

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

**Novos adjuvantes: determinação da resposta imune humoral induzida pela
xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni 106**

Rodrigo Andrade Schuch

Pelotas, 2014

RODRIGO ANDRADE SCHUCH

Novos adjuvantes: determinação da resposta imune humoral induzida pela xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni 106

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin

Orientador de Estágio: Prof. Dr.^a Daiane Drawanz Hartwig

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S384n Schuch, Rodrigo Andrade

Novos adjuvantes: determinação da resposta imune humoral induzida pela xantana produzida por *Xantomonas arboricola* pv pruni 106 / Rodrigo Andrade Schuch. – 62f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Odir Antonio Dellagostin ; coorientadora Daiane Drawanz Hartwig .

BANCA EXAMINADORA

MSc. Francisco Silvestre Brilhante Bezerra, Universidade Federal de Pelotas

Dr. Marcelo Mendonça, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin, Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha família. Sem eles, não teria chegado até aqui”.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec, pela oportunidade de realizar um curso de graduação de qualidade;

Ao meu orientador de estágio, Prof. Odir Antônio Dellagostin, pela orientação e oportunidade de estágio no início do curso, fundamental na minha formação, sendo um exemplo de competência e profissionalismo;

À minha orientadora de estágio, Daiane Drawanz Hartwig, pela paciência, cobrança e confiança em mim depositada durante a realização dos experimentos, pelo incentivo e por todos os conhecimentos que me foram transmitidos durante estes 4 anos;

Aos meus pais, Dalva e Paulo, e aos meus irmãos Ana e Daniel, por serem o alicerce dessa conquista, pela minha formação, pelos princípios que me transmitem todos os dias e pelo amor incondicional;

Aos meus grandes amigos da 3ª Turma de Biotecnologia, por terem compartilhado comigo momentos únicos. Em especial, aos amigos Mariana, Fernanda, Carlus, Hugo, Drielly, Carol, Lucas, Renan e Arthur. Obrigado pelos momentos de trabalhos e de estudos intensos, bem como pelos momentos fundamentais da descontração, das festas e da cerveja gelada;

Aos meus grandes amigos da 4ª Turma de Biotecnologia, turma a qual irei me formar e tenho orgulho de fazer parte. Em especial, aos amigos Daniele, Gregori, Natasha e Arthur, por todos os momentos vividos juntos no último ano;

Aos colegas do Laboratório de Imunodiagnóstico, pela ajuda durante os experimentos realizados, em especial ao Leonardo, Thaís e Prof.^a Cláudia;

Aos colegas do Laboratório de Vacinologia, pela ajuda durante a graduação, estímulo e pelo convívio agradável. Em especial, a Thaís, pela ajuda e amizade durante os anos de trabalho juntos;

Aos funcionários do Biotério Central pela dedicação, disponibilidade e cuidados com os animais de experimentação, fundamentais neste e em outros trabalhos;

Aos demais amigos, colegas, funcionários e professores do Núcleo de Biotecnologia pela boa convivência, amizade e aprendizado;

À FAPERGS pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

Muito Obrigado!

Resumo

SCHUCH, Rodrigo Andrade. **Novos adjuvantes: determinação da resposta imune humoral induzida pela xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* 106**. 2014. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O sucesso na produção de novas vacinas capazes de gerar memória imunológica está diretamente relacionado ao antígeno, mas também à característica do adjuvante, responsável pelo acréscimo e direcionamento da resposta imune. Dessa forma, o desenvolvimento de novos adjuvantes é primordial para área de vacinologia. Dentre os diversos compostos candidatos, destacam-se os polissacarídeos, como por exemplo, a xantana. A goma xantana é um polissacarídeo extracelular complexo produzido pela bactéria patogênica *Xanthomonas campestris*, comumente encontrada infectando plantas e, apesar desta goma ter sido testada como adjuvante, não é conhecido como ocorre a modulação da resposta imune induzida por essa molécula. Assim, no presente trabalho buscamos determinar o fenótipo da resposta imune humoral induzida pela xantana como um adjuvante vacinal. Para isso, camundongos BALB/c foram imunizados com o antígeno ovalbumina, utilizado como modelo, junto com xantana e Alhydrogel, administrados em duas doses com 14 dias de intervalo. A resposta de anticorpos dos isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 foi avaliada através de ELISA. As formulações vacinais contendo ovalbumina-xantana foram capazes de induzir títulos de anticorpos IgG1 maiores, quando comparados a ovalbumina sem adjuvante ($P < 0.001$). Em paralelo, o ensaio MTT realizado para avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células NIH/3T3 de fibroblastos de camundongos demonstrou que o polissacarídeo xantana não alterou a viabilidade celular. Em conclusão, o uso de xantana como adjuvante foi capaz de estimular resposta imunológica do tipo humoral por IgG1.

Palavras-chave: Vacinas, novos adjuvantes, xantana, imunomodulação.

Abstract

SCHUCH, Rodrigo Andrade. **New adjuvants: determining the humoral immune response induced by xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* 106**. 2014. 61f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The successful production of new effective vaccines that generate immunological memory is directly related to the adjuvant feature, responsible for the increase and for directing the immune response. Thus, the development of novel adjuvants is essential for vaccinology. Among several candidate compounds for new adjuvants, there are special attention polysaccharides, such as xanthan. Xanthan gum is a complex extracellular polysaccharide produced by pathogenic bacterium of plants *Xanthomonas* spp. Although it has been tested as an adjuvant, the immunomodulatory mechanism of immune response generated by this polysaccharide has not been described. In the present work, we determined the phenotype of the humoral immune response induced by xanthan as a vaccine adjuvant. BALB/c mice were immunized with xanthan or with Alhydrogel in combination with ovalbumin, using the immunization regimen of two doses. The humoral response, IgG1, IgG2a, IgG2b and IgG3 were evaluated by ELISA. The vaccine formulations containing ovalbumin-xanthan were able to induce higher antibody responses when compared to IgG1 induced by ovalbumin without adjuvant ($P < 0.001$). In parallel, the MTT assay carried out to evaluate *in vitro* cytotoxicity of NIH/3T3 mouse fibroblasts cells showed that the xanthan polysaccharide does not alter cell viability. In conclusion, the use of xanthan gum as an adjuvant was capable of inducing humoral immune response by IgG1.

Keywords: Vaccines, new adjuvants, xanthan, immunomodulation

Lista de Figuras

Figura 1: Avaliações pré-clínicas de adjuvantes <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	23
Figura 2: Mecanismos de ação dos adjuvantes	26
Figura 3: Estrutura do polissacarídeo extracelular de <i>X. campestris</i>	35
Figura 4: Citotoxicidade da solução aquosa de xantana	43
Figura 5: Estimativa de adsorção do antígeno por SDS-PAGE 12%	44
Figura 6: Indução da resposta imune humoral das subclasses de anticorpos	45

Lista de Tabelas

Tabela 1: Considerações sobre o adjuvante ideal	24
Tabela 2: Adjuvantes usados ou testados clinicamente	27
Tabela 3: Umidade, cinzas, nitrogênio, acetil e conteúdo de piruvato (%w/v) de xantana produzido por <i>X. arboricola</i> pv. <i>pruni</i> 106	42

Lista de Abreviaturas e Siglas

CDTec	Centro de Desenvolvimento Tecnológico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
µL	Microlitro
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
L	Litro
g	Grama
<i>g</i>	Força de gravidade
w/v	Peso/volume
°C	Graus Celsius
Min	Minutos
Nm	Nanômetro
BCG	Bacilo Calmette–Guérin
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
APC	<i>Antigen-presenting cell</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
RRP	Receptores de reconhecimento de padrões
NK	Células <i>natural killer</i>
CTL	Célula T citotóxica
DC	Células dendríticas
T CD4 ⁺	Célula T CD4 positiva
T CD8 ⁺	Célula T CD8 positiva
T _H 1	Célula T _H 1 auxiliar
T _H 2	Célula T _H 2 auxiliar

IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-18	Interleucina 18
Fc γ R	Receptor Fc gama
INF- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LPS	Lipopolissacarídeo
PNG	Peptideoglicano
MDP	Muramildipeptideo
dsRNA	RNA de dupla fita
IM	Molécula estimulatória
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
PF	Formulação de partícula
CFA	<i>Complete Freund's adjuvant</i>
ISCOMs	<i>Immune Stimulating Complexes</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
NOD- <i>like</i>	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain receptors</i>
RIG-I- <i>like</i>	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i>
CD40	<i>Cluster of differentiation 40</i>
CD80	<i>Cluster of differentiation 80</i>
CD86	<i>Cluster of differentiation 86</i>
CD1d	<i>Cluster of differentiation 1d</i>
OVA	Ovalbumina

BCA	Ácido bicinconínico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
BALB/c	Espécie de camundongo albino
NIH/3T3	Linhagem 3T3 de fibroblastos de camungondos BALB/c
CHO	Células de ovário de hamster chinês
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	Tampão fosfato-salino
PBS-T	Tampão fosfato-salino com 0,05% de Tween 20
APIs	Ingredientes farmacêuticos ativos
TDB	Dibehenato de trealose
TMB	3,3,5,5'-tetrametilbenzidina
LigA	<i>Leptospiral immunoglobulin-like</i>

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Lista de Abreviaturas e Siglas

1. Introdução	17
2. Revisão Bibliográfica	18
2.1. Histórico: Vacinas clássicas e de nova geração	18
2.2. Vacinas de subunidade e a importância dos adjuvantes	21
2.3. Desafios no desenvolvimento de novos adjuvantes	21
2.4. Classificação e mecanismos de ação de adjuvantes	25
2.5. Desenvolvimento de adjuvantes e formulações	27
2.5.1. Sais de Alumínio	28
2.5.2. Emulsões	29
2.5.3. Adjuvante completo de Freund	30
2.5.4. ISCOMS	31
2.5.5. Agonistas de receptores TLR	32
2.5.6. Polímeros naturais	33
2.6. Polissacarídeo xantana	35
3. Objetivos	37
3.1. Objetivos gerais	37
3.2. Objetivos específicos	37
4. Materiais e métodos	38
4.1. Produção e purificação do polissacarídeo xantana	38
4.2. Testes de citotoxicidade do polissacarídeo <i>in vitro</i>	38
4.3. Animais	39
4.4. Imunizações	40

4.5.	Quantificação de ovalbumina adsorvida no regime de imunização	40
4.6.	Avaliação de anticorpos anti-ovalbumina por ELISA	40
4.7.	Análises estatísticas	41
5.	Resultados	42
5.1.	Caracterização do polissacarídeo xantana	42
5.2.	Quantificação de ovalbumina adsorvida no regime de imunização	43
5.3.	Avaliação de anticorpos anti-ovalbumina por ELISA	44
6.	Discussão	46
7.	Considerações finais	51
8.	Conclusões	51
9.	Referências	52

1. Introdução

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Vacinologia do Centro de Biotecnologia, filiado ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas, coordenado pelo Prof. Dr. Odir Antonio Dellagostin, em cooperação com o Laboratório de Biopolímeros, coordenado pela Prof.^a Claire Vendruscolo e Prof.^a Angelita Moreira, Laboratório de Imunodiagnóstico, coordenado pela Prof.^a Cláudia Hartleben e Laboratório de Microbiologia, do Instituto de Biologia (IB-UFPel), coordenado pela Prof.^a Daiane Hartwig. As principais linhas de pesquisa do laboratório incluem o desenvolvimento de vacinas recombinantes e testes de diagnóstico contra *Leptospira interrogans*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycobacterium tuberculosis*, além de estudos envolvendo imunologia básica e aplicada, como a caracterização de novos adjuvantes.

