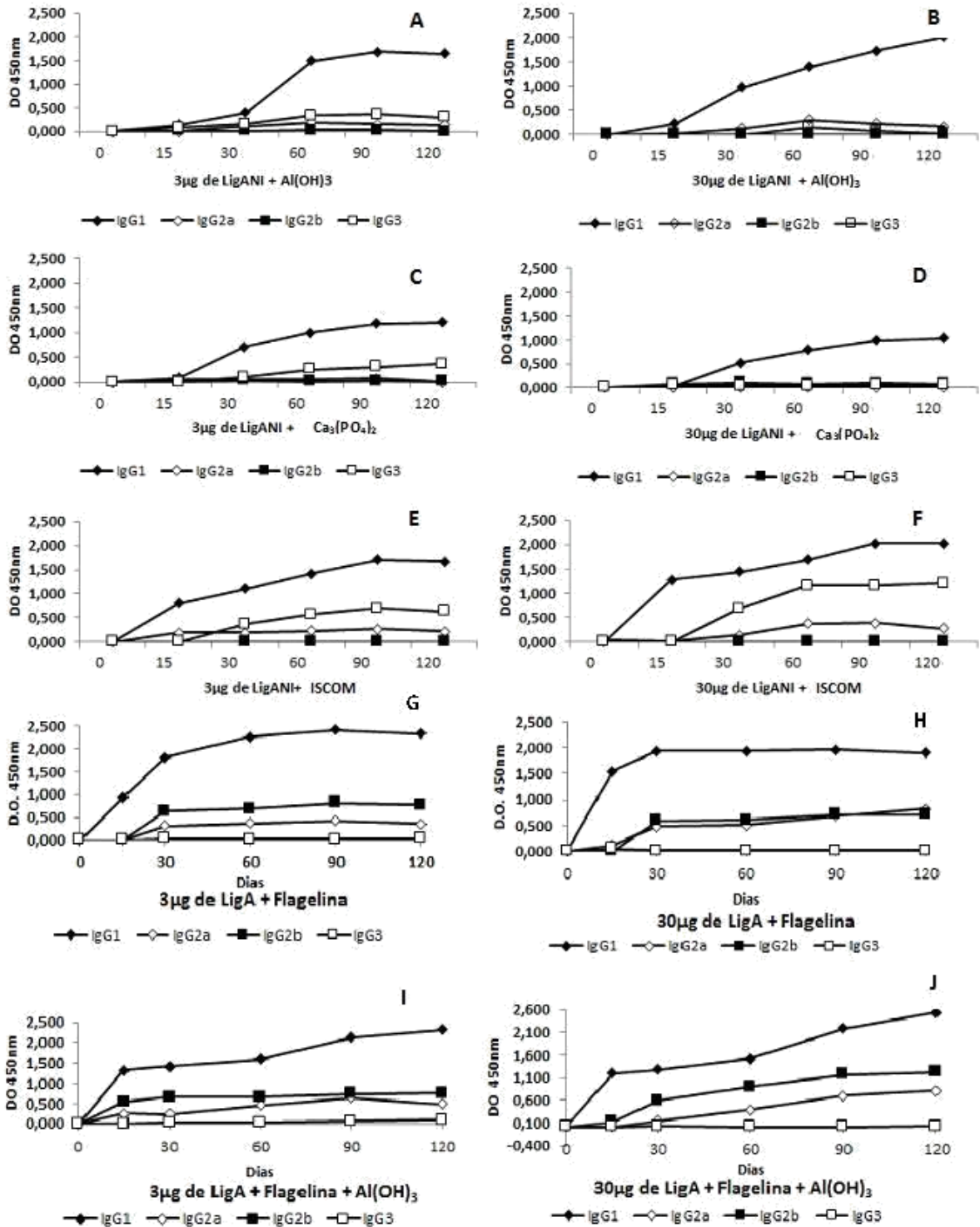


Figura 6. Subclasses do Isotipo IgG.

Comparação da eficiência dos adjuvantes formulados com **A-** 3µg de LigANI + Adjuvante Al(OH)₃; **B-**30µg de LigANI + Adjuvante Al(OH)₃; **C-** 3µg de LigANI +Adjuvante Ca₃(PO₄)₂; **D-**30µg de LigANI +Adjuvante Ca₃(PO₄)₂; **E-**3µg de LigANI + Adjuvante ISCOM; **F-** 30µg de LigANI + Adjuvante ISCOM; **G-** 3µg de LigANI + Adjuvante Flagelina; **H-**30µg de LigANI + Adjuvante Flagelina; **I-** 3µg de LigANI + Adjuvantes Flagelina e Al(OH)₃; **J-** 30µg de LigANI + Adjuvantes Flagelina e Al(OH)₃ na modulação dos isotipos de IgG. Nos gráficos são representados os valores de densidade óptica no eixo y e em cada um dos tempos, especificados o eixo x.

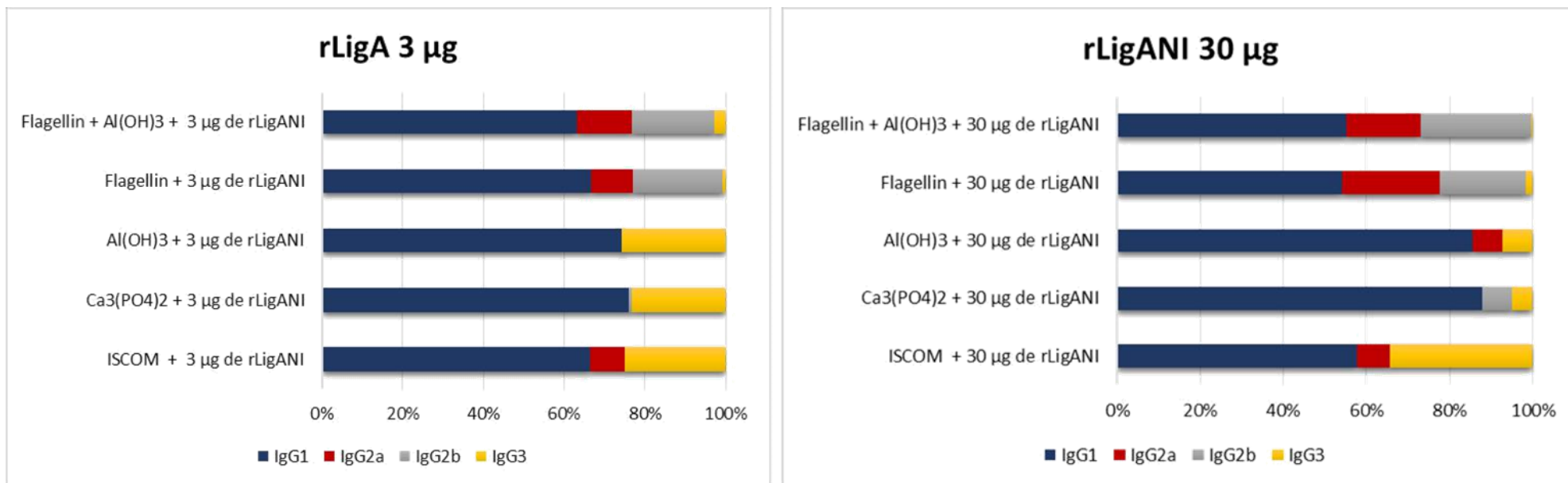


Figura 7. Distribuição do perfil de subtipos de IgG obtidos com cada uma das formulações estudadas.

Na figura é demonstrada a distribuição em porcentagem dos isotipos de IgG. IgG1 (azul), IgG2a (vermelho), IgG2b (cinza) e IgG3 (amarelo), obtidos em grupos de camundongos imunizados com cada um dos adjuvantes em estudo nas doses de A) 3 µg e B) 30 µg de proteína rLigANI.

4.3. ELISpot

Foi avaliada a presença de células produtoras das citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e de IL-17 por meio de técnica de ELISpot utilizando células do baço dos camundongos imunizados com cada uma das formulações vacinais em comparação com formulações apenas com PBS 1x e com os seus respectivos controles, ou seja, formulações contendo apenas adjuvante, sem o antígeno recombinante rLigANI. Estes dados e a significância de cada uma das formulações em relação ao seu respectivo controle são mostrados na tabela 3 e descritos a seguir.

As formulações com ISCOM induziram maior produção de todas as interleucinas avaliadas, demonstrando uma maior capacidade deste adjuvante em induzir uma resposta imune celular. Não foi observado efeito da dose na produção das citocinas estudadas.

As formulações com os adjuvantes Al(OH)₃, ISCOM e Flagelina em associação com o Al(OH)₃ induziram a produção de IFN- γ , quando formulados com 3 μ g de rLigANI. Já a produção de IL-2 foi observada nos grupos imunizados com 30 μ g de rLigANI formulada com Al(OH)₃ e também nas 2 doses vacinais (3 e 30 μ g de antígeno) para os adjuvantes ISCOM, Ca₃(PO₄)₂ e Flagelina. Em relação à presença de células produtores da citocina IL-4, se destacaram os grupos imunizados com 30 μ g de antígeno formulado com ISCOM e com Flagelina em associação com Al(OH)₃ em ambas as doses. Por fim, a produção de IL-17 foi observada nos animais que receberam as formulações ISCOM e Flagelina na dose de 3 μ g de antígeno e Al(OH)₃ em ambas as doses (Tab. 3).

Quando avaliadas quanto à relação IFN- γ /IL-4 foi observado que o aumento da dose de antígeno modulou para a resposta do tipo Th1, quando utilizados os adjuvantes Flagelina e Ca₃(PO₄)₂. Em contrapartida, com o adjuvante ISCOM o aumento da dose modulou para uma resposta do tipo Th2.

Já os adjuvantes Flagelina e Al(OH)₃ em combinação e o adjuvante Al(OH)₃ demonstraram um perfil de células T *helper* independente da dose de antígeno administrada, sendo observado um perfil de resposta Th1 e Th2, respectivamente.

Posteriormente foram comparadas as formulações com a mesma dose de rLigANI associada aos diferentes adjuvantes. Com a dose de 3 µg de rLigANI foram observadas diferenças significativas quanto a estimulação de células produtoras de IFN- γ entre os adjuvantes ISCOM e Al(OH)₃ em relação ao adjuvante Flagelina (Fig. 8). Quando à estimulação de IL-2 entre os adjuvantes ISCOM em relação à combinação dos adjuvantes Flagelina e Al(OH)₃ com a utilização de ambas as doses de rLigANI, 3 µg (Fig. 9 A) e 30 µg (Fig. 9 B).

Na estimulação de células produtoras de IL-17 foi observada diferença significativa com a dose de 3 µg de rLigANI entre o adjuvante Al(OH)₃ em relação ao adjuvante Ca₃(PO₄)₂ (Fig. 10 A). Com a dose de 30 µg de rLigANI foi observada diferença entre os adjuvantes Al(OH)₃ e ISCOM (Fig. 10 B) em relação a Flagelina, bem como, a Flagelina em associação com o Al(OH)₃.

Em relação à estimulação de citocina IL-4 não foi observada diferença significativa entre os adjuvantes estudados.

Tabela 4. Avaliação da presença de células produtoras de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-17 nos grupos imunizados com formulações nas doses de 3 μ g e 30 μ g de proteína rLigANI em relação ao seu respectivo controle (Adjuvante sem a proteína rLigANI).

	3 μg de rLigANI	p	30 μg de rLigANI	p	Sem rLigANI
	Média \pm DP		Média \pm DP		Média \pm DP
ISCOM					
IFN- γ	377,2 \pm 251,5	*	338,06 \pm 116,32	ns	93,9 \pm 37,54
IL-2	798,36 \pm 119,79	*	745,14 \pm 148,04	*	8,48 \pm 5,25
IL-4	271,93 \pm 74,08	ns	413,48 \pm 65,43	*	72 \pm 35
IL-17	122,94 \pm 66,03	*	19,77 \pm 5,00	ns	0,5 \pm 1,11
IFN- γ /IL-4	1,38		0,81		1,3
Flagelina					
IFN- γ	1,87 \pm 0,63	ns	15 \pm 8,89	ns	2,5 \pm 0,5
IL-2	14,28 \pm 6,24	*	13,93 \pm 8,52	*	1,62 \pm 1,03
IL-4	13,21 \pm 7,77	ns	11,07 \pm 1,44	ns	20,62 \pm 13,9
IL-17	5,35 \pm 1,12	*	0 \pm 0	ns	0,63 \pm 1,25
IFN- γ /IL-4	0,14		1,36		0,12
Flagelina + Al(OH)₃					
IFN- γ	56,75 \pm 20,73	*	125 \pm 44,04	ns	6 \pm 8,21
IL-2	5,25 \pm 3,80	ns	3,21 \pm 1,22	ns	1,66 \pm 1,4
IL-4	8,93 \pm 5,40	*	10,25 \pm 6,61	*	28,33 \pm 2,88
IL-17	1,43 \pm 1,36	ns	0 \pm 0	ns	0 \pm 0
IFN- γ /IL-4	6,35		12,19		0,21
Ca₃(PO₄)₂					
IFN- γ	13,93 \pm 6,90	ns	5,93 \pm 2,29	ns	7,5 \pm 3,5
IL-2	26,37 \pm 10,92	*	14,12 \pm 2,88	*	4,46 \pm 2,48
IL-4	27,50 \pm 17,50	ns	1,25 \pm 2,5	ns	20 \pm 15,21
IL-17	0,75 \pm 1,34	ns	2,12 \pm 2,12	ns	0,71 \pm 1,21
IFN- γ /IL-4	0,5		4,75		0,375
Al(OH)₃					
IFN- γ	239,16 \pm 116,51	*	113,30 \pm 64,27	ns	33,03 \pm 5,24
IL-2	176,69 \pm 28,40	ns	520,52 \pm 41,39	*	18,67 \pm 14
IL-4	242,14 \pm 110,66	ns	481,74 \pm 75,56	ns	27,5 \pm 17,5
IL-17	147,09 \pm 46,90	*	216,78 \pm 48,95	*	3,75 \pm 1,76
IFN- γ /IL-4	0,98		0,23		1,2

Na tabela são apresentados dados de média e desvio padrão das células produtoras de cada uma das citocinas, a partir de 10⁶ células estimuladas e a significância de cada uma das doses em relação ao controle (p) após o tempo de 120 dias de experimentação animal. A relação entre IFN- γ e IL-4 obtida para cada uma das formulações foi também demonstrada. A significância entre a formulação e seu controle foi representada com o asterisco (*) e os que não foram significativos em relação ao controle (adjuvante sozinho)

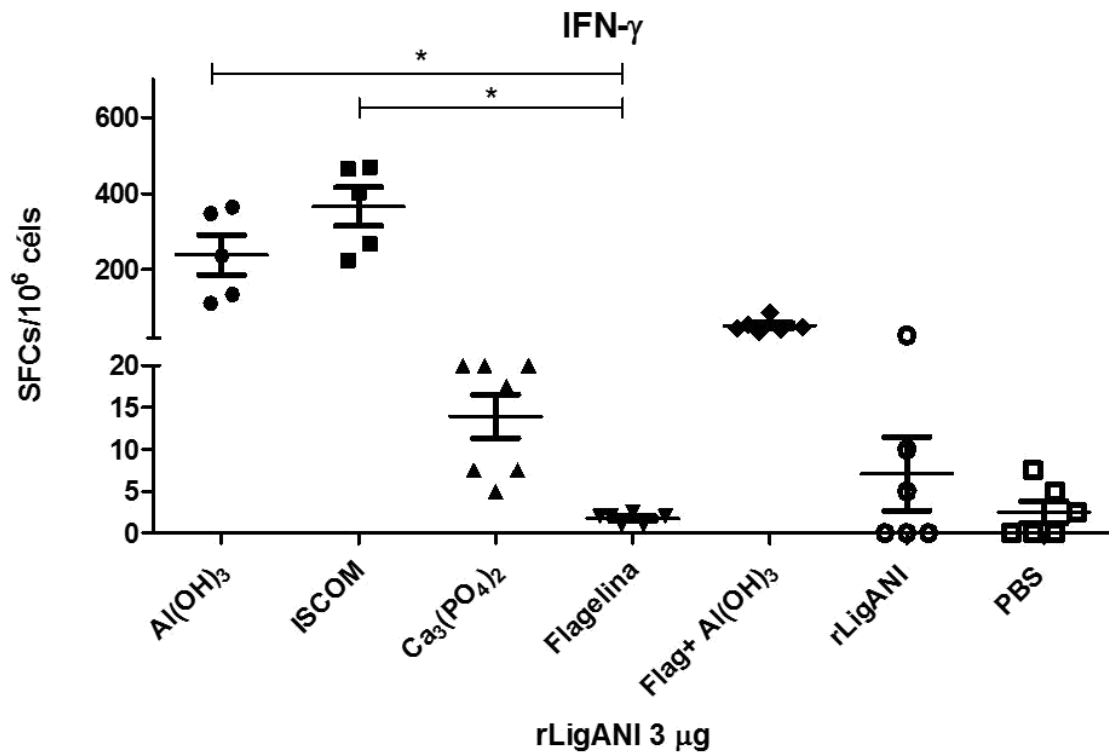


Figura 8. Diferenças em relação à estimulação de células formadoras de spots (SFCs) para o IFN- γ .

Grupos imunizados com ISCOM e Al(OH)₃ foram estatisticamente superiores aos grupos imunizados como adjuvante Flagelina, na dose de 3 μ g de rLigANI.

No gráfico também são mostrados resultados de grupos imunizados com PBS e com rLigANI. A média e desvio padrão das SFCs obtidos por estimulação com a Concanavalina A (conA) foram de 661 ± 473 (n=60).

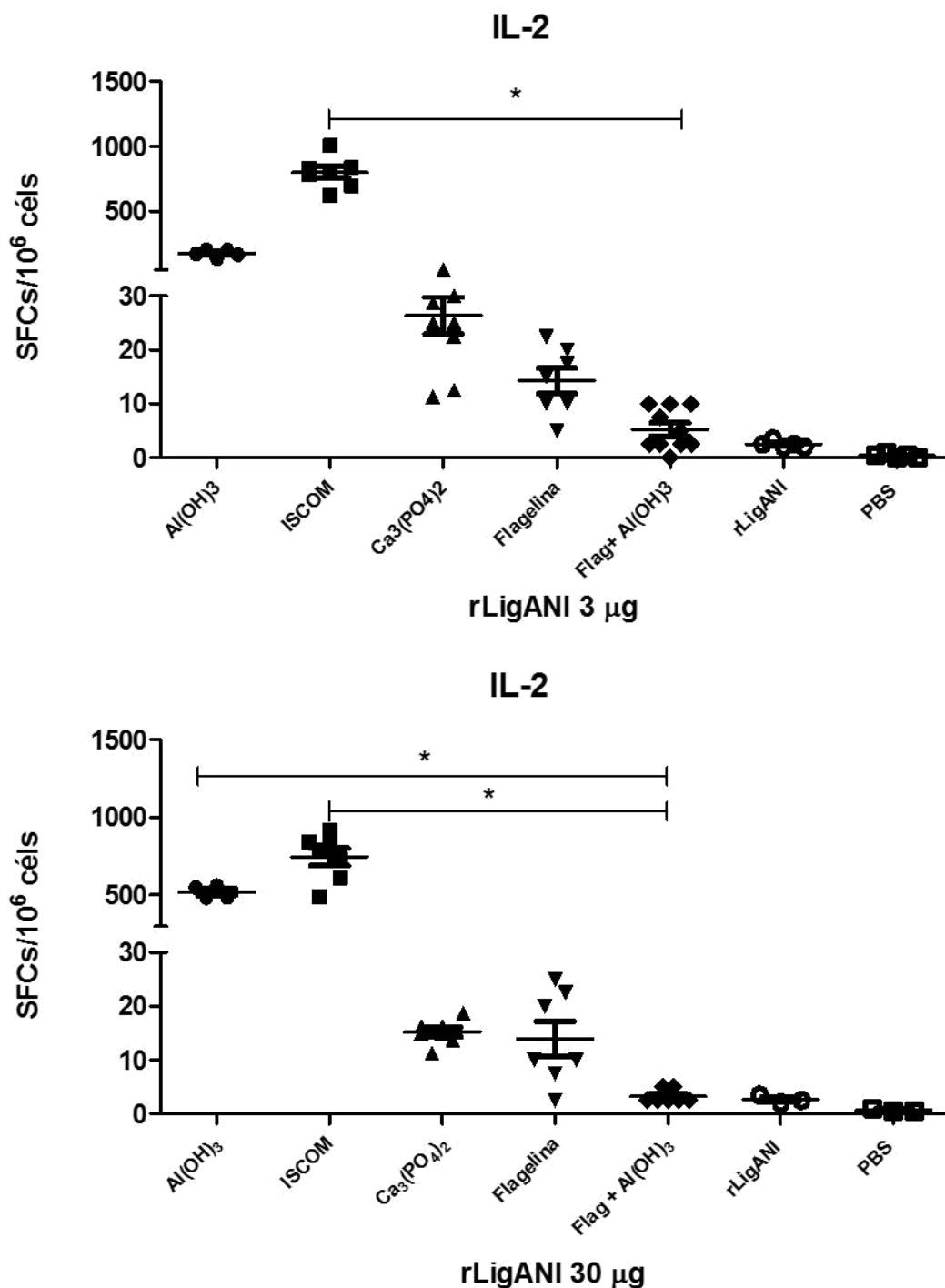


Figura 9. Diferenças em relação à estimulação de células produtoras de IL-2.

Grupos imunizados com ISCOM foram estatisticamente superiores na estimulação de SFCs em comparação aos grupos imunizados com o adjuvante Flagelina em associação com Al(OH)₃ na dose de 3 μg de rLigANI (A) e grupos imunizados com Al(OH)₃ foram estatisticamente superiores aos grupos imunizados com o adjuvante Flagelina em associação com Al(OH)₃ na dose de 30 μg de rLigANI (B).

No gráfico também são mostrados resultados de grupos imunizados com PBS e com rLigANI. A média e desvio padrão das SFCs obtidos por estimulação com a Concanavalina A (conA) foram de 722,82 ± 361,2 (n=60)..