A vacinação é considerada o método mais eficiente no combate e erradicação de doenças infecciosas. Além de antígenos específicos contra determinado patógeno, outro constituinte importante presente nas vacinas são os adjuvantes, responsáveis pela modulação da resposta imune induzida por tais antígenos. Assim, novos adjuvantes podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e capazes de gerar memória imunológica contra patógenos. Dentre os novos candidatos, estão os polissacarídeos, incluindo a xantana, a qual possui propriedades imunoestimulatória e adjuvante. Nesse sentido, este trabalho de conclusão de curso propõe a avaliação do polissacarídeo xantana, produzido pela bactéria *Xanthomonas arboricola* pv. Pruni 106, quanto à sua capacidade adjuvante, mais especificamente na indução de anticorpos específicos, e também de sua segurança, através da avaliação do efeito citotóxico *in vitro*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Histórico: Vacinas clássicas e de nova geração

Durante os últimos três séculos, a história da humanidade viu-se transformada por tecnologias nas mais diversas áreas do conhecimento. Dentro desse contexto, encontra-se o desenvolvimento das vacinas. Sendo considerada uma das grandes revoluções modernas, é responsável por promover o aumento da expectativa de vida, a erradicação de infecções e a diminuição da pobreza em países de baixa renda (MONATH, 2011; RAPPUOLI, 2011).

O crescimento da população humana, deslocamento global e as alterações dos ecossistemas do nosso planeta favorecem o surgimento de doenças infecciosas. Durante os últimos 30 anos, foram identificadas mais de 30 infecções emergentes ou re-emergentes. Destacam-se doenças anteriormente não conhecidas como síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), a síndrome respiratória aguda grave, a gripe aviária e suína e doenças denominadas re-emergentes, como o antraz, cólera, dengue, difteria, ebola, malária e tuberculose. Devido a essas circunstâncias, o desenvolvimento de novas tecnologias relativas a vacinação mostram-se como uma das necessidades prioritárias neste começo do século XXI (RAPPUOLI, R.; MILLER; FALKOW, 2002).

A história da vacinologia tem seu início em 1796 através das descobertas feitas por Edward Jenner sobre o vírus da varíola bovina (*vaccinia*). Através de um processo de inoculação do vírus entre as espécies, obteve sucesso em seus ensaios com a geração de proteção contra a doença em humanos. A este procedimento foi dado o nome de vacinação, termo utilizado até hoje para descrever a inoculação de micro-organismos enfraquecidos, atenuados ou porções destes, em indivíduos

sadios, a fim de obter proteção contra as doenças por eles causadas (BAZIN, 2011 apud JENNER, 1798). Em 1880, os conhecimentos acerca dos métodos de atenuação de micro-organismos evoluíram devido às descobertas de Louis Pasteur, o qual explorou o cultivo de *Pasteurella multocida*, agente causador da Cólera em aves (CADEDDU, 1985).

Na última década do século XIX, o desenvolvimento das vacinas começou a ser explorado como ciência. Através dos estudos de Daniel Salmon e Theobald Smith sobre métodos para inativação de bactérias inteiras, demonstraram seu potencial na utilização como bacterinas. Em seguida, a descoberta de toxinas bacterianas, a produção de antitoxinas e a percepção de que o soro imune contém substâncias (anticorpos) que neutralizam toxinas ou a replicação microbiana contribuíram no estudo da patogenicidade dos agentes infecciosos (PLOTKIN, 2011 apud SALMON, 1886). Além disso, vacinas compostas por células inteiras inativadas contra o tifo, cólera e praga foram produzidas e testadas (PLOTKIN, 2011).

No início do século XX, foi descoberto que a passagem de organismos em hospedeiros não-naturais acarreta em uma seleção de cepas avirulentas. Assim, Albert Calmette e Camille Guérin desenvolveram a vacina bacilo Calmette–Guérin (BCG), através de passagens seriadas *in vitro* do micro-organismo *Mycobacterium bovis*, demonstrando em ensaios *in vivo* que os mutantes resultantes desse processo são capazes de proteger animais contra o *Mycobacterium tuberculosis*, causador da tuberculose humana (PLOTKIN, 2011 apud CALMETTE; GUÉRIN, 1914). Ao mesmo tempo, outra importante vacina entrou em uso contra *Bordetella pertussis*. As primeiras vacinas contra *B. pertussis* eram compostas de células bacterianas inteiras inativadas, gerando proteção através da produção de anticorpos aglutinantes (PLOTKIN, 2011 apud MADSEN, 1933). Mais tarde, no século XX, os antígenos bacterianos que induziam resposta humoral protetora foram identificados,

e vacinas acelulares contendo estas proteínas substituíram a antiga vacina em muitos países (SATO, 1981).

Porém, a idade de ouro da vacinologia foi lançada por um avanço metodológico em meados do século XX: o crescimento de vírus em cultura de células. Pioneiros desta técnica, John Enders, Frederick Robbins e Thomas Weller conseguiram rapidamente aplicá-la ao desenvolvimento de vacinas (PLOTKIN, 2011 apud ENDERS; WELLER; ROBBINS, 1949), possibilitando a produção de vacinas contra o vírus Influenza (MAASSAB; DEBORDE, 1985) e contra pólio, com o vírus inativado (PLOTKIN, 2011 apud SALK, 1954) ou vivo (PLOTKIN, 2011 apud SABIN; HENNESSEN; WINSSER, 1954). Em ambos os casos, entendia-se que a resposta protetora contra os três tipos de poliovírus dependia da produção de anticorpos. Nas décadas de 60, outras vacinas clássicas foram produzidas contra o vírus do sarampo, caxumba e rubéola (PLOTKIN, 2011).

Ao longo dos anos 80, duas estratégias importantes foram desenvolvidas e permitiram ainda mais o avanço na área de vacinologia: (1) A conjugação de proteínas com polissacarídeos capsulares de bactérias, a qual permitiu o desenvolvimento de vacinas contra *Haemophilus influenzae* tipo b, (PLOTKIN, 2011 apud PARKE, 1977), *Neisseria meningitidis* grupos A, B, Y e W135 (PLOTKIN, 2011 apud GOTSCHLICH; LIU; ARTENSTEIN, 1969) e múltiplos sorotipos de *Streptococcus pneumoniae* (PLOTKIN, 2011 apud AUSTRIAN, 1976); e (2) a engenharia genética, tendo sua primeira vacina desenvolvida contra o vírus da Hepatite B através da expressão de genes para antígenos de superfície (MCALEER, 1984), dando início a nova era da vacinologia, a qual se move no sentido do desenvolvimento de antígenos a partir de proteínas e peptídeos recombinantes purificados.

2.2. Vacinas de subunidade e a importância dos adjuvantes

Nas últimas décadas, pesquisas na área de vacinologia vêm apontando como alternativa a utilização de partículas virais ou subunidades de antígenos recombinantes como promissoras tecnologias, tanto para uso profilático, quanto terapêutico. Porém, a imunização com antígenos purificados normalmente resulta na indução de uma resposta de anticorpos modesta, com pouca ou nenhuma resposta mediada por células T, indispensável para resposta imune protetora contra alguns patógenos e geração de memória imunológica. Assim, a eficiência dessas vacinas acaba sendo limitada por, muitas vezes, não possuírem capacidade imunoestimulatória capaz de desencadear uma resposta específica, eficiente e de longa duração (REED, 2013).

Para aumentar a imunogenicidade de vacinas, existem os denominados adjuvantes. A palavra adjuvante deriva de *adjuvare*, do latim, "socorrer" ou "reforçar". Portanto, são substâncias que tem a habilidade de potencializar o efeito imunogênico de um determinado antígeno, preferencialmente com pequeno ou nenhum efeito colateral (DE GREGORIO, 2013).

2.3. Desafios no desenvolvimento de novos adjuvantes

Ao mesmo tempo, a produção e avaliação de adjuvantes vêm sendo um desafio para pesquisadores e empresas de biotecnologia. As vacinas contendo novas formulações de adjuvantes estão em avanço aos estágios de desenvolvimento e licenciamento, as quais proporcionarão novas ferramentas para preencher necessidades clínicas não satisfeitas anteriormente (REED et al., 2013). Apesar de alguns adjuvantes serem aprovados para utilização em formulações vacinais de uso humano (Alum, MF59, ASO3, ASO4, e lipossomos), a grande

maioria dos que se encontram em fase de pesquisa vem sendo associados a reações adversas, como hipersensibilidades, e até desenvolvimento de doenças autoimunes, limitando sua aplicação. Além disso, diferenças entre os modelos animais utilizados acabam, muitas vezes, dificultando o desenvolvimento de novos adjuvantes a partir de processos biotecnológicos, o que torna necessários estudos clínicos adequados para sua aprovação (MBOW et al., 2010).

O camundongo é o modelo pré-clínico mais utilizado, embora existam algumas diferenças significativas entre seu sistema imunológico e o de humanos. Por exemplo, os receptores do tipo TLR (*Toll Like Receptors*), importantes na resposta inicial contra patógenos e crucial para ativação de células apresentadoras de antígenos (APCs) na transição da imunidade inata para adaptativa, podem ser expressos nas células do sistema imune de formas diferentes entre as espécies (MESTAS, 2004; HUGHES, 2004). O receptor TLR4 é expresso em níveis significativos em células B de camundongos, porém em baixos níveis em células B humanas, em condições normais (BEKEREDJIAN-DING, 2009). Apesar dessas diferenças, as informações geradas utilizando esse modelo são de fundamental importância para estudo da imunologia básica e aplicada relativos à vacinas e adjuvantes.

Em paralelo, os estudos *in vitro* possibilitam a investigação de algumas características dos adjuvantes em culturas de células, fornecendo informações valiosas que são combinadas aos ensaios pré-clínicos. A utilização de células primárias humanas estão em uso para avaliação tanto de adjuvantes quanto vacinas, em particular, as células dendríticas derivadas de monócitos (SPISEK, 2004), indicando indiretamente aspectos relativos de segurança e imunogenicidade (Fig. 1).

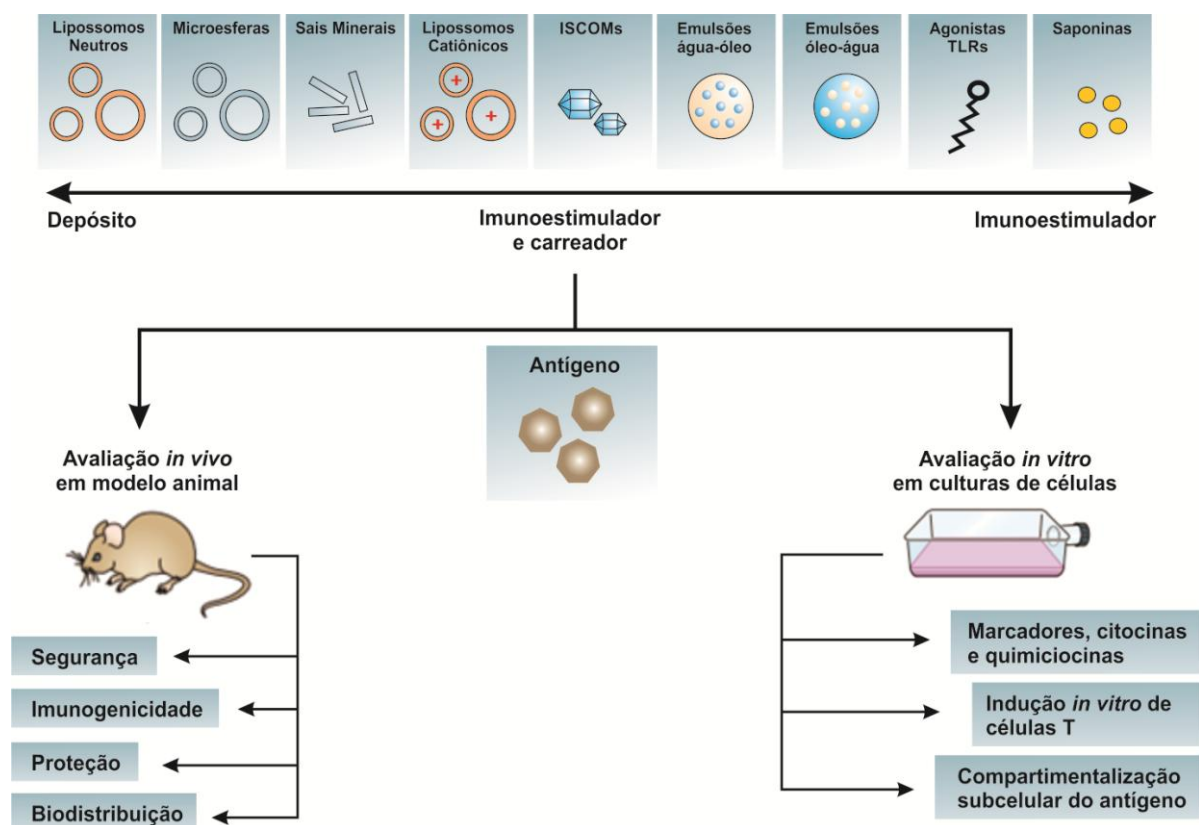


Figura 1: Avaliações pré-clínicas de adjuvantes *in vivo* e *in vitro*. Além dos ensaios pré-clínicos em modelos animais, também é necessário avaliar sua ação sobre cultura de células *in vitro*, particularmente em células apresentadoras de antígenos. (Adaptado de GUY, 2007).