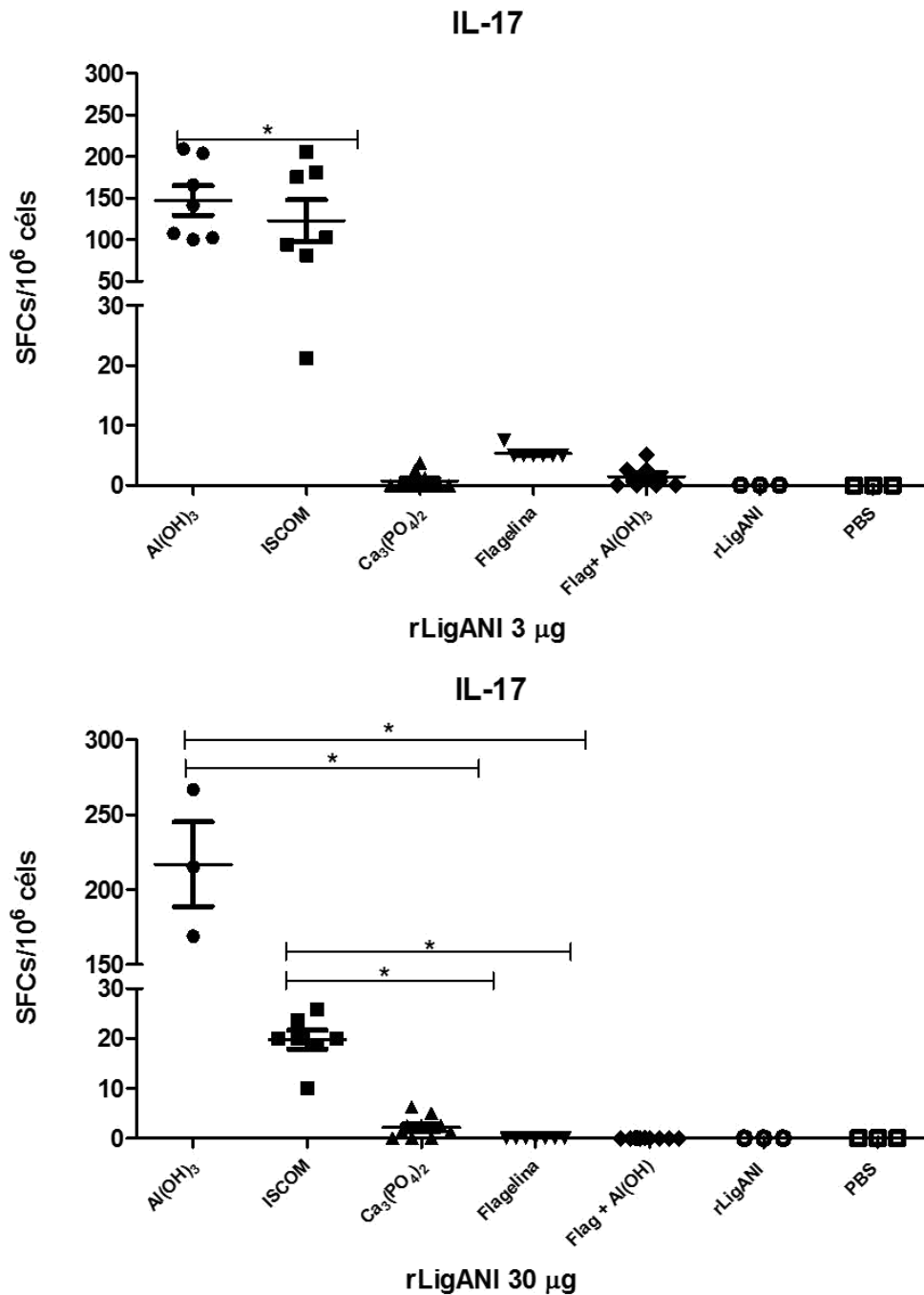


Figura 10. Diferenças em relação a estimulação de células produtoras de IL-17.

Grupos imunizados com Al(OH)₃ foram estatisticamente superiores na estimulação de SFCs em relação aos grupos imunizados como adjuvante Ca₃(PO₄)₂, na dose de 3 µg de rLigANI (acima), enquanto com a dose de 30 µg de rLigANI (abaixo) os grupos imunizados com adjuvantes ISCOM e Al(OH)₃ foram estatisticamente superiores em relação aos grupos imunizados com os adjuvantes Flagelina e os adjuvantes Flegelina e Al(OH)₃.

No gráfico também são mostrados resultados de grupos imunizados com PBS e com rLigANI. A média e desvio padrão das SFCs obtidos por estimulação com a Concanavalina A (conA) foram de 175,2 ± 104,6 (n=60).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a resposta imune induzida pela proteína recombinante LigANI quando associada a diferentes adjuvantes. Esta proteína é exposta na superfície bacteriana, sendo capaz de se ligar a componentes da matriz extracelular do hospedeiro, além de ser reconhecida por soro de pacientes humanos com leptospirose. A proteína LigANI possui alto grau de conservação entre as espécies de *Leptospira* (Ko et al., 2009; Evangelista et al., 2010) e seus genes correspondentes encontram-se positivamente regulados quando a bactéria é cultivada em condições fisiológicas de osmolaridade, reforçando sua potencial ação como determinante da virulência durante a infecção natural (Malmström et al., 2009). Devido a estas características e por sua capacidade de conferir proteção em ensaios de desafio em camundongos e em hamsters, esta porção da molécula de LigA tem sido considerada um dos mais promissores candidatos a antígeno para vacina de subunidade contra leptospirose (Koizumi & Watanabe, 2004; Silva, 2007; Palaniappan et al., 2006; Coutinho, 2011).

Contudo, mesmo com resultados promissores de proteção em hamsters, a imunidade estéril permanece ainda como um desafio no desenvolvimento da vacina de subunidade contra leptospirose, pois a imunização com rLigANI, bem como com outros antígenos, ainda não foi capaz de inibir a colonização renal por leptospirosas (Silva et al., 2007; Medeiros et al., 2006).

Os adjuvantes Freund e $Al(OH)_3$ foram bem sucedidos nos ensaios de proteção em hamsters. Estes adjuvantes são tipicamente carreadores, com habilidade de induzir resposta humoral, principalmente do tipo Th2 (Silva, 2007; Koizumi & Watanabe, 2004; Medeiros et al., 2005). Contudo, tem sido documentado o papel da resposta Th1 na proteção contra leptospirose (Vernel-Pauillac & Merein, 2006; Klimpel et al., 2003). Dado que *Leptospira* é uma bactéria extracelular, a proteção foi considerada ser exclusivamente mediada por resposta imune humoral (Rodriguez-Gonzalez et al., 2004; Schonke et al., 1989). De fato, foi relatado que anticorpos anti-LPS fornecem imunidade passiva em alguns modelos animais contra um número de cepas e espécies de leptospira (Faine et al., 1999). No entanto, estudos mais recentes têm

demonstrado que as espécies de *Leptospira* patogênicas podem estimular a produção *in vivo* de citocinas para Th1 e Th2 (Vernel-Pauillac & Merien, 2006). Faisal e colaboradores mostraram claramente que uma vacina de DNA baseada em LigA pode induzir significantes níveis de citocinas típicas de respostas Th1 e Th2, sendo interessante o fato de uma simples proteína ser capaz de ativar ambas as células do tipo Th1 e Th2 (Faisal et al., 2007). Contudo, sabe-se que a polarização Th1/Th2 depende não só da natureza e da concentração de antígeno, mas também, das APCs e de outras citocinas presentes no local da resposta imune (Fernandez-Botran et al., 1988; Mosmann et al., 1989).

À vista disso e com o propósito de aperfeiçoar a resposta imune induzida com a proteína rLigANI, esta foi formulada, no presente trabalho, com adjuvantes distintos quanto aos mecanismos de ação e composição. Além disso, nossa intenção foi também tentar compreender os efeitos imunomoduladores destas formulações, com o objetivo de selecionar a formulação mais eficiente em induzir resposta imune em camundongos, para ser utilizada em ensaios futuros no modelo hamsters.

Todos os adjuvantes avaliados neste trabalho foram capazes de induzir uma resposta imune humoral, demonstrada por níveis de anticorpos com diferentes intensidades, quando comparados com os controles (pré-imune e adjuvante sem antígeno). Confirmando, deste modo, o potencial imunogênico da proteína recombinante LigANI quando associada a diferentes adjuvantes.

Foram observados maiores títulos de anticorpos da classe IgG anti-rLigANI no tempo de 30 dias, em todos os grupos analisados, enquanto o grupo imunizado com o adjuvante Al(OH)₃ com a dose de 3 µg de rLigANI, apresentou títulos crescentes de IgG anti-rLigANI durante todo o período de experimentação. O perfil de resposta IgG obtido com a maioria dos adjuvantes do estudo é comum em esquemas com duas imunizações, visto que, após a segunda imunização a resposta de anticorpos IgG é mais intensa e mais rápida em comparação à primeira. No entanto, ao passar do tempo e, sem o contato novamente com o antígeno, a liberação de anticorpos pelas células B é reduzida, portanto, a dose de anticorpos séricos tende a ser menor (Abbas et al., 2012; Janeway et al., 2002).

Com o intuito de selecionar a formulação mais eficiente, ou seja, capaz de induzir uma resposta mais robusta, com menores doses de antígeno, foram realizadas comparações de doses para cada um dos adjuvantes com as concentrações de 3 µg e 30 µg de proteína rLigANI.

Em grupos imunizados com formulações com o Al(OH)₃ foram observadas diferenças significativas, entre as doses administradas, em todos os tempos estudados exceto no tempo de 15 dias.

Os animais imunizados com este adjuvante associado à dose de 3 µg de proteína rLigANI apresentaram títulos de anticorpos IgG anti-rLigA crescentes ao longo de todo o tempo de experimentação. Este perfil poderia ser explicado por um possível efeito *depot* deste adjuvante, em que se observa liberação prolongada do antígeno ao longo do tempo (Hem & White, 1995). No entanto, ainda que o mecanismo de ação deste adjuvante permaneça controverso, estudos demonstram que a adjuvantividade do Al(OH)₃ não está relacionada a este efeito *depot* (Gupta et al., 1996; Hem & Hogenesch, 2007). Estes resultados corroboram com as observações descritas por Hutchison e colaboradores que utilizaram uma abordagem de expressão transgênica de um receptor de antígeno de célula T e um antígeno modelo EαGFP para afastar a possibilidade de que a formação de um *depot* de Al(OH)₃ é o responsável pela adjuvantividade.

Para reforçar a observação acima, este grupo demonstrou que após imunizações com formulações com Al(OH)₃ e com o CpG, um adjuvante que funciona como agonista de TLR e que não é capaz de formar *depot*, não foram encontradas diferenças na cinética ou na magnitude da resposta de célula T ou na entrega do antígeno a uma variedade de APCs, indicando que ao invés de ser adsorvido ao Al(OH)₃, o antígeno é rapidamente disseminado na forma solúvel, excluindo claramente o papel de formação do depósito para a atividade adjuvante do Al(OH)₃ (Hutchison et al., 2012).

Já quando empregada a dose de 30 µg de rLigANI, o perfil de cinética de títulos de IgG foi diferente, com títulos decrescentes após 30 dias.

Quando avaliamos o perfil de subclasses de IgG foi observado que com menor dose do antígeno em associação ao Al(OH)₃ houve um predomínio de IgG1, seguido de IgG3. Enquanto que com a maior dose foi observado o também predomínio destes dois subtipos, IgG1 e IgG3, entretanto, com uma

maior distribuição de IgG2a, já relatada anteriormente por Kipps e colaboradores como a subclasse mais potente na mediação de proteção (Kipps et al., 1985).

O predomínio de IgG1 induzido pelas formulações com doses 3 µg e 30µg e os dados de relação IFN- γ /IL-4 obtidos com este adjuvante sugerem um direcionamento para a resposta de células T do tipo Th2 com ambas as doses de rLigANI administradas. Estes dados estão de acordo com o encontrado na literatura que relaciona o Al(OH)₃ com a indução de resposta imune predominantemente do tipo Th2 (Bungener et al., 2008).