Além da eficácia e imunogenicidade, existem outros fatores que afetam a capacidade de formulações de adjuvantes irem além dos estudos pré-clínicos. Dentre eles, inclui-se possuir características químicas e biológicas definidas e estáveis. Isso significa que sua formulação deverá ser biodegradável e biocompatível, assegurando assim, segurança e reprodutibilidade da resposta imunológica em indivíduos vacinados, devendo ser documentada qualquer questão relativa a efeitos colaterais imediatos e de longo prazo (GUY, 2007). As principais características desejáveis em um adjuvante estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Considerações sobre o adjuvante ideal*.

Categoria	Subcategoria	Consideração
Atividade biológica	Segurança	Formulações devem ser seguras e efetivas em todos os grupos etários, compostos por substâncias metabolizáveis; não devem ter efeito direto sobre linfócitos: sem respostas celulares inespecíficas B ou T
	Rota de imunização	Cada formulação pode ter diferentes requisitos quanto à rota de imunização
	Economia de antígeno	Deve ser capaz de diminuir a dose de antígeno ou o número de imunizações
	Ampliação da resposta	Favorecer a proteção contra diferentes cepas heterogêneas de patógenos
	Resposta humoral	Aumentar ou prolongar a resposta através da produção de anticorpos neutralizantes
	Resposta celular	Induzir ou prolongar a resposta contra patógenos por células T CD4 ⁺ e/ou CD8 ⁺
	Qualidade da resposta imune	Promover o balanço correto da resposta imune (T _H 1 versus T _H 2)
	Auxiliar resposta em sistemas imunes debilitados	Aumento da resposta imune em populações muito jovens, idosas ou imunocomprometidas por alguma razão
Aspectos físico-químicos	Materias	Adjuvantes sintéticos são preferíveis devido à pureza, sustentabilidade e segurança; adjuvantes à base de plantas pode ser aceitáveis caso os sintéticos sejam muito caros ou possuam baixa produtividade; os de origem animal devem ser evitados devido a preocupações com doença; múltiplas fontes devem estar disponíveis a um baixo custo; componentes metabolizável ou excretáveis são preferência
	Produção	Equipamentos e processos deve ser escalonáveis, transferíveis e capazes de produzir lotes consistentes
	Morfologia da partícula	Partículas menores do que 200nm podem ser filtradas ao final do processo, evitando o requisito de fabricação asséptica, além de terem acesso aos linfonodos com mais facilidade do que as partículas grandes; a orientação e a forma das partículas não esféricas afeta a absorção celular; carga e estrutura química dos grupos de superfície são fatores cruciais para bioatividade; A presença de moléculas como manose pode aumentar a entrega de antígenos para as APCs
	Compatibilidade com o antígeno	O efeito da formulação do adjuvante na estrutura do antígeno deve ser caracterizado; geralmente, acredita-se que algum grau de associação do antígeno na formulação é preferido, apesar de associação direta não ser necessária para a atividade biológica
	Estabilidade	Excipientes e ingredientes farmacêuticos ativos (APIs) devem manter a estrutura química e do tamanho das partículas, forma, polidispersão e aparência visual constante durante vários anos

*Adaptado de GUY, 2007; O'HAGAN, De GREGORIO, 2009; REED, 2013.

Desta forma, os benefícios do uso de um adjuvante devem superar os riscos. Infelizmente, o desenvolvimento da maioria dos adjuvantes é interrompido ou prejudicado devido a problemas de reatividade ou toxicidade aguda. Além disso, a indução de imunopatologia de longa duração, tais como a autoimunidade, é de difícil avaliação, principalmente em relação aos agonistas de receptores TLR (MARSHAK-ROTHSTEIN, 2006).

2.4. Classificação e mecanismo de ação dos adjuvantes

O termo adjuvante pode ter significados diferentes dependendo de sua aplicação. Por exemplo, sistemas de administração de compostos podem funcionar como adjuvantes por proporcionar a apresentação de antígenos de maneira mais eficaz para o sistema imune. Em contraste, moléculas imunoestimulatórias específicas podem ativar diretamente os receptores imunes inatos, por exemplo, TLRs. Outras formulações podem incluir tanto os sistemas de entrega quanto componentes imunoestimulatórios. Assim, os adjuvantes podem ser classificados em três grupos: sistemas de entrega, moléculas imunomoduladoras e combinações dessas duas classes (REED et al., 2013).

Os adjuvantes podem atuar pelo emprego de um ou vários mecanismos de ação. Dentre eles, inclui-se: liberação controlada do antígeno no sítio de infecção (efeito depósito), estímulo na produção de citocinas e quimiocinas, recrutamento de células relacionadas à resposta imune no sítio de injeção, aumento do ingresso do antígeno nas APCs, bem como sua ativação e posterior migração aos linfonodos periféricos (Fig. 2). Conseqüentemente, podem estimular a produção de intermediários da resposta pró-inflamatória inicial, o aumento da expressão de receptores MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) I e II de células

fagocíticas e modulação de células T CD4⁺ (T_H1 e T_H2) e CD8⁺ citotóxico na transição da imunidade inata para adaptativa, considerado ponto-chave da eficiência de uma vacina (O'HAGAN, 2003).

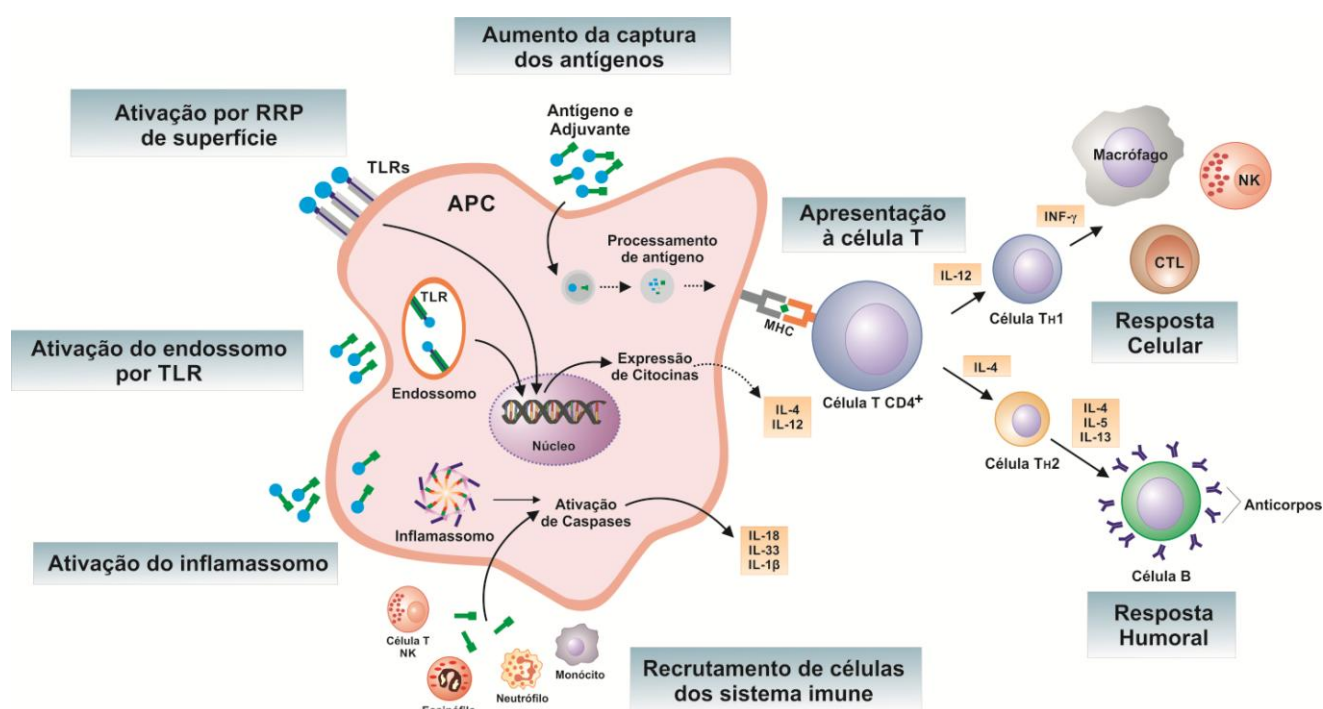


Figura 2: Mecanismos de ação dos adjuvantes. Diferentes tipos de adjuvantes podem atuar na ativação da resposta imune inata através da sinalização via RRP (receptores de reconhecimento de padrões) como os receptores TLRs. Sinalização do receptor pode então ativar fatores de transcrição que induzem a produção de citocinas e quimiocinas que auxiliam diretamente uma resposta imunológica específica do tipo T_H1 ou T_H2, somada a influência das células do sistema imunológico que são recrutadas para o local da injeção. A ativação do inflamassomo também tem sido descrita como um mecanismo de alguns adjuvantes, induzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18. Além disso, podem exercer efeitos de depósito e influenciar a apresentação de antígenos via MHC I ou II. NK, células natural killer; CTL, célula T citotóxica. (Adaptado de REED, 2013).

2.5. Desenvolvimento de adjuvantes e formulações

O desenvolvimento de formulações de adjuvantes vem sendo focado na utilização de nano e micropartículas, lipossomos e outras emulsões (Tab. 2). A estrutura química presente nessas formulações é um fator crucial para estimular o sistema imune, e possuem diversos parâmetros importantes a serem considerados: estabilidade, atividade biológica envolvendo características físico-químicas (tamanho das partículas e polidispersão, de forma, carga de superfície), via de administração, entre outros aspectos (REED et al., 2013).

Diversos adjuvantes vêm sendo estudados de forma extensiva, e devido a esse fato, são a base para comparação da eficácia de novos adjuvantes. Entre os principais, incluem-se os sais de alumínio, emulsões oleosas, adjuvante completo de Freund's (CFA), ISCOMs, agonistas de receptores TLR e polímeros naturais.