Nas formulações com a Flagelina foram observadas diferenças significativas nos títulos de IgG anti-rLigANI, obtidas entre grupos imunizados com as doses de 3 µg e 30 µg de rLigANI apenas nos tempos de 30 e 60 dias de experimentação. Ao contrário do observado com as formulações com Al(OH)₃ os maiores títulos de anticorpos foram gerados a partir da formulação com a maior dose de antígeno. Contudo os títulos desse grupo imunizado com a dose de 30 µg de rLigANI, sofreram uma queda mais acentuada, quando comparados aos títulos dos animais imunizados com a menor dose. A partir do tempo de 90 dias não foi observada diferença nos títulos entre as doses.

A cinética de resposta IgG anti-rLigANI observada em grupos imunizados com este adjuvante, com obtenção de maiores títulos com a maior dose de antígeno, apenas nos tempos iniciais, pode sugerir um direcionamento de resposta à proteína rLigANI, que como demonstrado em nossos resultados é antigênica, entretanto, quando administrada sem adjuvantes é incapaz de gerar uma resposta intensa e duradoura. Além disso, por este adjuvante ser de origem proteica, pode estar competindo com a proteína rLigANI, pois como a Flagelina é altamente imunogênica, provavelmente estimulou maiores títulos de anticorpos IgG anti-flagelina, entretanto, títulos de anticorpos IgG anti-flagelina não foram avaliados para comprovação desta hipótese.

Em relação ao perfil de subclasses de IgG foi observado que com a dose de 3 µg de antígeno em associação com a Flagelina, houve predomínio de IgG1, seguido de IgG2b, IgG2a e IgG3. Já com a dose de 30 µg antígeno a proporção de IgG2a foi aumentada, com conseqüente diminuição nos níveis de IgG1, o que pode sugerir um discreto direcionamento para uma resposta do tipo Th1. Este perfil de resposta com maiores níveis de IgG1, seguidos de

títulos menores de IgG2a também foram observados em estudos de vacinas recombinantes contra *Pseudomonas aeruginosa* (Behrouz et al., 2016), bem como, em nosso estudo com a formulação de Al(OH)₃ com a maior dose.

Além disso, quando avaliada quanto à relação IFN- γ /IL-4 foi observado um direcionamento de resposta do tipo Th2 quando a Flagelina foi administrada com a menor dose de antígeno, em contrapartida, com a maior dose de antígeno o perfil demonstrado foi de resposta Th1.

Diante disso, podemos levantar a hipótese de que o aumento nos títulos de anticorpos IgG e nos níveis de IgG2a obtidos com a dose de 30 μ g esteja relacionado ao aumento na concentração do antígeno rLigANI, já que dados publicados por outros grupos demonstraram perfil de resposta Th1 em infecções por diferentes espécies de *Leptospira*, e com antígenos purificados de *Leptospira* como LipL32 e a rLigANI (Zuerner et al., 2011; Vernel-Pauillac & Merien, 2006; Lin et al., 2011; Faisal et al., 2009).

Nossos resultados indicaram que a Flagelina associada com a proteína rLigANI não demonstrou grande habilidade em desencadear resposta de células T. Sendo observada estimulação significativa apenas de células produtoras de IL-2, com ambas as doses de antígeno administradas. A estimulação de células produtoras de IL-2 é importante, uma vez que esta citocina é um fator de crescimento, proliferação e diferenciação para linfócitos T e tem papel principal na resposta de células T por sua ação nas células T reguladoras. Ao mesmo tempo, IL-2 atua nas células B tanto como um fator de crescimento, quanto como um estímulo para a síntese de anticorpos (Malek, 2008; Barron et al., 2010). Esta estimulação de IL-2 foi também observada por Chen e colaboradores em camundongos BALB/c imunizados com um plasmídeo de proteínas gag de HIV-1 combinado com um plasmídeo quimérico que codifica IL-18 e Flagelina (Chen et al., 2015).

A fim de diminuir as limitações da Flagelina, um agonista de TLR-5 que atua como um adjuvante tipicamente imunoestimulatório (Pino et al., 2005; Baptista et al., 2014), mas que não demonstrou grande capacidade em garantir a permanência da rLigANI em circulação, combinamos este adjuvante ao Al(OH)₃. A combinação de adjuvantes não é uma estratégia nova, tendo vários exemplos descritos na literatura, demonstrando que uma seleção cuidadosa de

combinações de adjuvantes pode resultar em melhorias complementares e sinergistas de respostas imunes às vacinas (Mutwiri et al., 2016).

Os Grupos imunizados com formulações contendo os adjuvantes Flagelina e Al(OH)_3 associados induziram maiores títulos de IgG quando imunizados com a dose de 30 μg de rLigANI, com diferenças significativas apenas a partir do tempo de 60 dias. O perfil de resposta de anticorpos obtido em grupos imunizados com esta combinação de adjuvantes foi diferente do perfil obtido para as demais formulações avaliadas neste estudo, já que, para tais, a dose menor de antígeno foi capaz de estimular maiores títulos de anticorpos. Esses resultados nos levam a crer que por estes adjuvantes atuarem em vias diferentes e com mecanismos de ação opostos, não sufocaram o sistema imune, já que os adjuvantes baseados em sais de alumínio não exercem sua função através de TLRs (Gavin et al., 2006), ao contrário da Flagelina (Andersen-Nissen et al., 2005).

Nossos resultados demonstraram que a combinação de Flagelina e Al(OH)_3 possibilitou a manutenção dos títulos por um período maior de tempo, quando associados à maior dose de antígeno. Estes dados são concordantes com os estudos realizados por Giannini e colaboradores em camundongos ao utilizarem uma combinação de um agonista de TLR, no caso o MPL, e o Al(OH)_3 (Giannini et al., 2006). A cinética da resposta de anticorpos IgG anti-rLigANI total obtida com nossa combinação pode estar associada ao mecanismo de ação do Al(OH)_3 , já que quando este adjuvante foi formulado individualmente demonstrou ser capaz de manter os níveis de anticorpos séricos ao longo do tempo.

Já é conhecido que o Al(OH)_3 não é capaz de fazer o “armazenamento” de antígeno, entretanto, pode ser adsorvido a este, ao contrário da Flagelina. Pode-se deduzir de acordo com o encontrado na literatura, que a Flagelina teria o papel de ativar o sistema imune inato (Hayashi et al., 2001), gerando maiores títulos de anticorpos (Qi et al., 2015), enquanto o Al(OH)_3 estaria fazendo o carreamento da proteína rLigANI (Cox & Coulter, 1997), aumentando assim a ativação do sistema imune, possibilitando o desencadeamento de uma resposta mais completa.

Os títulos obtidos com a combinação destes adjuvantes foram maiores do que os títulos obtidos com os adjuvantes Al(OH)_3 e Flagelina formulados

individualmente, confirmando o efeito sinérgico destes adjuvantes combinados, na estimulação de resposta imune de anticorpos.

Em relação ao perfil de subclasses de IgG, foi observado, como para os demais adjuvantes em estudo, o predomínio de IgG1, no entanto, seguido de IgG2b, IgG2a e IgG3.

De maneira interessante, foi observado em animais imunizados com formulações com a combinação de Flagelina e $Al(OH)_3$ a estimulação significativa de células produtoras de IL-4. Esta citocina é o principal estímulo para o desenvolvimento de células T auxiliares $CD4^+$ do tipo Th2. A IL-4 é a citocina de “assinatura” do subgrupo Th2, e age tanto como citocina indutora quanto como citocina efetora dessas células (Abbas et al., 1996; Mohrs et al., 2000). Estes resultados associados aos de subclasses de IgG, direcionam para uma resposta de células do tipo Th2, sugerindo, portanto, que a estimulação de resposta celular seja direcionada predominantemente pelo adjuvante $Al(OH)_3$. Os resultados de resposta celular com a Flagelina administrada individualmente corroboram esta especulação, já que este adjuvante não foi capaz de estimular significativamente IL-4, além disso, o perfil de resposta ao $Al(OH)_3$ é tipicamente Th2 (Brewer et al., 1996; Kool et al., 2008), ao contrário da Flagelina, para o qual espera-se um perfil Th1 (Bachmann et al., 2006, Song et al., 2016; Moigne et al., 2008).

Por outro lado, quando avaliamos a resposta imune celular quanto à razão $IFN-\gamma/IL-4$ foi observado um direcionamento para resposta do tipo Th1, independentemente da dose de antígeno administrada.

Acredita-se que a resposta imune celular para formulações com o adjuvante Flagelina, tanto quando administrado sozinho, quanto quando associado ao $Al(OH)_3$ pode ter sido limitada pela via de imunização utilizada, no caso, a via intramuscular, mesmo esta sendo a via de escolha de alguns grupos de pesquisa (Karam et al., 2013). Contudo, a Flagelina vem sendo estudada como uma grande aposta para adjuvante de mucosa (Honko et al., 2006; Baptista et al., 2014; Pino et al., 2005; Lee et al., 2006), seja com a utilização de linhagens atenuadas capazes de expressar Flagelina fusionada a antígenos heterólogos, administradas pela via oral (Sbrogio-Almeida e Ferreira, 2001), ou como proteína purificada co-administrada ou fusionada a antígenos

heterólogos por via nasal (lee et al., 2006; Skountzou et al., 2010; Habibi et al., 2015).

Rady e colaboradores (2016) demonstraram em seu estudo indicações claras de que o modo de ação da Flagelina é dependente da rota de administração. Em seu estudo a Flagelina codificada em vacinas de DNA foi injetada para reforçar a imunidade específica da vacina, seguindo posterior reforço com vetores de adenovírus recombinante administrados por via intramuscular ou por via intranasal, em que ambas as respostas imunes circulantes e pulmonares foram potencializadas. No entanto, essa dependência de rota de administração ficou clara, com a observação de acentuada redução na resposta de células T quando utilizada a via intramuscular (Rady et al., 2016).

No presente estudo, o adjuvante ISCOM destacou-se dentre os demais quanto à sua capacidade de estimular resposta imune humoral, estimulando altos títulos de anticorpos.

Grupos imunizados com ISCOM nas concentrações de 3 e 30 μg apresentaram diferenças entre os títulos de anticorpos IgG anti-rLigANI obtidos em todos os tempos analisados, porém estas não foram estatisticamente significativas. Nossos dados demonstraram uma tendência deste adjuvante em estimular maiores títulos de anticorpos quando empregada a formulação com a menor dose de rLigANI (3 μg), exceto no tempo de 15 dias, onde a dose de 30 μg induziu maiores títulos de anticorpos. Este perfil foi semelhante ao observado em formulações com o adjuvante $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Al}(\text{OH})_3$. Embora o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ e $\text{Al}(\text{OH})_3$ tenham demonstrado um perfil semelhante ao ISCOM, os níveis de anticorpos produzidos por essas formulações com a dose de 3 μg foram, respectivamente, 14 e 3 vezes menores em relação aos produzidos com formulações com ISCOM com a mesma dose de antígeno. Esses dados que demonstram a alta produção de anticorpos mesmo com a utilização de menores concentrações de antígenos vão de encontro com observações descritas na literatura, que demonstram a capacidade deste adjuvante em induzir altos títulos de anticorpos de todas as classes e subclasses, além de resposta CTL (Sanders et al., 2005; Bontempi et al., 2015).