Tabela 2: Adjuvantes usados ou testados clinicamente*

Nome do adjuvante	Classe	Mecanismos ou receptor	Tipo de resposta imune	Fase clínica ou nome do produto licenciado
Análogos de dsRNA [poli (I:C)]	IM	TLR3	Anticorpos, T _H 1, células T CD8 ⁺	Fase 1
Análogos de Lipídio A (MPL, RC529, GLA, E6020)	IM	TLR4	Anticorpos, T _H 1	Cervarix, Supravax, Pollinex Quattro, Melacine
Flagelina	IM	TLR5	Anticorpos, T _H 1, T _H 2	Fase 1
Imidazoquiolinas	IM	TLR7 e TLR8	Anticorpos, T _H 1	Aldara
Oligonucleotídeos CpG	IM	TLR9	Anticorpos, T _H 1, células T CD8 ⁺	Fase 3
Saponinas (QS21)	IM	Desconhecido	Anticorpos, T _H 1, T _H 2, células T CD8 ⁺	Fase 3
Ligantes de Lectina tipo C (TD8)	IM	Mincle, Nalp3	Anticorpos, T _H 1, T _H 2, células T CD8 ⁺ e células T NK	Fase 1
Ligante CD1d	IM	CD1d	Anticorpos, T _H 2	Fase 1
Sais de alumínio	PF	Nalp3, ITAM, entrega do antígeno	Anticorpos, T _H 2	Diversos licenciados
Emulsões (MF59, AS03, AF03, SE)	PF	Recrutamento de células, captura de antígeno	Anticorpos, T _H 2	Fluad, Pandemrix

Virossomos	PF	Entrega de antígeno	Anticorpos, T _H 1, T _H 2	Epaxal, Inflexal V
AS01 (MPL, QS21, lipossomo)	C	TLR4	Anticorpos, T _H 1, Células T CD8 ⁺	Fase 3
AS02 (MPL, QS21, emulsão)	C	TLR4	Anticorpos, T _H 1	Fase 3
AS04 (MPL, sais de alumínio)	C	TLR4	Anticorpos, T _H 1	Cervarix
AS15 (MPL, QS21, CpG, lipossomos)	C	TLR4 e TLR9	Anticorpos, T _H 1, Células T CD8 ⁺	Fase 3
GLA-SE (GLA, emulsão)	C	TLR4	Anticorpos, T _H 1	Fase 1
IC31 (CpG, peptídeo catiônico)	C	TLR9	Anticorpos, T _H 1, T _H 2, Células T CD8 ⁺	Fase 1
CAF01 (TD8, lipossomo catiônico)	C	Entrega do antígeno	Anticorpos, T _H 1, Células T CD8 ⁺	Fase 1
ISCOMs (saponina, fosfolipídeos)	C	Desconhecido	Anticorpos, T _H 1, T _H 2, Células T CD8 ⁺	Fase 2

C, Combinação de molécula imunoestimulatório e formulação de partícula; dsRNA, RNA de dupla fita; IM, Molécula estimulatória; ITAM, Imunoreceptor com motivos de ativação tirosina; PF, formulação de partícula; TDB, Dibehenato de Trealose.*Adaptado de REED, 2013.

2.5.1. Sais de Alumínio

Os sais de alumínio, que incluem fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio e hidróxido-fosfato de alumínio, comumente denominados Alum, tiveram seus efeitos adjuvantes reportados pela primeira vez em 1920 e desde então são amplamente utilizados como adjuvantes em formulações de vacinas. Eles consistem em nanopartículas cristalinas que se agregam para formar uma dispersão heterogênea altamente carregada, o que propicia uma adsorção de antígenos ou moléculas imunomoduladoras (KOOL, 2012).

Apesar de milhões de doses de vacinas desse adjuvante terem sido administradas em seres humanos, parece que seus múltiplos mecanismos de ação somente agora começam a ser elucidados. Estudos utilizando microscopia de força atômica demonstram que ele atua facilitando a captura de antígenos pelas células dendríticas (DCs). Contudo, apesar do Alum interagir com as DCs, ele não é internalizado por elas. Na verdade, há a indução de uma reorganização na

membrana lipídicas dessas células, aumentando a captura do antígeno e expressão de moléculas de adesão em células T CD4⁺ (FLACH, 2011). Além disso, o Alum atua nas DCs através da ativação do inflamassomo pela sinalização via NLRP3, (DE GREGORIO; TRITTO; RAPPUOLI, 2008), induzindo também a produção de ácido úrico (KOOL, 2008), tendo como consequência o aumento da produção de IL-1 β e IL-18. A liberação dessas citocinas ativa as DCs, tendo importantes consequências, como o aumento da expressão de citocinas IL-4 e IL-5 pelas DCs ativadas, direcionamento da resposta celular via T_H2 e mobilização de células NKT por sinalização via CD1d (SHAH et al., 2012). Sumariamente, o Alum atua no recrutamento de células para o local da inoculação e estímulo de células, direcionando a resposta celular via T_H2. Porém, o seu completo efeito imunoestimulatório parece envolver múltiplas vias, cuja elucidação requer mais estudos.

O Alum falha na indução de resposta celular do tipo T_H1 pela produção de interferon gama (INF- γ) e células T citotóxicas, requeridas para infecções causadas por micro-organismos intracelulares (KAZZAZ et al., 2006). Ainda, tem sido associado a reações locais severas, como eritema, nódulos subcutâneos e hipersensibilidade de contato (PERRIE et al., 2008). Mesmo assim, esse adjuvante tornou-se referência em estudos que avaliam novas substâncias com potencial adjuvante devido ao seu histórico de segurança em vacinas para humanos.

2.5.2. Emulsões

Da mesma forma, as chamadas emulsões também possuem uma longa história de desenvolvimento, embora até a década de 90 elas não estivessem presentes em vacinas aprovadas. Atualmente, emulsões oleosas são utilizadas para formulações de vacinas para humanos, consistindo em gotículas de óleo

nanométricas, emulsionada com surfactantes biocompatíveis em uma fase aquosa (REED et al., 2013). O MF59 e AS03 são ambas emulsões de óleo-em-água a base em esqualeno, um óleo que é mais facilmente metabolizados do que o óleo de parafina presente no adjuvante de Freund. Estas emulsões estimulam fortes respostas de anticorpos, permitindo menos imunizações e quantidade de antígeno, favorecendo a memória imunológica, com um fenótipo misto de células T T_{H1} e T_{H2} (OTT et al., 1995).

O MF59 é licenciado em grande parte da Europa para o uso em vacinas contra a gripe sazonal. Como resultado, há considerável quantidade de dados comparando a vacinação deste adjuvante com outros disponíveis (MBOW et al., 2010). Seu mecanismo de ação consiste no recrutamento de DCs, granulócitos, e diferenciação de monócitos em DCs (SEUBERT et al., 2008), bem como aumento da captação de antígeno por DCs (AUCOUTURIER et al., 2002).

2.5.3. Adjuvante completo de Freund

O adjuvante completo de Freund (CFA) é uma mistura de *Mycobacterium tuberculosis* ou *M. butyricum* inativadas por calor, onde os antígenos na solução aquosa se encontram emulsificados em óleo parafina. Embora o CFA seja inaceitável para uso humano, os estudos sobre a ação deste potente adjuvante podem fornecer informações úteis no desenvolvimento de novas vacinas. A imunização com antígenos de proteínas em CFA resulta em fortes respostas de células T_{H1} e T_{H17} , que são dependentes de componentes micobacterianos como o peptídeoglicano e requerem sinalização via MyD88 das células do hospedeiro através de receptores IL-1R para o aumento de respostas de células T (MAYER-BARBER et al., 2010). Embora os componentes micobacterianos do CFA desempenhem um importante papel na indução da imunidade mediada por células,

a emulsificação de antígenos em óleo de parafina ou surfactante sozinho (Adjuvante incompleto de Freund) pode estimular respostas imunes e produção de anticorpos (BILLIAU, 2001).

Apesar da necessidade de mais estudos para elucidar o completo mecanismo de ação desse adjuvante, normalmente estas emulsões causam danos celulares após a inoculação, tendo como consequência a produção de sinais endógenos liberados durante a morte celular por necrose das células nesse local, o qual contribui para sua atividade adjuvante (COFFMAN, ROBERT L. 2010; SHER; SEDER, 2010).

2.5.4. ISCOMS

Os complexos imunostimulatórios (ISCOMs) são nanopartículas compostas por saponinas purificadas a partir da casca da árvore sul-americana *Quillaja saponaria* formulado com colesterol e fosfolipídio. Os antígenos vacinais se encontram na maioria das vezes em suspensão na forma solúvel. Os ISCOMs aparentemente não são reconhecidos por RRP, apesar de aumentarem a adsorção de antígenos e prolongar sua retenção por DCs, podendo promover ambas as respostas humoral e celular do tipo T_H1 , incluindo estímulo de CTLs (GUY, 2007). Porém, devido a sua reatogenicidade, esse adjuvante encontra dificuldades de aprovação. Alguns progressos em relação a esse aspecto foram obtidos com GPI-0100, contendo um derivado da saponina semi-sintética (saponina DS) tem sido alcançado, com duas frações que estimulam respostas celular do tipo T_H1 e T_H2 (MARCIONI, 2003).

Diferentes da maioria dos outros adjuvantes, os ISCOMs parecem ser capazes de auxiliar a apresentação de peptídeos via MHC classe I, e induz uma resposta tanto de células T $CD8^+$ quanto $CD4^+$ a uma variedade de antígenos

solúveis (DAVIS et al., 2004), atuando desestabilizando a membrana endossomal, possibilitando um maior acesso citoplasmático para antígenos em comparação com outras formas de entrega antígeno (SCHNURR et al., 2009).

2.5.5. Agonistas de receptores TLR

Em contraste com os adjuvantes descritos acima, os quais induzem normalmente uma resposta imunológica complexa e ainda não completamente entendida, há um foco crescente na exploração de ligantes bem definidos, sejam naturais ou sintéticos, utilizados como agonistas para RRP, sozinhos ou com várias formulações (DE GREGORIO, 2012).

Esses agonistas simulam as estruturas microbianas conservadas nos patógenos, frequentemente referidas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Esses PAMPs, em geral, desempenham funções importantes na patogenicidade de microrganismos e incluem lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicano (PGN), flagelina e ácidos nucleicos (FRANCHI et al., 2009). Uma série destes adjuvantes estão agora em estágios pré-clínicos ou clínicos de desenvolvimento para múltiplas aplicações e tem sido objeto de investigação para elucidar seu papel na ativação da resposta imune.

A primeira classe de RRP celulares identificados foram os TLRs, localizados na membrana celular externa e de endossomos (AKIRA, 2006). Vacinas que contêm vírus ou bactérias mortos ou atenuados incluem naturalmente componentes que podem ser reconhecidos por TLRs. Este é o caso, por exemplo, da vacina contra a febre amarela, que é baseada em vírus atenuado e é capaz de interagir com pelo menos quatro TLRs (2, 7, 8 e 9) nas células dendríticas do hospedeiro (QUEREC, 2006). Dessa forma, agonistas TLRs e outros RRP são alvos atrativos como adjuvantes vacinais. Outros RRP, no entanto, como os receptores

semelhantes aos domínios de ligação de nucleotídeos e oligomerização (NOD-like) (NLRs), e receptores semelhantes aos induzidos por ácido retinóico (RIG-I-like) também estão presentes nas células do hospedeiro e são potenciais alvos para o desenvolvimento de novos adjuvantes (DE GREGORIO et al., 2013).

2.5.6. Polímeros naturais

Nas últimas décadas, a ciência dos materiais vem crescendo exponencialmente, projetando e desenvolvendo novos biomateriais para aplicações biomédicas. Entre eles, estão inclusos os biopolímeros, promissores candidatos a substituir os atuais materiais devido a sua facilidade de síntese em vários formatos, com boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e biodegradabilidade. Na área da imunologia, a utilização de biopolímeros como adjuvantes pode ativar de maneira efetiva a resposta imune, sendo assim, uma alternativa na substituição dos adjuvantes bacterianos convencionais, incrementando a veiculação de antígenos e dessa forma reduzindo as doses de reforço requeridas para uma resposta imune apropriada (SHAKYA; NANDAKUMAR, 2013).

As estruturas compostas por carboidratos desempenham papéis críticos dentro do sistema imunológico, além da virtude de possuírem um forte histórico de segurança e tolerabilidade devido à fácil biodegradação e biotransformação (REY-LADINO et al., 2011). Portanto, é pouco provável que causem problemas de depósitos em tecido a longo prazo, como visto nos sais de alumínio, em uma condição conhecida como miofascite macrofágica, podendo causar hipotonia e atraso motor e psicomotor (RIVAS et al., 2005).

Numerosos biopolímeros compostos por polissacarídeos obtidos a partir de plantas e micro-organismos foram testados quanto ao seu potencial adjuvante em vacinação ou em imunoterapia contra o câncer. Neste cenário, vários derivados de

dextrano demonstraram ter propriedades imunológicas (BACHELDER et al., 2010), além do lentinano (GUO, 2009), quitosana (PREGO et al., 2010), copolímero de ácidos glicólico e láctico (MOON et al., 2012; SAINI et al., 2011); (FAISAL et al., 2009). Além disso, outros polissacarídeos como o angelan (KIM et al., 2011) e a xantana (TAKEUCHI et al., 2009) se mostraram importantes em terapias antitumorais.

Os adjuvantes vacinais à base de carboidratos podem ser bem distintos, apresentando suas próprias características físico-químicas e atributos imunológicos e de comportamento exclusivas, promovendo uma ampla gama de opções no desenvolvimento de vacinas, com especial interesse nas chamadas glicanas (PETROVSKY, 2011).

As glicanas são polissacarídeos derivados de plantas ou micro-organismos, constituídos de resíduos de D-glicose unidas por ligações glicosídicas, com várias conformações alternativas, sendo subdivididas entre dois tipos: α -glicanas, incluem dextran (α -1,6-glicana), glicogênio (α -1,4- e α -1,6-glicana) e amido (α -1,4- e α -1,6-glicana); e as β -glicanas, incluem celulose (β -1,4-glicana), curdulana (β -1,3-glicana), laminarina (β -1,3- e β -1,6-glicana), lentinano (purificado β -1,6: β -1,3-glicano obtido do cogumelo *Lentinus edodes*), zimosana (β -1,3-glicana de *Saccharomyces*), xantana (β -1,4-glicana), entre outros. O método de produção pode resultar em diferentes estruturas de polímeros com ramificações e tamanhos de cadeias diversos. Assim, esses polissacarídeos apresentam variedades únicas entre eles em termos de qualidade e pureza (PETROVSKY, 2011).

Esses polissacarídeos podem reforçar tanto a imunidade humoral quanto celular. A maioria dos adjuvantes a base de carboidratos, como a zimosana, manana, muramildipeptídeo (MDP; originário de peptideoglicano de micobactéria), atuam através da ligação a receptores específicos da resposta imune inata que

reconhecem PAMPs, incluindo TLRs, NOD2 e *C-type lectins*, cuja ligação resulta na ativação de NF- κ B e produção de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-1 (HUANG et al., 2010; REY-LADINO et al., 2011). Também favorecem aumento da produção de citocinas e moléculas co-estimulatórias, como MHC de classe I e II, CD40, CD80 e CD86 nas APCs (LEE et al., 2001), auxiliando uma resposta específica de células T e B.

2.6. Polissacarídeo Xantana

A goma xantana é um polissacarídeo extracelular complexo produzido pela bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris*, sendo amplamente utilizado como um espessante ou agente de viscosidade em indústrias alimentícias e não alimentícias. Ele é um polímero constituído quimicamente de unidades de β -D-glicose, unidas por ligação 1-4, formando uma cadeia principal celulósica. Na posição C(3) de cada resíduo alternado de glicose existe uma cadeia lateral trissacarídica contendo unidades de β -D-manose-1,4- β -D-ácido glicurônico-1,2- α -D-manose. Um resíduo de ácido pirúvico é ligado na posição 4 e 6, entre 31-56% na β -D-manose terminal, podendo apresentar ainda na posição C(6) manose interna grupos O-acetil (Fig. 3) (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

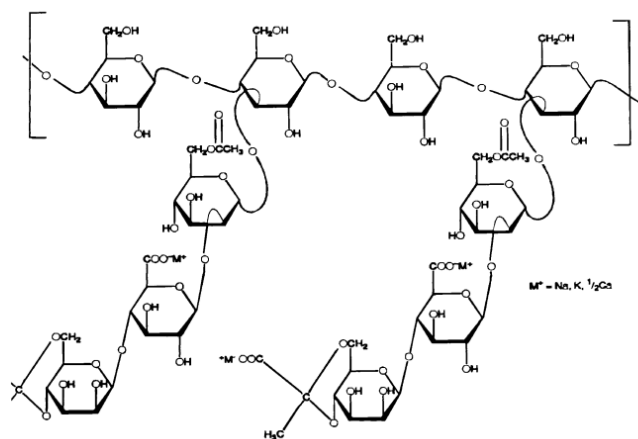


Figura 3: Estrutura do polissacarídeo extracelular de *X. campestris* (GARCÍA-OCHOA et al., 2000)

Esse polissacarídeo desperta grande interesse para as indústrias alimentícia, farmacêutica e petrolífera devido as suas propriedades de emulsificação, suspensão, estabilização e floculação, apresentando capacidade de formar soluções viscosas e géis hidrossolúveis com propriedades únicas (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

As propriedades adjuvantes intrínsecas da goma xantana como ativador de linfócitos murinos foram originalmente descritas na década de 80 (ISHIZAKA et al., 1983). Recentemente, a xantana foi apontada por conter propriedades antitumorais (TAKEUCHI et al., 2009), e utilizada com sucesso em formulações bioadesivas em vacinas nasais contra o vírus Influenza (BERTRAM et al., 2010; CHIOU et al., 2009). Ainda, esse polissacarídeo foi descrito como potencial adjuvante vacinal em vacinas contra Leptospirose, sendo capaz de reforçar a imunogenicidade de antígenos recombinantes e gerar proteção contra cepas patogênicas de *Leptospira interrogans* (BACELO et al., 2014). Porém, ainda não foi descrito como ocorre a imunomodulação gerada por esse polissacarídeo.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Determinar a capacidade do polissacarídeo xantana (*Xanthomonas arboricola* pv. pruni 106) na indução da resposta imune humoral em camundongos imunizados com ovalbumina, utilizada como antígeno proteico modelo.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o potencial citotóxico da xantana utilizando cultura de células mamíferas NIH/3T3 de fibroblastos de camundongos, bem como, determinar a quantidade ideal a ser utilizada nos ensaios *in vivo*;
- Imunizar camundongos, por via subcutânea, utilizando ovalbumina como antígeno proteico modelo e o polissacarídeo xantana como adjuvante;
- Determinar o perfil de resposta imune humoral modulado por xantana, através de ensaio de detecção dos níveis e das diferentes subclasses de IgG.

4. Materiais e métodos

4.1. Produção e purificação do polissacarídeo xantana

O polissacarídeo utilizado neste estudo foi produzido a partir de bactérias *X. arboricola* pv. *pruni* cepa 106 em biorreator de 10L (BioStat B Braun Biotech International[®]) de capacidade, com volume útil de 7L de meio de fermentação previamente descrito (DA SILVEIRA; TRONDO, 2006). Brevemente, o caldo fermentado foi aquecido a 121°C durante 15min, e o polissacarídeo recuperado através de precipitação com etanol 96% e seco a 56°C até manutenção constante de seu peso, e em seguida pulverizado em partículas do tamanho de 60–150mesh. A xantana utilizada nesse experimento foi utilizada em *pool* a partir de quatro fermentações. O produto resultante de cada fermentação foi analisado em relação à produção e viscosidade, e nenhuma diferença significativa foi observada entre estes. O polímero foi diluído com água purificada (1,25%, w/v) sob agitação, até apresentar distribuição uniforme, esterilizado e depois armazenado a 4°C. A caracterização pela viscosidade, cinzas, umidade, nitrogênio residual, acetil e conteúdo de piruvato seguiu como previamente descrito (BURDOCK, 1997; FAO/WHO, 1999). A quantificação dos monossacarídeos e ácidos derivados foram determinados como anteriormente descrito (MOREIRA et al., 2001).

4.2. Testes de citotoxicidade do polissacarídeo *in vitro*

O efeito do polissacarídeo sobre o crescimento *in vitro* da linhagem celular NIH/3T3 de fibroblastos de camundongo foi avaliado através de técnicas colorimétricas de viabilidade celular (MTT), utilizando *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* 98% (Sigma[®]). As células foram semeadas em placas de 96 cavidades, numa concentração de 2×10^5 células por cavidade, em um volume de 100µL em

meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma®). Após 24h de cultivo a 37°C em uma atmosfera de 5% CO₂, as células foram incubadas com diferentes concentrações (0,08%, 0,15%, 0,3% e 0,6%) de uma solução aquosa contendo o polissacarídeo ou com Alhydrogel 2%, permanecendo expostas a estas por 24 e 48h. Células incubadas somente com meio DMEM foram utilizadas como controle negativo dos tratamentos. Para o teste com MTT, diferenças nos valores de absorvância determinaram a porcentagem de células vivas, através de leitura de densidade óptica a 492nm. A inibição do crescimento celular foi determinada da seguinte forma: inibição do crescimento = $(1 - \text{Abs}_{492 \text{ células tratadas}} / \text{Abs}_{492 \text{ células controle}}) \times 100\%$.

4.3. Animais

Camundongos BALB/c fêmeas livres de patógenos (Biotério Central, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil) com cinco a seis semanas de idade foram utilizadas neste estudo. Os animais foram aclimatados durante uma semana antes de serem utilizados. Ração e água foram ofertadas *ad libitum* e os camundongos mantidos em foto-período de 12/12 horas, temperatura de 24°C e umidade de 50%. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as regulamentações, políticas e princípios do Conselho Nacional para Controle de Experimentação Animal no Brasil (CONCEA, nº 11.794) e do manual estabelecido pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sendo aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEA/UFPel, nº 3.418).

4.4. Imunizações

Grupos contendo seis camundongos BALB/c fêmeas foram imunizados subcutaneamente com 100µL de uma solução salina 0,9% contendo 100µg de ovalbumina (Sigma, USA), com 100µg de ovalbumina em 2% de Alhydrogel (Invivogen) ou com 100µg de ovalbumina em 0,6% do polissacarídeo xantana. Camundongos inoculados com solução salina 0,9% foram incluídos como grupo controle negativo. As imunizações foram realizadas duas vezes, com intervalo de 14 dias, sendo os animais eutanasiados 14 dias após a segunda imunização. Amostras de sangue foram coletadas do plexo retro-ocular nos dias 0, 14 e 28 e centrifugadas a 5.000×g por 10min, para gerar amostras de soro, as quais foram estocadas a -80°C.

4.5. Quantificação de ovalbumina adsorvida no regime de imunização

As formulações vacinais utilizadas foram previamente avaliadas quanto à quantidade de antígeno adsorvido utilizando o Pierce® BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Para estimar a quantidade de ovalbumina adsorvida, as formulações contendo Alhydrogel e xantana foram preparadas e mantidas por 16h em repouso a 4°C, sendo posteriormente centrifugadas à 10.000×g, durante 10min. As frações do pellet e sobrenadantes obtidas foram submetidas a análise por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% comparada a uma curva padrão de concentração conhecida.

4.6. Avaliação de anticorpos anti-ovalbumina por ELISA

Os níveis específicos de IgG e de suas subclasses no soro dos animais imunizados foram determinados através de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Placas de 96 cavidades com fundo chato foram revestidas com 100µL de

solução de ovalbumina (1µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 50mM, pH 9,6) por 16h, a 4°C. Três lavagens foram realizadas com PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄) acrescido de 0,05% de Tween 20 (PBS-T), seguido de bloqueio com 200µL de 5% de leite em pó desnatado em PBS, à 37°C durante 2h. Subsequentemente após três lavagens com PBS-T, 100µL de uma série de amostras de soro diluído 1:100 ou PBS foram adicionados as cavidades, seguidos por incubação por 1h à 37°C. Após três lavagens, os anticorpos primários *Goat anti-mouse isotype IgG1, IgG2a, IgG2b* ou *IgG3* (Sigma, EUA), foram adicionados na diluição 1:1000 e as placas incubadas por 1h a 37°C, seguido de três lavagens com PBS-T. Para revelação, o anticorpo secundário *Rabbit anti-goat conjugate IgG* (Sigma, EUA) foi adicionado na diluição 1:5000 e incubado por 1h a 37°C. Após este período, os anticorpos não ligados foram removidos por cinco lavagens com PBS-T e o substrato líquido 3,3,5,5'-tetrametilbenzidina (TMB; Sigma, EUA) foi adicionado e incubado durante 15min à 37°C, sendo a reação interrompida pela adição de 4N H₂SO₄/cavidade. A densidade óptica foi medida utilizando um leitor de microplacas a 450nm.