Foi observado em grupos imunizados com este adjuvante o predomínio de IgG1, semelhante ao observado com os demais adjuvantes, seguido de

IgG3, IgG2a e em proporções quase imperceptíveis IgG2b. Tais dados estão de acordo com o estudo publicado por Cibulski e colaboradores onde foi demonstrada a capacidade do adjuvante ISCOM baseado em saponinas em induzir altos níveis de IgG1 e IgG2a (Cibulski et al., 2016). Quando avaliado quanto à relação IFN- γ /IL-4 foi observado um direcionamento para Th1 quando utilizada a menor dose de antígeno, já com o aumento da dose do mesmo, foi observado um direcionamento para Th2. Mesmo com este direcionamento dependente da dose administrada do antígeno, a estimulação de células produtoras de IFN- γ e IL-4 foi observada com ambas as doses de rLigANI administradas.

Este adjuvante demonstrou um perfil balanceado das subclasses, sugerindo um equilíbrio de respostas Th1/Th2 (Xu et al., 2015; Li et al., 2015). Segundo dados da literatura, o adjuvante ISCOM age como um indutor de resposta dos tipos Th1 e Th2 (Martina et al., 2003; Ahlberg et al., 2012; Bontempi et al., 2015). Nossos dados demonstraram que o aumento na dose de proteína rLigANI induziu uma diminuição na proporção de IgG1 com consequente aumento na proporção de IgG3. Especula-se, de tal modo, que mesmo que os títulos sejam menores, esta modulação pode ser interessante do ponto de vista de proteção e opsonização (Haas et al., 2002; Lemoine et al., 1992), já que mesmo a subclasse IgG1 seja naturalmente predominante, esta não é capaz de ativar a via de complemento eficientemente, ao passo que IgG2a, IgG2b e IgG3 podem. Além disso, IgG3 é uma subclasse que tem demonstrado ser importante para o controle de infecções, sendo demonstrado que desde o início as respostas de anticorpos, especialmente os do isotipo IgG3, desempenham um papel crítico na defesa do hospedeiro contra bactérias encapsuladas extracelulares, além de ser importante na resistência a patógenos e indicador de memória celular (Lemoine et al., 1992; Briles et al., 1981).

Quanto à indução de resposta imune celular o adjuvante ISCOM se destacou em relação aos demais, demonstrando ser capaz de estimular IFN- γ e IL-17 com 3 μ g de antígeno, IL-4 com 30 μ g de antígeno, além de estimular IL-2 com ambas concentrações de antígenos em relação ao controle. Além da significância em relação ao próprio controle, ISCOM sem antígeno, este

adjuvante também foi capaz de induzir resposta celular superior em relação aos demais adjuvantes.

Quando comparados todos os adjuvantes avaliados nesse estudo, no tempo final de experimentação, foram obtidos maiores títulos com o adjuvante ISCOM, seguido de $\text{Al}(\text{OH})_3$, Flagelina em associação com $\text{Al}(\text{OH})_3$, Flagelina e por fim $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ quando associados à dose de 3 μg de rLigANI. No entanto, com a maior dose (30 μg de rLigANI), o grupo imunizado com adjuvante $\text{Al}(\text{OH})_3$ sofreu uma imunossupressão da resposta imune, já o grupo imunizado com associação com Flagelina em associação com $\text{Al}(\text{OH})_3$ foi imunoestimulado.

Quando se trata de estratégias vacinais, a possibilidade de redução da dose de antígeno é muito importante, considerando a economia nos custos de produção e diminuição no risco de eventos adversos (Mastelic et al., 2010). Os resultados obtidos demonstraram que com os adjuvantes ISCOM, $\text{Al}(\text{OH})_3$ e $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ há a possibilidade de redução em 10 vezes na concentração de proteína recombinante rLigANI. Baseado na importância desta redução de dose, a formulação dos adjuvantes Flagelina e $\text{Al}(\text{OH})_3$ em combinação não é ideal, já que esta formulação teve resposta consideravelmente maior, apenas com a maior dose de antígeno.

Outro ponto importante a ser considerado é a qualidade dos anticorpos gerados por meio das diferentes formulações estudadas. Nossos resultados demonstraram que todas as formulações analisadas foram capazes de gerar anticorpos com alta avides, acima de 80%. Os índices de avides obtidos com as formulações analisadas não foram estatisticamente significativas. A alta avides destas formulações já era esperada, devido à natureza do antígeno, já que antígenos de origem proteica, como a rLigANI, tendem a gerar anticorpos com alta afinidade (Goldblatt et al., 1998). Além disso, o longo período de experimentação favoreceu a maturação da afinidade, portanto os anticorpos que permaneceram em circulação tinham maior afinidade pelo antígeno. Nessa fase, as células B com Imunoglobulinas de maior afinidade, que interagem melhor com o determinante antigênico, são preferencialmente estimuladas (Abbas et al., 2012; Janeway et al., 2002; Rudin & Thompson, 1998).

Foi demonstrada neste estudo a habilidade do adjuvante ISCOM em desencadear resposta imune celular, quando formulado com a proteína

rLigANI. Quando associado à menor dose este adjuvante foi capaz de estimular significativamente células T produtoras de IL-2, IFN- γ e IL-17. Estas citocinas foram analisadas, considerando sua importância para a proteção contra o agente causador da leptospirose, bem como, a acuidade no direcionamento de respostas de células Th1 e Th2, possibilitando assim caracterizar a resposta imune induzida por cada um dos adjuvantes (Romagnani, 2000).

A citocina IFN- γ foi avaliada por ser a principal ativadora de macrófagos e exercer funções críticas na imunidade natural e na imunidade adquirida mediada por células. Além da sua capacidade em acentuar a apresentação de antígeno associada ao MHC e amplificar a fase de reconhecimento das respostas imunes mediante o aumento da expressão dos ligantes que as células T reconhecem. O IFN- γ é, ainda, um ativador das células do endotélio, vascular, e potencializa muitas das ações do TNF em células endoteliais, promovendo a adesão e o extravasamento de linfócitos T para os locais da infecção (Billiau & Matthys, 2009; Schroder et al., 2004). Já a citocina IL-2, é capaz ainda de estimular a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células T ativadas por antígeno e também promover sobrevivência das células induzindo a proteína antiapoptótica Bcl-2 (Barron et al., 2010; Josefowicz et al., 2012). Enquanto a IL-17 é uma citocina essencial para defesa do hospedeiro contra vários microrganismos, particularmente, bactérias extracelulares e fungos (Korn et al., 2009; Curtis & Way, 2009; O'Quinn et al., 2008). Além disso, a IL-17 possui capacidade de modular neutrófilos via citocinas e promover expansão e sobrevivência de polimorfonucleares (G-CSF, GM-CSF) (Parsonage et al., 2008), bem como, de quimioatrativos para neutrófilos (CXCL1, CXCL2 and CXCL5) (Ruddy et al., 2005; Andoh et al., 2002). Estas citocinas citadas acima foram significativamente estimuladas em grupos imunizados com as formulações com os adjuvantes ISCOM e Al(OH)₃.

Como já demonstrado previamente em ensaios desafios com hamsters, o adjuvante Al(OH)₃, tem capacidade protetora, quando formulado com a proteína recombinante LigANI, no entanto, não é capaz de eliminar a colonização renal por leptospirosas vivas (Medeiros et al., 2005; Koizumi & Watanabe, 2004). Por este motivo e devido a ampla utilização deste adjuvante em vacinas veterinárias e humanas aprovadas por quase 90 anos (Wen & Shi, 2016), neste estudo comparativo, o Al(OH)₃ foi utilizado como um controle.

Este adjuvante modelo cumpriu importantes requisitos, como maiores títulos de anticorpos gerados com menores doses de antígeno, alta avidéz dos anticorpos gerados, e indução de resposta celular. Além disso, células produtoras de IL-17, foram significativamente estimuladas em grupos imunizados com Al(OH)₃ com ambas as concentrações de rLigANI. Contudo, em estudos anteriores do nosso grupo, este adjuvante não foi capaz de eliminar a colonização renal por leptospiros, sendo necessário apostar em um adjuvante que tenha gerado resposta imune mais potente e balanceada, em comparação ao Al(OH)₃.

Os nossos resultados demonstraram que o adjuvante ISCOM foi o único capaz de gerar títulos de anticorpos maiores em comparação ao Al(OH)₃, além disso demonstrou maior balanço de subclasses de IgG e capacidade de desenvolver resposta imune celular significativa. Este adjuvante, dessa forma, demonstrou maior potencial para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade contra leptospirose quando em associação à proteína rLigANI.

Estudos com novos ISCOMs baseados em saponinas *Quillaja brasiliensis* demonstraram a capacidade deste adjuvante em induzir resposta de mucosa e produção de anticorpos sistêmica, respostas das células T e absorção melhorada de antígeno (Cibulski et al., 2016). Não obstante, a dose administrada deste adjuvante é reduzida, facilitando a formulação e imunização de animais e futuramente de humanos. Outra informação importante sobre este adjuvante, é a de que o intervalo de imunização sugerido pelo fabricante é de 21 dias, tempo em que a resposta é acentuada e sua qualidade aumentada. No entanto, como o nosso objetivo era comparar os adjuvantes sob as mesmas condições de experimentação, entre elas o intervalo de imunização, a opção escolhida foi a de utilizar o intervalo de 15 dias, o indicado como ideal para os demais adjuvantes do estudo, indicando que a resposta imune induzida por este adjuvante pode ser ainda mais intensificada seguindo-se o intervalo maior entre as imunizações, conforme sugerido pelo fabricante

Diante do exposto, o adjuvante ISCOM com a dose de 3 µg de proteína recombinante LigANI foi a formulação que apresentou os resultados mais satisfatórios neste estudo comparativo, sendo assim, a selecionada para utilização em futuros ensaios conduzidos em hamsters. Espera-se que esta

formulação seja capaz de induzir uma resposta imune protetora, reduzindo e até mesmo eliminando a colonização renal por leptospiros em hamsters.

6. CONCLUSÃO

- Todos os adjuvantes avaliados neste estudo foram capazes de induzir resposta imune humoral significativa em relação aos controles.
- Os resultados obtidos demonstram a possibilidade de redução da dose de antígeno para todos os adjuvantes estudados, exceto para a combinação de Flagelina com Al(OH)₃.
- Os títulos de IgG anti-rLigANI foram aumentados quando os adjuvantes Flagelina e Al(OH)₃ foram combinados.
- Os índices de avides obtidos nos grupos imunizados com todas as formulações avaliadas foram altos, considerando a metodologia empregada.
- O isotipo IgG1 foi o predominante em todas as formulações. No entanto, as formulações com os adjuvantes ISCOM e Flagelina e Al(OH)₃ quando combinados revelaram um maior equilíbrio entre as subclasses, sugerindo um possível balanço entre respostas Th1/Th2.
- ISCOM e Al(OH)₃ se destacaram no desencadeamento de resposta imune de celular com estimulação significativa de células produtoras de IFN- γ , IL-2, e IL-17.
- Entre os adjuvantes estudados o ISCOM foi o que apresentou resultados mais promissores. Baseado nos resultados de resposta imune de anticorpos e celular, este adjuvante foi o selecionado para futura avaliação em ensaio de desafio utilizando hamsters como modelo.