4.7. Análises estatísticas

Os dados foram expressos como a média ± SD e as diferenças significantes entre os grupos foi determinada utilizando a análise de variância (ANOVA) utilizando o software Prism6 (GraphPadSoftware Inc., La Jolla, CA, USA), com valores de $P < 0.05$ sendo considerados estatisticamente significantes.

5. Resultados

5.1. Caracterização do polissacarídeo xantana

A análise do polissacarídeo utilizada nesse experimento demonstrou ter boa viscosidade de acordo com as recomendações da FAO (FAO/WHO, 1999) e Burdock (BURDOCK, 1997) para xantanas utilizadas como aditivo alimentar. O teor de umidade, cinzas, acetil, nitrogênio e conteúdo de piruvato (Tab. 3) apresentaram resultados dentro dos padrões estabelecidos pela FAO.

Tabela 3: Umidade, cinzas, nitrogênio, acetil e conteúdo de piruvato (%w/v) de xantana produzido por *X. arboricola* cepa 106

Análise	Conteúdo	Limites (%)*
Umidade	5.0±0.03	≤15
Cinzas	14.37±0.04	≤16
Nitrogênio	1.06±0.01	≤1.5
Acetil	2.45±0.10	-
Piruvato	1.93±0.06	-

Valores são a média ± desvio padrão.*Limites estabelecidos pela FAO, 1999.

Em adição, nenhuma das concentrações de xantana testadas (0,6%; 0,3%; 0,15% e 0,08%) demonstraram citotoxicidade significativa *in vitro* no ensaio de MTT, exibindo taxas de inibição de crescimento inferiores a 50% em comparação aos grupos controle, seja para o período de tratamento de 24 ou 48h. Já os tratamentos com Alhydrogel 2% mostraram ser citotóxicos em ambos os períodos analisados, com inibição de crescimento acima de 90% (Fig. 4).

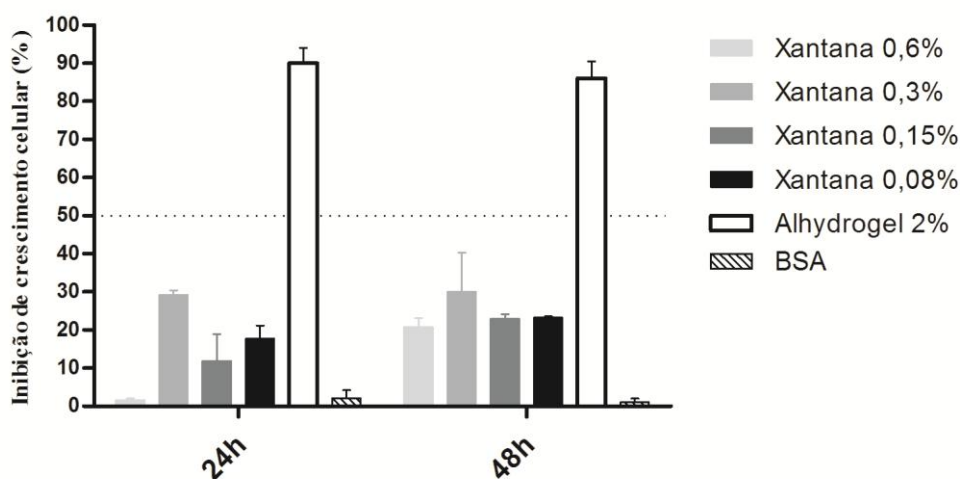


Figura 4: Citotoxicidade da solução aquosa de xantana. O efeito de diferentes concentrações de solução aquosa de xantana e do Alhydrogel foi determinada através da inibição do crescimento de células NIH/3T3 de fibroblastos de camundongos utilizando o ensaio de MTT. Células estimuladas com BSA foram utilizadas como controle negativo. A taxa de inibição foi estabelecida pela comparação com as células não tratadas (somente meio DMEM). Os dados estão expressos pelas médias \pm SD.

5.2. Quantificação de ovalbumina adsorvida no regime de imunização

As vacinas contendo xantana mostraram boa capacidade de adsorção e estabilização do antígeno quando comparado com a curva padrão de concentração de ovalbumina, sendo estimada em aproximadamente 50% (48 μ g) pela quantificação por BCA. As vacinas contendo Alhydrogel mostraram capacidade de adsorção de 100% (Fig. 5).

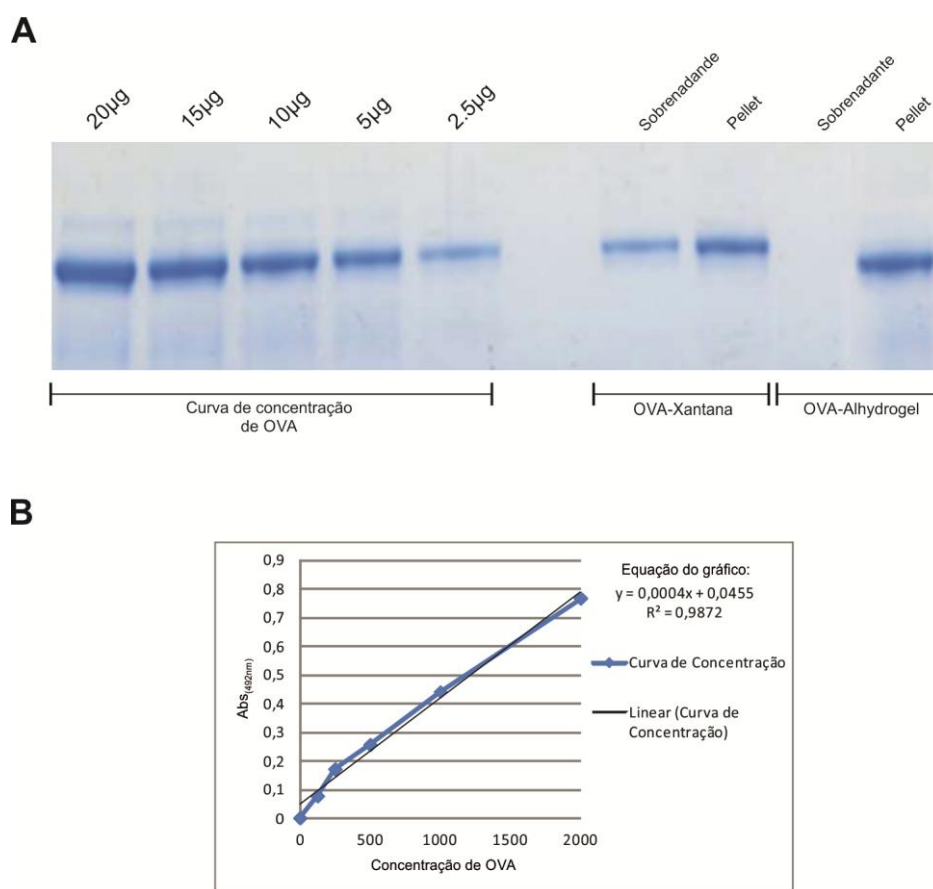


Figura 5: Avaliação da capacidade de adsorção do antígeno pelos adjuvantes. Curva de ovalbumina (OVA) com diferentes concentrações foi utilizada como padrão. As preparações vacinais contendo 100µg de OVA foram centrifugadas e as frações do pellet e sobrenadante foram analisadas por SDS-PAGE 12% (A) e quantificadas por BCA (B). As amostras foram aplicadas no gel em diluição 1:10 para análise.

5.3. Avaliação de anticorpos anti-ovalbumina por ELISA

Amostras de soro dos camundongos BALB/c imunizados com ovalbumina-Alhydrogel, ovalbumina-xantana, ovalbumina-salina e solução salina foram coletadas nos dias 0, 14 e 28 e os níveis das subclasses de anticorpos IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3) determinados por ELISA. Como representado na Figura 6A, o polissacarídeo xantana foi capaz de induzir resposta humoral mediada por anticorpos IgG1 anti-ovalbumina, após a segunda imunização (dia 28), maior que a

observada no grupo salina ($P<0.001$), assim como ocorreu com o grupo ovalbumina-salina ($P<0.01$). Este mesmo isotipo foi detectado já após a primeira imunização (dia 14), para o grupo ovalbumina-Alhydrogel ($P<0.001$). Para as demais subclasses de IgG avaliadas, somente o grupo ovalbumina-Alhydrogel apresentou títulos detectáveis de anticorpos ($P<0.001$), o que ocorreu após a segunda imunização.

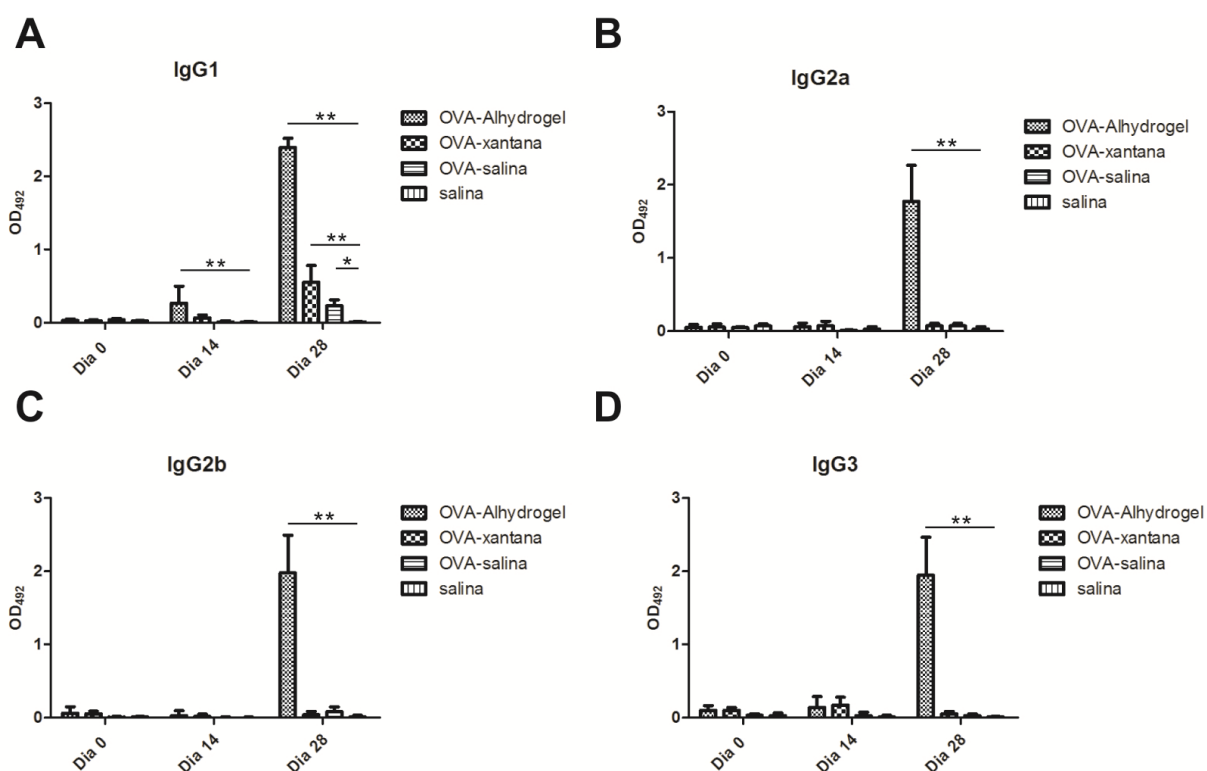


Figura 6: Indução dos níveis de anticorpos das subclasses IgG1 (A), IgG2a (B), IgG2b (C), e IgG3 (D) em camundongos BALB/c imunizados com os diferentes tratamentos. Foram utilizadas 100µg de ovalbumina (OVA) foram utilizadas. Os grupos de camundongos foram imunizados subcutaneamente no dia 0 com uma segunda dose após duas semanas (dia 14). O sangue foi coletado nos dias 0, 14 e 28 após a imunização. As respostas das diferentes subclasses de IgG específicos foram determinadas por ELISA, com diluição do soro 1:100, e a resposta humoral comparada ao grupo controle negativo (salina). Os valores apresentados são as médias \pm SD (* $P<0.01$; ** $P<0.001$).