Este estudo forneceu informações importantes para entender a resposta imune induzida por cada adjuvante quando associado com a proteína rLigANI, que poderão ser utilizadas futuramente, auxiliando no desenvolvimento de vacinas para leptospirose. Além disso, os dados obtidos poderão ser usados auxiliando com informações para outros modelos de imunização, principalmente com antígenos de origem bacteriana.

7. PERSPECTIVAS

Este estudo envolve não só estas formulações aqui descritas, mas também formulações com outros adjuvantes. Entre elas estão sendo avaliadas formulações com os adjuvantes: AddaVax (Esqualeno), MPL (lipolissacarídeo A modificado); e diversas outras combinações.

Preparar as formulações com o adjuvante ISCOM e realizar ensaios de desafio em hamsters.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, AK; Lichtman, AH; Pillai, SHIV. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*.383:787–793.
- Abbas AK, Lohr J, Knoechel B. Balancing Autoaggressive and Protective T-cell Responses. *J Autoimmun*. 2007;28(2–3):59–61.
- Adams MM, Damani P, Perl NR, Won A, Hong F, Livingston PO, et al. Design and synthesis of potent Quillaja saponin vaccine adjuvants. *J Am Chem Soc*. 2010;132(6):1939–45.
- Adler B, de la Peña Moctezuma A. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010;140(3–4):287–96.
- Agrawal L, Haq W, Hanson CV, Rao DN. Generating neutralizing antibodies, Th1 response and MHC non restricted immunogenicity of HIV-I env and gag peptides in liposomes and ISCOMs with in-built adjuvanticity. *J Immune Based Ther Vaccines*. 2003;1(1):5.
- Ahlberg V, Lövgren Bengtsson K, Wallgren P, Fossum C. Global transcriptional response to ISCOM-Matrix adjuvant at the site of administration and in the draining lymph node early after intramuscular injection in pigs. *Dev Comp Immunol*. 2012;38(1):17–26.
- Alonso PL, Sacarlal J, Aponte JJ, Leach A, Macete E, Milman J, et al. Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. 2004;364(9443):1411–20.
- Andersen-Nissen E, Smith KD, Strobe KL, Barrett SLR, Cookson BT, Logan SM, et al. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *PNAS*. 28 de junho de 2005;102(26):9247–52.
- Andoh A, Hata K, Araki Y, Fujiyama Y, Bamba T. Interleukin (IL)-4 and IL-17 synergistically stimulate IL-6 secretion in human colonic myofibroblasts. *Int J Mol Med*. 2002;10(5):631–4.
- Andoh A, Shimada M, Bamba S, Okuno T, Araki Y, Fujiyama Y, et al. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 participate in interleukin-17 plus tumor necrosis factor-alpha-induced stabilization of interleukin-6 mRNA in human pancreatic myofibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1591(1–3):69–74.
- Apostólico J de S, Lunardelli VAS, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res*. 2016; 2016: 1459394.

Asadi Karam MR, Oloomi M, Mahdavi M, Habibi M, Bouzari S. Vaccination with recombinant FimH fused with flagellin enhances cellular and humoral immunity against urinary tract infection in mice. *Vaccine*. 2013;31(8):1210–6.

Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine*. 2001;19(17–19):2666–72.

Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*. 2013;4:114.

Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol*. 2013;4:114.

Azmi F, Ahmad Fuaad AAH, Skwarczynski M, Toth I. Recent progress in adjuvant discovery for peptide-based subunit vaccines. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(3):778–96.

Bachmann M, Horn K, Poleganov MA, Paulukat J, Nold M, Pfeilschifter J, et al. Interleukin-18 secretion and Th1-like cytokine responses in human peripheral blood mononuclear cells under the influence of the toll-like receptor-5 ligand flagellin. *Cell Microbiol*. 2006;8(2):289–300.

Baptista A a. S, Donato TC, Garcia KCOD, Gonçalves G a. M, Coppola MP, Okamoto AS, et al. Immune response of broiler chickens immunized orally with the recombinant proteins flagellin and the subunit B of cholera toxin associated with *Lactobacillus* spp. *Poult Sci*. 2014;93(1):39–45.

Barron L, Dooms H, Hoyer KK, Kuswanto W, Hofmann J, O’Gorman WE, et al. Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *J Immunol*. 2010;185(11):6426–30.

Bates JT, Graff AH, Phipps JP, Grayson JM, Mizel SB. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. *J Immunol*. 2011;186(11):6255–62.

Behboudi S, Morein B, Rönnerberg B. Isolation and quantification of Quillaja saponaria Molina saponins and lipids in iscom-matrix and iscoms. *Vaccine*. 1995;13(17):1690–6.

Bharti AR, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(12):757–71.

Bigaeva E, van Doorn E, Liu H, Hak E. Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0154757.

Billiau A, Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev*. abril de 2009;20(2):97–113.

Bontempi IA, Vicco MH, Cabrera G, Villar SR, González FB, Roggero EA, et al. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. *Vaccine*. 2015;33(10):1274–83.

Bortolatto J, Mirotti L, Rodriguez D, Gomes E, Russo M. Adsorption of Toll-Like Receptor 4 Agonist to Alum-Based Tetanus Toxoid Vaccine Dampens Pro-T Helper 2 Activities and Enhances Antibody Responses. *J Immunol Res*. 2015;2015:280238.

Brewer JM, Conacher M, Satoskar A, Bluethmann H, Alexander J. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur J Immunol*. 1996;26(9):2062–6.

Briles DE, Claflin JL, Schroer K, Forman C. Mouse IgG3 antibodies are highly protective against infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Nature*. 1981;294(5836):88–90.

Bungener L, Geeraedts F, Ter Veer W, Medema J, Wilschut J, Huckriede A. Alum boosts TH2-type antibody responses to whole-inactivated virus influenza vaccine in mice but does not confer superior protection. *Vaccine*. 2008;26(19):2350–9.

Burgess R. Medical applications of nanoparticles and nanomaterials. *Stud Health Technol Inform*. 2009; 149:257–83.

Camussone CM, Veaute CM, Porporatto C, Morein B, Marcipar IS, Calvino LF. Immune response of heifers against a *Staphylococcus aureus* CP5 whole cell vaccine formulated with ISCOMATRIX™ adjuvant. *J Dairy Res*. 2013;80(1):72–80.

Charles A, Janeway J, Medzhitov and R. Innate Immune Recognition. *Annual Review of Immunology*. 2002;20(1):197–216.

Chaurasia M, Singh PK, Jaiswal AK, Kumar A, Pawar VK, Dube A, et al. Bioinspired Calcium Phosphate Nanoparticles Featuring as Efficient Carrier and Prompter for Macrophage Intervention in Experimental Leishmaniasis. *Pharmaceutical Research*. 2016;1–13.

Chen Y-L, Chen Y-S, Hung Y-C, Liu P-J, Tasi H-Y, Ni W-F, et al. Improvement in T helper 1-related immune responses in BALB/c mice immunized with an HIV-1 gag plasmid combined with a chimeric plasmid encoding interleukin-18 and flagellin. *Microbiol Immunol*. 2015;59(8):483–94.

Cibulski SP, Mourglia-Ettlin G, Teixeira TF, Quirici L, Roehe PM, Ferreira F, et al. Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine*. 2016;34(9):1162–71.

Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*. 2010;33(4):492–503.

Coutinho ML, Choy HA, Kelley MM, Matsunaga J, Babbitt JT, Lewis MS, et al. A LigA Three-Domain Region Protects Hamsters from Lethal Infection by *Leptospira interrogans*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(12).

Cox JC, Coulter AR. Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine*. 1997;15(3):248–56.

Cox null, Sjölander null, Barr null. ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998;32(3):247–71.

Curtis MM, Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. 2009;126(2):177–85.

Dalsgaard K. Thinlayer chromatographic fingerprinting of commercially available saponins. *Dan Tidsskr Farm*. 1970;44(8):327–31.

de Faria MT, Calderwood MS, Athanazio DA, McBride AJA, Hartskeerl RA, Pereira MM, et al. Carriage of *Leptospira interrogans* among domestic rats from an urban setting highly endemic for leptospirosis in Brazil. *Acta Trop*. 2008;108(1):1–5.

De Gregorio E, Caproni E, Ulmer JB. Vaccine adjuvants: mode of action. *Front Immunol*. 2013;4:214.

Dey AK, Srivastava IK. Novel adjuvants and delivery systems for enhancing immune responses induced by immunogens. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(2):227–51.

Dey AK, Srivastava IK. Novel adjuvants and delivery systems for enhancing immune responses induced by immunogens. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(2):227–51.

Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, 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*. 2009;183(10):6186–97.

Seijo A, Coto H, San Juan J, Videla J, Deodato B, Cernigoi B, et al. Respiratory distress due to pulmonary hemorrhage in leptospirosis. *Medicina (B Aires)*. 2002;62(2):135–40.

Elamanchili P, Lutsiak CME, Hamdy S, Diwan M, Samuel J. “Pathogen-mimicking” nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cells. *J Immunother*. 2007;30(4):378–95.

Evangelista KV, Coburn J. *Leptospira* as an emerging pathogen: a review of its biology, pathogenesis and host immune responses. *Future Microbiol*. 2010;5(9):1413–25.

Faine S., Adler B., Bolin C. & Perolat P. 1999. *Leptospira* and leptospirosis. 2nd ed. MediSci, Melbourne. 272p.

- Faisal SM, Yan W, Chen C-S, Palaniappan RUM, McDonough SP, Chang Y-F. Evaluation of protective immunity of Leptospira immunoglobulin like protein A (LigA) DNA vaccine against challenge in hamsters. *Vaccine*. 2008;26(2):277–87.
- Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES. Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med*. 1988;168(2):543–58.
- Flach TL, Ng G, Hari A, Desrosiers MD, Zhang P, Ward SM, et al. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. *Nat Med*. 2011;17(4):479–87.
- Fraga TR, Barbosa AS, Isaac L. Leptospirosis: aspects of innate immunity, immunopathogenesis and immune evasion from the complement system. *Scand J Immunol*. 2011;73(5):408–19.
- Garçon N, Chomez P, Van Mechelen M. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines*. 2007;6(5):723–39.
- Garlapati S, Facci M, Polewicz M, Strom S, Babiuk LA, Mutwiri G, et al. Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009;128(1–3):184–91.
- Gavin AL, Hoebe K, Duong B, Ota T, Martin C, Beutler B, et al. Adjuvant-enhanced antibody responses in the absence of toll-like receptor signaling. *Science*. 2006;314(5807):1936–8.
- Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. 2006;24(33–34):5937–49.
- Goldblatt D, Vaz AR, Miller E. 1998. Antibody avidity as a surrogate marker of successful priming by Haemophilus influenzae type b conjugate vaccines following infant immunization. *J. Infect. Dis*. 177:1112–1115 .
- Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*. 2002;111(7):927–30.
- Goto N, Kato H, Maeyama J, Eto K, Yoshihara S. Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine*. 1993;11(9):914–8.
- Gouveia EL, Metcalfe J, de Carvalho ALF, Aires TSF, Villasboas-Bisneto JC, Queiroz A, et al. Leptospirosis-associated severe pulmonary hemorrhagic syndrome, Salvador, Brazil. *Emerging Infect Dis*. 2008;14(3):505–8.
- Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(7):505–17.

Haake DA, Champion CI, Martinich C, Shang ES, Blanco DR, Miller JN, et al. Molecular cloning and sequence analysis of the gene encoding OmpL1, a transmembrane outer membrane protein of pathogenic *Leptospira* spp. *J Bacteriol.* 1993;175(13):4225–34.

Haas KM, Hasegawa M, Steeber DA, Poe JC, Zabel MD, Bock CB, et al. Complement receptors CD21/35 link innate and protective immunity during *Streptococcus pneumoniae* infection by regulating IgG3 antibody responses. *Immunity.* 2002;17(6):713–23.

Habibi M, Asadi Karam MR, Shokrgozar MA, Oloomi M, Jafari A, Bouzari S. Intranasal immunization with fusion protein MrpH-FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Mol Immunol.* 2015;64(2):285–94.

Harris KG, Coyne CB. Enter at your own risk: how enteroviruses navigate the dangerous world of pattern recognition receptor signaling. *Cytokine.* 2013;63(3):230–6.

Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410(6832):1099–103.

He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJD. Calcium Phosphate Nanoparticle Adjuvant. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(6):899–903.

He Q, Mitchell A, Morcol T, Bell SJD. Calcium phosphate nanoparticles induce mucosal immunity and protection against herpes simplex virus type 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(5):1021–4.

Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, et al. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol.* 2003;74(2):277–86.

Helmerhorst HJF, van Tol EN, Tuinman PR, de Vries PJ, Hartskeerl RA, Grobusch MP, et al. Severe pulmonary manifestation of leptospirosis. *Neth J Med.* 2012;70(5):215–21.

Hem SL, Hogenesch H. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6(5):685–98.

Hem SL, White JL. Structure and properties of aluminum-containing adjuvants. *Pharm Biotechnol.* 1995;6:249–76.

Hilleman MR. Vaccines in historic evolution and perspective: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine.* 2000;18(15):1436–47.

Honko AN, Sriranganathan N, Lees CJ, Mizel SB. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* 2006;74(2):1113–20.

Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol*. 2008;9(8):847–56.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*. 2007;357(10):1018–27.

Huang DB, Wu JJ, Tying SK. A review of licensed viral vaccines, some of their safety concerns, and the advances in the development of investigational viral vaccines. *J Infect*. 2004;49(3):179–209.

Huleatt JW, Nakaar V, Desai P, Huang Y, Hewitt D, Jacobs A, et al. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*. 2008;26(2):201–14.

Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *FASEB J*. 2012;26(3):1272–9.

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5(10):987–95.

Jain V, Vyas SP, Kohli DV. Well-defined and potent liposomal hepatitis B vaccines adjuvanted with lipophilic MDP derivatives. *Nanomedicine*. 2009;5(3):334–44.

Josefowicz SZ, Lu L-F, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:531–64.

Karam MRA, Oloomi M, Mahdavi M, Habibi M, Bouzari S. Assessment of immune responses of the flagellin (FliC) fused to FimH adhesin of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Immunol*. 2013;54(1):32–9.

Kazzaz J, Singh M, Ugozzoli M, Chesko J, Soenawan E, O'Hagan DT. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency. *J Control Release*. 2006;110(3):566–73.

Kazzaz J, Singh M, Ugozzoli M, Chesko J, Soenawan E, O'Hagan DT. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency. *J Control Release*. 2006;110(3):566–73.

Kensil CR, Kammer R. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. *Expert Opin Investig Drugs*. 1998;7(9):1475–82.

Kensil CR, Mo AX, Truneh A. Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. *Front Biosci*. 2004;9:2972–88.

Kensil CR. Saponins as vaccine adjuvants. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1996;13(1–2):1–55.

Kersten GFA, Crommelin DJA. Liposomes and ISCOMs. *Vaccine*. 14 de fevereiro de 2003;21(9–10):915–20.

Kim SK, Ragupathi G, Cappello S, Kagan E, Livingston PO. Effect of immunological adjuvant combinations on the antibody and T-cell response to vaccination with MUC1-KLH and GD3-KLH conjugates. *Vaccine*. 2000;19(4–5):530–7.

Kipps TJ, Parham P, Punt J, Herzenberg LA. Importance of immunoglobulin isotype in human antibody-dependent, cell-mediated cytotoxicity directed by murine monoclonal antibodies. *J Exp Med*. 1985;161(1):1–17.

Klimpel GR, Matthias MA, Vinetz JM. *Leptospira interrogans* activation of human peripheral blood mononuclear cells: preferential expansion of TCR gamma delta+ T cells vs TCR alpha beta+ T cells. *J Immunol*. 2003;171(3):1447–55.

Ko AI, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(10):736–47.

Koizumi N, Watanabe H. Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. *Vaccine*. 2004;22(11–12):1545–52.

Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MAM, Muskens F, Jung S, et al. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med*. 2008;205(4):869–82.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.

Kündig TM, Schorle H, Bachmann MF, Hengartner H, Zinkernagel RM, Horak I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science*. 1993;262(5136):1059–61.

Le Moigne V, Robreau G, Mahana W. Flagellin as a good carrier and potent adjuvant for Th1 response: study of mice immune response to the p27 (Rv2108) *Mycobacterium tuberculosis* antigen. *Mol Immunol*. 2008;45(9):2499–507.

Lee SE, Kim SY, Jeong BC, Kim YR, Bae SJ, Ahn OS, et al. A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun*. 2006;74(1):694–702.

Lee SE, Nguyen CT, Kim SY, Thi TN, Rhee JH. Tetanus toxin fragment C fused to flagellin makes a potent mucosal vaccine. *Clin Exp Vaccine Res*. 2015;4(1):59–67.

Lemoine R, Berney T, Shibata T, Fulpius T, Gyotoku Y, Shimada H, et al. Induction of “wire-loop” lesions by murine monoclonal IgG3 cryoglobulins. *Kidney Int*. 1992;41(1):65–72.

Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010;28 Suppl 3:C25-36.

- Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(2):296–326.
- Li L, Yang C, Zhao Z, Xu B, Zheng M, Zhang C, et al. Skewed T-helper (Th)1/2- and Th17/T regulatory-cell balances in patients with renal cell carcinoma. *Mol Med Rep.* 2015;11(2):947–53.
- Liesenfeld O, Montoya JG, Kinney S, Press C, Remington JS. Effect of Testing for IgG Avidity in the Diagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection in Pregnant Women: Experience in a US Reference Laboratory. *J Infect Dis.* 2001;183(8):1248–53.
- Liesenfeld O, Montoya JG, Tathineni NJ, Davis M, Brown BW, Cobb KL, et al. Confirmatory serologic testing for acute toxoplasmosis and rate of induced abortions among women reported to have positive *Toxoplasma* immunoglobulin M antibody titers. *American Journal of Obstetrics & Gynecology.* 2001;184(2):140–5.
- Lövgren Bengtsson K, Morein B, Osterhaus AD. ISCOM technology-based Matrix MTM adjuvant: success in future vaccines relies on formulation. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(4):401–3.
- Malek TR. The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:453–79.
- Mallapragada SK, Narasimhan B. Immunomodulatory biomaterials. *Int J Pharm.* 2008;364(2):265–71.
- Malmström J, Beck M, Schmidt A, Lange V, Deutsch EW, Aebersold R. Proteome-wide cellular protein concentrations of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nature.* 2009;460(7256):762–5.
- Malyala P, Chesko J, Ugozzoli M, Goodsell A, Zhou F, Vajdy M, et al. The potency of the adjuvant, CpG oligos, is enhanced by encapsulation in PLG microparticles. *J Pharm Sci.* 2008;97(3):1155–64.
- Marotto PC, Nascimento CM, Eluf-Neto J, Marotto MS, Andrade L, Sztajnbok J, et al. Acute lung injury in leptospirosis: clinical and laboratory features, outcome, and factors associated with mortality. *Clin Infect Dis.* 1999;29(6):1561–3.
- Martina BEE, van de Bildt MWG, Kuiken T, van Amerongen G, Osterhaus ADME. Immunogenicity and efficacy of recombinant subunit vaccines against phocid herpesvirus type 1. *Vaccine.* 2003;21(19–20):2433–40.
- Mastelic B, Ahmed S, Egan WM, Del Giudice G, Golding H, Gust I, et al. Mode of action of adjuvants: implications for vaccine safety and design. *Biologicals.* 2010;38(5):594–601.
- Matsunaga J, Barocchi MA, Croda J, Young TA, Sanchez Y, Siqueira I, et al. Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. *Mol Microbiol.* 2003;49(4):929–45.

Mbow ML, De Gregorio E, Valiante NM, Rappuoli R. New adjuvants for human vaccines. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(3):411–6.

McBride AJA, Athanazio DA, Reis MG, Ko AI. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2005;18(5):376–86.

Medeiros, A. M. Dos R Mitemayer G, Da Séf, Mcbride AJA, Croda JHR, Ramos JGR, et al. Proteínas LigA e LigB (Leptospiral Ig-like (Lig) domains) para vacinação e diagnóstico, 2005 – PI0505529-6. (Patente).

Medeiros, A. M. et al. LigA and LigA Proteins (Leptospiral Ig-Like (Lig) domains) for Vaccination and Diagnosis, 2006 - Publication number: WO2007070996. (Patente).

Miyamoto M, Emoto M, Emoto Y, Brinkmann V, Yoshizawa I, Seiler P, et al. Neutrophilia in LFA-1-deficient mice confers resistance to listeriosis: possible contribution of granulocyte-colony-stimulating factor and IL-17. *J Immunol*. 2003;170(10):5228–34.

Mohrs M., Holscher C., Brombacher F. 2000. Interleukin-4 receptor alpha-deficient BALB/c mice show an unimpaired T helper 2 polarization in response to *Leishmania major* infection. *Infect. Immun*. 68:1773–1780.

Monaris D, Sbrogio-Almeida ME, Dib CC, Canhamero TA, Souza GO, Vasconcellos SA, et al. Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant *Leptospira interrogans* Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant. *Clin Vaccine Immunol*. 2015;22(8):965–73.

Morein B, Hu K-F, Abusugra I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(10):1367–82.

Morel S, Didierlaurent A, Bourguignon P, Delhay S, Baras B, Jacob V, et al. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine*. 2011;29(13):2461–73.

Moschos SA, Bramwell VW, Somavarapu S, Alpar HO. Comparative immunomodulatory properties of a chitosan-MDP adjuvant combination following intranasal or intramuscular immunisation. *Vaccine*. 2005;23(16):1923–30.

Moschos SA, Bramwell VW, Somavarapu S, Alpar HO. Modulating the adjuvanticity of alum by co-administration of muramyl di-peptide (MDP) or Quil-A. *Vaccine*. 2006;24(8):1081–6.

Mosmann TR, Fong TA. Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods*. 1989;116(2):151–8.

Mutwiri G, Gerds V, van Drunen Littel-van den Hurk S, Auray G, Eng N, Garlapati S, et al. Combination adjuvants: the next generation of adjuvants? *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(1):95–107.