6. Discussão

O polissacarídeo xantana é constituído por uma cadeia principal celulósica de moléculas de (1,4)- β -D-glicose, sendo um polímero carregado negativamente. Devido a sua composição, esse polissacarídeo apresenta propriedades adjuvantes intrínsecas (ISHIZAKA et al., 1983). Sua aplicação está voltada principalmente como aditivo alimentar aprovado pelo FDA desde 1969, sendo normalmente usado como um agente espessante e estabilizador alimentar, o que demonstra a sua segurança biológica (MOHD SAUID et al., 2013; SUTHERLAND, 1998). No entanto, suas propriedades biológicas e seu mecanismo adjuvante não são claros e permaneceram inexplorados até o momento.

Os parâmetros avaliados acerca da constituição da xantana produzida nesse experimento apresentaram resultados dentro dos padrões estabelecidos pela FAO. Embora o conteúdo de LPS não tenha sido determinado, estudos prévios utilizando o mesmo método de produção caracterizaram a composição do polissacarídeo por cromatografia em camada delgada (MOREIRA et al., 2001). Com exceção de ramnose, nenhum outro componente do LPS de *Xanthomonas* foi detectado. Assim, é improvável que sua antigenicidade esteja relacionada com LPS presente no polissacarídeo.

Os estudos *in vitro* possibilitam a investigação de possíveis efeitos tóxicos dos adjuvantes quando utilizados em formulações vacinais, fornecendo informações valiosas em adição aos ensaios pré-clínicos. O efeito citotóxico da xantana na viabilidade celular foi testado em linhagens NIH/3T3 de fibroblastos de camundongos cultivadas com diferentes concentrações do polissacarídeo. Devido ao aspecto experimental do protocolo utilizado, há ainda a necessidade de padronização para análises estatísticas a partir de três experimentos independentes.

Porém, os resultados iniciais mostraram que para ambos os períodos de tratamento, todas as concentrações testadas apresentaram taxas de inibição de crescimento inferior a 50%, não alterando a viabilidade celular. Além disso, as células exibiram morfologia normal quando observadas em microscópio. De forma semelhante, estudos prévios avaliaram a citotoxicidade *in vitro* da xantana em macrófagos esplênicos de galinhas (CHIOU et al., 2009) e em linhagem de fibroblastos L929 de camundongos (DYONDI; WEBSTER; BANERJEE, 2013), e não foram observadas alterações na viabilidade celular.

Chellat e colaboradores (2000) investigaram sua biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* de complexos poliônicos compostos por quitosana e xantana, demonstrando a ausência de quaisquer efeitos citotóxicos em ratos Wistar. Recentemente, Bacelo e colaboradores (2014) avaliaram sob diferentes tratamentos os potenciais efeitos citotóxicos em células de ovário de hamster chinês (CHO), concluindo que não houve alteração na viabilidade celular, corroborando com sua propriedade de biocompatibilidade, característica essencial para licenciamento de novos adjuvantes (MBOW et al., 2010). Em contrapartida, o Alhydrogel apresentou citotoxicidade durante os ensaios *in vitro*. Estudos demonstraram que os sais de alumínio causam morte celular e subsequente liberação de DNA das células hospedeiras, sendo um dos sinais endógenos responsável pela capacidade imunoestimulatória desse adjuvante (KAMALOV; CARPENTER; BIRMAN, 2011; MARICHAL et al., 2011).

Uma das características dos sais de alumínio é sua capacidade de adsorção dos antígenos devido a sua estrutura cristalina agregada, formando uma dispersão heterogênea altamente carregada (KOOL; FIERENS; LAMBRECHT, 2012). De modo semelhante, as vacinas contendo xantana mostraram boa capacidade de adsorção e estabilização do antígeno, atributo importante frente aos aspectos físico-químicos necessários nos adjuvantes.

Alguns polissacarídeos podem possuir efeitos imunoestimulatórios dependendo de sua constituição, modulando respostas imunitárias durante a progressão de doenças infecciosas causadas por micro-organismos patogênicos (ASTRONOMO; BURTON, 2010). Polissacarídeos como a zimosana e a manana atuam através da ligação a receptores específicos da resposta imune inata que reconhecem PAMPs, incluindo TLRs, NOD2 e *C-type lectins*, cuja ligação resulta na ativação de NF- κ B e produção de citocinas pró-inflamatórias (REY-LADINO et al., 2011). Nesse sentido, essas moléculas podem regular a interação com células do sistema imune do hospedeiro, influenciando a imunidade inata e adaptativa através de interações com células T, monócitos, macrófagos e linfócitos polimorfonucleares (TZIANABOS, 2000).

A capacidade do adjuvante em induzir resposta imune humoral pode ser determinante no desenvolvimento de vacinas efetivas (REED et al., 2013). Existem descritas quatro subclasses de IgG diferentes em seres humanos (IgG1-IgG4) e camundongos (IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3), que se ligam com uma afinidade e especificidade variável aos receptores denominados Fc γ R (Receptor Fc γ) (BRUHNS, 2012). Em adição aos seus papéis bem definidos no desencadeamento da ativação de células efetoras inatas, esses receptores são importantes na apresentação de antígenos e na maturação mediada por complexos imunes nas células dendríticas, bem como regulação e manutenção da sobrevivência de células B (NIMMERJAHN; RAVETCH, 2008).

O perfil de subclasses de imunoglobulinas é fortemente influenciado pelo balanço T_H1/T_H2 durante a resposta imune, tendo sido estudado extensivamente em camundongos (COFFMAN, R. L.; LEBMAN; ROTHMAN, 1993; FINKELMAN et al., 1990; SNAPPER; PAUL, 1987). Os níveis de IgG1 (o qual possui baixa afinidade por receptores Fc γ R) e IgG2a (a qual possui forte capacidade de fixar complemento

e alta afinidade por receptores Fc γ R) foram relatados com o predomínio T_H1 ou T_H2 na resposta imune. A resposta T_H2, direcionada pela IL-4 promove altas relações de IgG1/IgG2a. Já o padrão de resposta T_H1 (IL-12 e INF- γ) possui altas relações de IgG2a/IgG1. Em camundongos, a troca para o isotipo IgG3 também é induzida por uma resposta T_H1, e este isotipo é capaz de fixar complemento e possui também alta afinidade aos receptores Fc γ R. A subclasse IgG2b é menos estudada, porém está relacionada com a indução de IL-12 e ausência de IL-4. Em geral, pode-se associar a subclasse IgG1 de camundongos ao perfil de resposta T_H2 e as demais subclasses ao perfil T_H1 (BANERJEE et al., 2010).

No caso da xantana, Ishizaka e colaboradores (1983) iniciaram os trabalhos de caracterização do polissacarídeo xantana frente a sua capacidade adjuvante pela ativação policlonal de linfócitos *in vitro*, tanto de células B maduras e imaturas, sendo capaz de estimular a produção tanto de anticorpos IgM quanto a resposta policlonal por IgG, semelhante ao LPS.

Nossos resultados mostraram que o polissacarídeo xantana foi capaz de induzir resposta humoral IgG1 nos animais vacinados a partir da segunda dose administrada, em níveis superiores àqueles induzidos nos animais imunizados somente com ovalbumina. Bacelo e colaboradores (2014) relataram altos níveis de anticorpos IgG em hamsters quando administrado o antígeno LigA (*leptospiral immunoglobulin-like*) de *Leptospira interrogans* associado a xantana. Possivelmente, a diferença entre os resultados seja consequência dos antígenos proteicos distintos, bem como o modelo animal dos dois ensaios. Apesar de não ter sido avaliada a capacidade de ativação da resposta imune celular, é possível que a xantana possa induzir uma resposta imune tanto do tipo T_H1 quanto T_H2 em camundongos, necessitando mais estudos acerca de seu mecanismo completo de ação.

Por outro lado, o Alhydrogel induziu forte resposta humoral para ambas as subclasses analisadas. Esse fato está relacionado ao seu mecanismo de ação direcionar resposta imune T_H2 , com indução na produção de anticorpos, corroborando com os dados obtidos durante esse experimento (MARRACK; MCKEE; MUNKS, 2009).

A resposta celular do tipo T_H1 pela produção $INF-\gamma$ e células T citotóxicas é fundamental contra infecções intracelulares. Takeuchi e colaboradores (2009) demonstraram que a administração oral de goma xantana aprimora uma resposta biológica antitumoral em camundongos por meio do reconhecimento do receptor TLR4. Esta resposta imune inata é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias através do fator de transcrição $NF-\kappa B$. A indução da imunidade adaptativa por meio da ativação da imunidade inata é vital para o desenvolvimento de vacinas efetivas, levando à expressão de moléculas co-estimulatórias que são essenciais para a indução de uma resposta imune adaptativa eficaz. Estudos em camundongos têm demonstrado que a sinalização através de TLRs é suficiente para iniciar uma resposta imune adaptativa, sendo caracterizada tanto por indução da resposta de células T $CD4^+ T_H1$ e a produção de anticorpos (PASARE, 2004; MEDZHITOV, 2005). Futuramente, ensaios envolvendo a caracterização da resposta imune celular induzida pelo polissacarídeo xantana irão esclarecer aspectos do mecanismo de recrutamento de células na imunidade adaptativa, bem como o perfil de citocinas induzidas na resposta por células T $CD4^+$ e $CD8^+$.

7. Considerações finais

O presente estudo descreve resultados parciais envolvendo a caracterização da resposta imunológica induzida pelo polissacarídeo xantana como novo adjuvante em formulações vacinais. Os ensaios presentes neste trabalho estão ainda em fase de padronização e desenvolvimento. A determinação da proliferação de linfócitos nos animais imunizados e quantificação de citocinas extracelulares foram testadas, porém, não se obteve sucesso na geração de resultados conclusivos. Futuramente, os ensaios serão padronizados, incluindo a análise de citocinas intracelulares a partir do cultivo de esplenócitos.

8. Conclusões

- O polissacarídeo xantana não apresentou citotoxicidade *in vitro* em células NIH/3T3 de fibroblastos de camundongo. Apesar da natureza inicial dos resultados, o polissacarídeo demonstrou ser seguro para uso como adjuvante;
- A xantana demonstrou boa capacidade de adsorção do antígeno ovalbumina, uma característica favorável em formulações vacinais;
- Os animais imunizados com ovalbumina em associação a xantana apresentaram níveis de anticorpos específicos IgG1 em níveis superiores àqueles somente imunizados com ovalbumina, porém significativamente inferior aos animais imunizados com ovalbumina-Alhydrogel.

9. Referências

AKIRA, S. TLR signaling. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 311, p. 1-16, 2006.

ASTRONOMO, R. D.; BURTON, D. R. Carbohydrate vaccines: developing sweet solutions to sticky situations? **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 4, p. 308-324, 2010.

AUCOUTURIER, J. et al. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. **Expert Rev. Vaccines.**, v. 1, p. 111-118, 2002.

AUSTRIAN, R. Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination. **Trans. Assoc. Am. Physicians**, v. 89, p. 184-192, 1976.

BACELO, K. L. et al. Xanthan Gum as an Adjuvant in a Subunit Vaccine Preparation against Leptospirosis. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 636491, 2014.

BACHELDER, E. M. et al. In vitro analysis of acetalated dextran microparticles as a potent delivery platform for vaccine adjuvants. **Mol Pharm**, v. 7, n. 3, p. 826-35, 2010.

BANERJEE, K. et al. IgG subclass profiles in infected HIV type 1 controllers and chronic progressors and in uninfected recipients of Env vaccines. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 26, n. 4, p. 445-58, 2010.

BAZIN, H. **Vaccination: a History. From Lady Montagu to Genetic Engineering** 2011.

BEKEREDJIAN-DING, I.; JEGO, G. Toll-like receptors--sentries in the B-cell response. **Immunology**, v. 128, n. 3, p. 311-23, 2009.

BERTRAM, U. et al. In situ gelling nasal inserts for influenza vaccine delivery. **Drug Dev Ind Pharm**, v. 36, n. 5, p. 581-93, 2010.

BRUHNS, P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. **Blood**, v. 119, n. 24, p. 5640-9, 2012.

BURDOCK, G. **Encyclopedia of Food and Color Additives**. CRC Press. New York, USA. 3 1997.

CADEDDU, A. Pasteur et le choléra des poules: révision critique d'un récit historique. **Hist. Philos. Life Sci.**, v. 7, p. 87-104, 1985.

CALMETTE, A. **L'Infection Bacillaire et la Tuberculose** 1936.

CALMETTE, A.; GUÉRIN, C. Contribution à l'étude de l'immunité antituberculose chez les bovidés. **Ann. Inst. Pasteur (Paris)**, v. 28, p. 329-337, 1914.

CHELLAT, F. et al. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex. **J Biomed Mater Res**, v. 51, n. 1, p. 107-16, 2000.

CHIOU, C. J. et al. Mucoadhesive liposomes for intranasal immunization with an avian influenza virus vaccine in chickens. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5862-8, 2009.

COFFMAN, R. L.; LEBMAN, D. A.; ROTHMAN, P. Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. **Adv Immunol**, v. 54, p. 229-70, 1993.

COFFMAN, R. L.; SHER, A.; SEDER, R. A. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 492-503, 2010.

DA SILVEIRA, M. A.; TRONDO, V. C. **Process for preparing a xanthan biopolymer**: Google Patents 2006.

DAVIS, I. D. et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 29, p. 10697-702, 2004.

DE GREGORIO, E.; CAPRONI, E.; ULMER, J. B. Vaccine adjuvants: mode of action. **Front Immunol**, v. 4, p. 214, 2013.

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

DYONDI, D.; WEBSTER, T. J.; BANERJEE, R. A nanoparticulate injectable hydrogel as a tissue engineering scaffold for multiple growth factor delivery for bone regeneration. **Int J Nanomedicine**, v. 8, p. 47-59, 2013.

ENDERS, J. F.; WELLER, T. H.; ROBBINS, F. C. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. **Science**, v. 109, p. 85-87, 1949.

FAISAL, S. M. et al. Immune response and prophylactic efficacy of smegmosomes in a hamster model of leptospirosis. **Vaccine**, v. 27, n. 44, p. 6129-36, 2009.

FAO/WHO. Compendium of food additive specifications. **Proceedings of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 53rd Session**, v. Addendum 7, 1999.

FINKELMAN, F. D. et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **Annu Rev Immunol**, v. 8, p. 303-33, 1990.

FLACH, T. L. Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity. **Nat. Med.**, v. 17, p. 479-487, 2011.

FRANCHI, L. et al. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunol Rev**, v. 227, n. 1, p. 106-28, 2009.

GARCÍA-OCHOA, F. et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 7, p. 549-579, 2000.

GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y.; ARTENSTEIN, M. S. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. **J. Exp. Med.**, v. 129, p. 1349-1365, 1969.

GUO, Z.; BOONS, G. J. **Carbohydrate-Based Vaccines and Immunotherapies**: Nature Publishing Group: 1-416 p. 2009.

GUY, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. **Nat Rev Micro**, v. 5, n. 7, p. 505-517, 2007.

HAFFKINE, W. M. Remarks on the plague prophylactic fluid. **BMJ**, v. 1, p. 1461-1462, 1897.

HAMMON, W. M. et al. Evaluation of Red Cross gamma globulin as a prophylactic agent for poliomyelitis. IV. Final report of results based on clinical diagnoses. **JAMA**, v. 151, p. 1272-1285, 1953.

HILLEMANN, M. R. et al. Live attenuated mumps-virus vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v. 278, p. 227-232, 1968.

HUANG, H. et al. Robust stimulation of humoral and cellular immune responses following vaccination with antigen-loaded beta-glucan particles. **MBio**, v. 1, n. 3, 2010.

ISHIZAKA, S. et al. Immune responses to xanthan gum. I. The characteristics of lymphocyte activation by xanthan gum. **Eur J Immunol**, v. 13, n. 3, p. 225-31, 1983.

JENNER, E. **An Inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae** 1798.

KAMALOV, J.; CARPENTER, D. O.; BIRMAN, I. Cytotoxicity of environmentally relevant concentrations of aluminum in murine thymocytes and lymphocytes. **J Toxicol**, v. 2011, p. 796719, 2011.

KATZ, S. L. Studies on an attenuated measles virus vaccine. VIII. General summary and evaluation of results of vaccine. **N. Engl. J. Med.**, v. 263, p. 180-184, 1960.

KAZAZ, J. et al. Encapsulation of the immune potentiators MPL and RC529 in PLG microparticles enhances their potency. **Journal of Controlled Release**, v. 110, n. 3, p. 566-573, 2006.

KIM, J. Y. et al. Adjuvant effect of a natural TLR4 ligand on dendritic cell-based cancer immunotherapy. **Cancer Lett**, v. 313, n. 2, p. 226-34, 2011.

KOLLE, W. Zur aktiven immunisierung der menschen gegen Cholera. **Zentralbl. Bakteriol. Abt. Jena**, v. 19, p. 97-104, 1896.

KOOL, M. Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. **J. Exp. Med.**, v. 205, p. 869-882, 2008.

KOOL, M.; FIERENS, K.; LAMBRECHT, B. N. Alum adjuvant: some of the tricks of the oldest adjuvant. **J. Med. Microbiol.**, v. 61, p. 927-934, 2012.

LEE, J. K. et al. Acemannan purified from Aloe vera induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. **Int Immunopharmacol**, v. 1, n. 7, p. 1275-84, 2001.

MAASSAB, H. F.; DEBORDE, D. C. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. **Vaccine**, v. 3, p. 355-369, 1985.

MADSEN, T. Vaccination against whooping cough. **JAMA**, v. 101, p. 187-188, 1933.

MARCIANI, D. J. Fractionation, structural studies, and immunological characterization of the semi-synthetic Quillaja saponins derivative GPI-0100. **Vaccine**, v. 21, p. 3961-3971, 2003.

MARICHAL, T. et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. **Nat Med**, v. 17, n. 8, p. 996-1002, 2011.

MARRACK, P.; MCKEE, A. S.; MUNKS, M. W. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 4, p. 287-293, 2009.

MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. **Nature Rev. Immunol.**, v. 6, p. 823-835, 2006.

MAYER-BARBER, K. D. et al. Caspase-1 independent IL-1 β production is critical for host resistance to mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling in vivo. **J Immunol**, v. 184, n. 7, p. 3326-30, 2010.

MBOW, M. L. et al. New adjuvants for human vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 411-416, 2010.

MCALEER, W. J. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. **Nature**, v. 307, p. 178-180, 1984.

MESTAS, J.; HUGHES, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **J. Immunol.**, v. 172, p. 2731-2738, 2004.

MEYER, H. M.; PARKMAN, P. D. Rubella vaccination: a review of practical experience. **JAMA**, v. 215, p. 613-619, 1971.

MOHD SAUID, S. et al. Enhancement of oxygen mass transfer and gas holdup using palm oil in stirred tank bioreactors with xanthan solutions as simulated viscous fermentation broths. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 409675, 2013.

MONATH, T. P. **History of Vaccine Development**: 109-135 p. 2011.

MOON, J. J. et al. Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a Plasmodium vivax malaria vaccine. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e31472, 2012.

MOREIRA, A. S. et al. Screening among 18 novel strains of Xanthomonas campestris pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 15, n. 4–6, p. 469-474, 2001.

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 1, p. 34-47, 2008.

O'HAGAN, D. T.; VALIANTE, N. M. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 9, p. 727-735, 2003.

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

OTT, G. et al. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. **Pharm Biotechnol**, v. 6, p. 277-96, 1995.

PARKE, J. C. Interim report of a controlled field trial of immunization with capsular polysaccharides of Haemophilus influenzae type b and group C Neisseria meningitidis in Mecklenburg County, North Carolina. **J. Infect. Dis.**, v. 136, p. S51-S57, 1977.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll-dependent control mechanisms of CD4 T cell activation. **Immunity**, v. 21, n. 5, p. 733-41, 2004.

PERRIE, Y. et al. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 272-280, 2008.

PETROVSKY, N.; COOPER, P. D. Carbohydrate-based immune adjuvants. **Expert Rev Vaccines**, v. 10, n. 4, p. 523-37, 2011.

PFEIFFER, R.; KOLLE, W. Experimentelle untersuchungen zur frage der schutzimpfung des menschen gegen typhus adbdominalis. **Dtsch. Med. Wochenschr.**, v. 22, p. 735-737, 1896.

PREGO, C. et al. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. **Vaccine**, v. 28, n. 14, p. 2607-14, 2010.

QUEREC, T. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. **J. Exp. Med.**, v. 203, p. 413-424, 2006.

RAPPUOLI, R. et al. Vaccines for the twenty-first century society. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 12, p. 865-872, 2011.

RAPPUOLI, R.; MILLER, H. I.; FALKOW, S. The intangible value of vaccination. **Science**, v. 297, p. 937-939, 2002.

REED, S. G.; ORR, M. T.; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nat Med**, v. 19, n. 12, p. 1597-1608, 2013.

REY-LADINO, J. et al. Natural products and the search for novel vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 29, n. 38, p. 6464-71, 2011.

RIVAS, E. et al. Macrophagic myofasciitis in childhood: a controversial entity. **Pediatr Neurol**, v. 33, n. 5, p. 350-6, 2005.

SABIN, A. B.; HENNESSEN, W. A.; WINSSER, J. Studies on variants of poliomyelitis virus. I. Experimental segregation and properties of avirulent variants of three immunological types. **J. Exp. Med.**, v. 99, p. 551-576, 1954.

SAINI, V. et al. Comparison of humoral and cell-mediated immune responses to cationic PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen. **Int J Pharm**, v. 408, n. 1-2, p. 50-7, 2011.

SALK, J. E. Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. **Am. J. Public Health Nations Health**, v. 44, p. 563-570, 1954.

SALMON, D. E. The theory of immunity from contagious diseases. **Proc. Am. Assoc. Adv. Sci.**, v. 35, p. 262-266, 1886.

SATO, Y. Role of antibody to leukocytosis-promoting factor hemagglutinin and to filamentous hemagglutinin in immunity to pertussis. **Infect. Immun.**, v. 31, p. 1223-1231, 1981.

SCHNURR, M. et al. ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. **J Immunol**, v. 182, n. 3, p. 1253-9, 2009.

SEUBERT, A. et al. The adjuvants aluminum hydroxide and MF59 induce monocyte and granulocyte chemoattractants and enhance monocyte differentiation toward dendritic cells. **J. Immunol.**, v. 180, p. 5402-5412, 2008.

SHAH, H. B. et al. Type II NKT cells facilitate alum-sensing and humoral immunity. **J. Leukoc. Biol.**, v. 92, p. 883-893, 2012.

SHAKYA, A. K.; NANDAKUMAR, K. S. Applications of polymeric adjuvants in studying autoimmune responses and vaccination against infectious diseases. **J R Soc Interface**, v. 10, n. 79, p. 20120536, 2013.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, v. 236, n. 4804, p. 944-7, 1987.

SPISEK, R. Maturation of dendritic cells by bacterial immunomodulators. **Vaccine**, v. 22, p. 2761-2768, 2004.

SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnol**, v. 16, n. 1, p. 41-6, 1998.

TAKEUCHI, A. et al. Oral administration of xanthan gum enhances antitumor activity through Toll-like receptor 4. **Int Immunopharmacol**, v. 9, n. 13-14, p. 1562-7, 2009.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clin Microbiol Rev**, v. 13, n. 4, p. 523-33, 2000.