- Nabel GJ. Designing tomorrow's vaccines. *N Engl J Med*. 2013;368(6):551–60.
- Nandedkar TD. Nanovaccines: recent developments in vaccination. *J Biosci*. 2009;34(6):995–1003.
- Nations U. The challenge of slums: global report on human settlements. Geneva: UN-HABITAT;2003.
- Newman MJ, Wu JY, Coughlin RT, Murphy CI, Seals JR, Wyand MS, et al. Immunogenicity and toxicity testing of an experimental HIV-1 vaccine in nonhuman primates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1992;8(8):1413–8.
- Newman MJ, Wu JY, Gardner BH, Munroe KJ, Leombruno D, Recchia J, et al. Saponin adjuvant induction of ovalbumin-specific CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses. *J Immunol*. 1992;148(8):2357–62.
- O'Hagan DT, Singh M. Microparticles as vaccine adjuvants and delivery systems. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2(2):269–83.
- O'Quinn DB, Palmer MT, Lee YK, Weaver CT. Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense. *Adv Immunol*. 2008;99:115–63.
- Óbitos por Leptospirose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2007 a 2016. Sinan/SVS/MS. Acesso em 10 de junho de 2016. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/07/Obitos-Lepto-2007-a-2016.pdf>
- Organization WH. Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control. Geneva, Switzerland: WHO; 2002.
- Organization WH. Report of the First Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology. WHO; 2010.
- Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med*. dezembro de 2013;19(12):1597–608.
- Reference Group Geneva: World Health Organization; 2010.
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2000;85(1):9-18, 21.
- Osborn A, Goss RJM, Field RA. The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat Prod Rep*. 2011;28(7):1261–8.
- Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, et al. The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol*. 2011;187(10):5320–7.
- Palaniappan RUM, Ramanujam S, Chang Y-F. Leptospirosis: pathogenesis, immunity, and diagnosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2007;20(3):284–92.

Parsonage G, Filer A, Bik M, Hardie D, Lax S, Howlett K, et al. Prolonged, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent, neutrophil survival following rheumatoid synovial fibroblast activation by IL-17 and TNFalpha. *Arthritis Res Ther*. 2008;10(2):R47.

Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med*. 2005;11(4 Suppl):S63-68.

Pearse MJ, Drane D. ISCOMATRIX adjuvant: a potent inducer of humoral and cellular immune responses. *Vaccine*. 2004;22(19):2391-5.

Perrie Y, Kirby D, Bramwell VW, Mohammed AR. Recent developments in particulate-based vaccines. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2007;1(2):117-29.

Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm*. 2008;364(2):272-80.

Petersen AM, Boye K, Blom J, Schlichting P, Krogh KA. First isolation of *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge from two human patients with Weil's syndrome. *J Med Microbiol*. 2001;50(1):96-100.

Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. 2004;82(5):488-96.

Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Med Mal Infect*. 2013;43(1):1-9.

Pino O, Martin M, Michalek SM. Cellular mechanisms of the adjuvant activity of the flagellin component FljB of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium to potentiate mucosal and systemic responses. *Infect Immun*. 2005;73(10):6763-70.

Pulendran B, Ahmed R. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell*. 2006;124(4):849-63.

Qi Y, Kang H, Zheng X, Wang H, Gao Y, Yang S, et al. Incorporation of membrane-anchored flagellin or *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit enhances the immunogenicity of rabies virus-like particles in mice and dogs. *Front Microbiol*. 2015;6:169.

Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gordon K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med*. 2006;203(2):413-24.

Rady HF, Dai G, Huang W, Shellito JE, Ramsay AJ. Flagellin Encoded in Gene-Based Vector Vaccines Is a Route-Dependent Immune Adjuvant. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0148701.

Ragupathi G, Gardner JR, Livingston PO, Gin DY. Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10(4):463-70.

- Relyveld EH, Ickovic MR, Hénocq E, Garcelon M. Calcium phosphate adjuvanted allergens. *Ann Allergy*. 1985;54(6):521–9.
- Riedl K, Riedl R, von Gabain A, Nagy E, Lingnau K. The novel adjuvant IC31 strongly improves influenza vaccine-specific cellular and humoral immune responses in young adult and aged mice. *Vaccine*. 2008;26(27–28):3461–8.
- Rodriguez-Gonzalez I, Fillonneau C, Blanchet B, Suard I, Catilina P, Andre-Fontaine G. [Efficacy of Spirolept vaccine against human leptospirosis as estimated by passive protection of laboratory rodents]. *Med Mal Infect*. 2004;34(5):196–200.
- Ruddy MJ, Shen F, Smith JB, Sharma A, Gaffen SL. Interleukin-17 regulates expression of the CXC chemokine LIX/CXCL5 in osteoblasts: implications for inflammation and neutrophil recruitment. *J Leukoc Biol*. 2004;76(1):135–44.
- Rudin CM, Thompson CB. B-cell development and maturation. *Semin Oncol*. 1998;25(4):435–46.
- Sanders MT, Brown LE, Deliyannis G, Pearse MJ. ISCOM-based vaccines: the second decade. *Immunol Cell Biol*. 2005;83(2):119–28.
- Santner-Nanan B, Wagner S, Wolf M, Kneitz B, Hünig T, Schimpl A. In vitro skewing of TCR transgenic CD4+ T cells from interleukin-2 deficient mice towards Th1 and Th2 in the absence of exogenous interleukin-2. *Eur Cytokine Netw*. 1998;9(3 Suppl):17–25.
- Sbrogio-Almeida ME, Ferreira LC. Flagellin expressed by live Salmonella vaccine strains induces distinct antibody responses following delivery via systemic or mucosal immunization routes. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2001;30(3):203–8.
- Schorle H, Holtschke T, Hünig T, Schimpl A, Horak I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*. 1991;352(6336):621–4.
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. fevereiro de 2004;75(2):163–89.
- Schwendener RA, Ludewig B, Cerny A, Engler O. Liposome-based vaccines. *Methods Mol Biol*. 2010; 605:163–75.
- Sharp FA, Ruane D, Claass B, Creagh E, Harris J, Malyala P, et al. Uptake of particulate vaccine adjuvants by dendritic cells activates the NALP3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(3):870–5.
- Shi Y, HogenEsch H, Regnier FE, Hem SL. Detoxification of endotoxin by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine*. 2001;19(13–14):1747–52.

Shimada M, Andoh A, Hata K, Tasaki K, Araki Y, Fujiyama Y, et al. IL-6 secretion by human pancreatic peri-acinar myofibroblasts in response to inflammatory mediators. *J Immunol.* 2002;168(2):861–8.

Silva EF, Medeiros MA, McBride AJA, Matsunaga J, Esteves GS, Ramos JGR, et al. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine.* 2007;25(33):6277–86.

Singh M, O'Hagan D. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol.* 1999;17(11):1075–81.

Singh M, O'Hagan DT. Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharm Res.* 2002;19(6):715–28.

Sjölander A, Cox JC, Barr IG. ISCOMs: an adjuvant with multiple functions. *J Leukoc Biol.* 1998;64(6):713–23.

Sjölander A, Drane D, Maraskovsky E, Scheerlinck JP, Suhrbier A, Tennent J, et al. Immune responses to ISCOM formulations in animal and primate models. *Vaccine.* 2001;19(17–19):2661–5.

Skountzou I, Martin M del P, Wang B, Ye L, Koutsonanos D, Weldon W, et al. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine.* 2010;28(24):4103–12.

Sokolovska A, Hem SL, HogenEsch H. Activation of dendritic cells and induction of CD4(+) T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine.* 2007;25(23):4575–85.

Song L, Xiong D, Hu M, Kang X, Pan Z, Jiao X. Immunopotential of Different Adjuvants on Humoral and Cellular Immune Responses Induced by HA1-2 Subunit Vaccines of H7N9 Influenza in Mice. *PLoS ONE.* 2016;11(3):e0150678.

Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine.* 2011;29(17):3341–55.

Stewart VA, McGrath SM, Dubois PM, Pau MG, Mettens P, Shott J, et al. Priming with an Adenovirus 35-Circumsporozoite Protein (CS) Vaccine followed by RTS,S/AS01B Boosting Significantly Improves Immunogenicity to Plasmodium falciparum CS Compared to That with Either Malaria Vaccine Alone. *Infect Immun.* 2007;75(5):2283–90.

Sun H-X, Xie Y, Ye Y-P. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine.* 2009;27(12):1787–96.

Sun H-X, Xie Y, Ye Y-P. ISCOMs and ISCOMATRIX. *Vaccine.* 2009;27(33):4388–401.

Takeuchi O, Akira S. Genetic approaches to the study of Toll-like receptor function. *Microbes Infect.* 2002;4(9):887–95.

- Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(4):625–35.
- Tandrup Schmidt S, Foged C, Smith Korsholm K, Rades T, Christensen D. Liposome-based adjuvants for subunit vaccines: formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. *Pharmaceutics*. 2016;8(1):7.
- Trevejo RT, Rigau-Pérez JG, Ashford DA, McClure EM, Jarquín-González C, Amador JJ, et al. Epidemic leptospirosis associated with pulmonary hemorrhage-Nicaragua, 1995. *J Infect Dis*. 1998;178(5):1457–63.
- Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine*. 26 de maio de 2009;27(25–26):3331–4.
- Vaughn DW, Seifert H, Hepburn A, Dewe W, Li P, Drame M, et al. Safety of AS03-adjuvanted inactivated split virion A(H1N1)pdm09 and H5N1 influenza virus vaccines administered to adults: pooled analysis of 28 clinical trials. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(10):2942–57.
- Vangala A, Kirby D, Rosenkrands I, Agger EM, Andersen P, Perrie Y. A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant systems for protein subunit vaccines: characterisation, environmental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(6):787–99.
- Vartak A, Sucheck SJ. Recent Advances in Subunit Vaccine Carriers. *Vaccines (Basel)*. 2016;4(2).
- Vernel-Pauillac F, Merien F. Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun*. 2006;74(7):4172–9.
- Vogel FR, Powell MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients. *Pharm Biotechnol*. 1995;6:141–228.
- Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, Manini I, Nuti S, Tavarini S, et al. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*. 2008;26(4):552–61.
- Wen Y, Shi Y. Alum: an old dog with new tricks. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5:e25.
- Xiang SD, Scalzo-Inguanti K, Minigo G, Park A, Hardy CL, Plebanski M. Promising particle-based vaccines in cancer therapy. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(7):1103–19.
- Xu Y, Zhang N-Z, Wang M, Dong H, Feng S-Y, Guo H-C, et al. A long-lasting protective immunity against chronic toxoplasmosis in mice induced by recombinant rhoptry proteins encapsulated in poly (lactide-co-glycolide) microparticles. *Parasitol Res*. 2015;114(11):4195–203.

Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006;108(9):3168–75.

Zaman M, Good MF, Toth I. Nanovaccines and their mode of action. *Methods*. 2013;60(3):226–31.

Zolnik BS, González-Fernández A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. Nanoparticles and the immune system. *Endocrinology*. 2010;151(2):458–6.

Zuerner RL, Alt DP, Palmer MV, Thacker TC, Olsen SC. A *Leptospira borgpetersenii* serovar Hardjo vaccine induces a Th1 response, activates NK cells, and reduces renal colonization. *Clin Vaccine Immunol*. 2011;18(4):684–91.

9. Apêndices e/ou Anexos

Considerações sobre Aspectos Éticos:

Este projeto cumpre os requisitos da Comissão de Ética em Experimentação Animal - **PROTOCOLO - CEUA LW-18/13**. Os animais utilizados neste projeto foram tratados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de Referência



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-18/13

Certificamos que o protocolo (P-63/12-2), intitulado "Estudo comparativo de novos adjuvantes", sob a responsabilidade de GABRIELA DOS SANTOS ESTEVES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 11/03/2017 e inclui o uso total de :

Oryzotagus cuniculus

- 32 Machos de Nova Zelândia, Peso: 2,0000 Kilo(s).

Mus musculus

- 1950 Fêmeas de BALB/c An, Idade: 6 Semana(s), Peso: 30,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 11 de março de 2013

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA

Octavio A. F. Presgrave
Coordenador
CEUA/FIOCRUZ
SIAPE 04626550

