

**Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG  
Instituto de Ciências Biológicas - ICB  
Programa de Pós Graduação em Parasitologia**

**Juliana Vitoriano de Souza**

**Envolvimento de elementos da resposta imune inata e adquirida  
na migração celular em camundongos sensibilizados com  
adjuvantes vacinais isoladamente e/ou associados ao antígeno de  
*Leishmania (Viannia) braziliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Parasitologia.

**Orientador: Dr. Alexandre Barbosa Reis  
Universidade Federal de Ouro Preto.**

**Co-orientadora: Dra. Maria Norma Melo  
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte, MG**

**2012**

Souza, Juliana Vitoriano de

Envolvimento de elementos da resposta imune inata e adquirida na migração celular em camundongos sensibilizados com adjuvantes vacinais isoladamente e/ou associados ao antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. [manuscrito] / Juliana Vitoriano de Souza. – 2012.

103 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Alexandre Barbosa Reis. Co-orientadora: Maria Norma Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Vacinas - Teses. 2. Adjuvantes imunológicos – Teses. 3. Antígenos – Teses. 4. Leishmania – Teses. 5. Imunidade natural – Teses. 6. Parasitologia – Teses. 7. Imunidade adaptativa. I. Reis, Alexandre Barbosa. II. Melo, Maria Norma. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.89.097

Colaboradores:

*Dra. Cláudia Martins Carneiro<sup>I</sup>*

*Dr. Rodolfo Cordeiro Giunchetti<sup>I</sup>*

*Dr. Ricardo Toshio Fujiwara<sup>II</sup>*

*Dra. Andréa Teixeira de Carvalho<sup>III</sup>*

*Dra. Sandra Aparecida de Lima Moura<sup>I</sup>*

*Dra. Paula Melo de Abreu Vieira<sup>I</sup>*

*Ms. Nádia das Dores Moreira<sup>I</sup>*

*I* - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (NUPEB/UFOP)

*II* - Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG/MG)

*III* - Laboratório de Biomarcadores e Monitoração (CPqRR/FIOCRUZ/MG)

*"A simplicidade só é possível aos que ousaram trilhar os caminhos da maturidade." (Fábio de Melo)*

Dedico esta tese aos meus queridos pais, *Juarez e Terezinha*, e em especial, ao meu marido *Lantiel*, pelo amor incondicional e por me ajudarem a tornar esse sonho real.

Dedico ainda esta tese, ao meu orientador  
*Alexandre Barbosa Reis*, pelos  
ensinamentos e ótima convivência em  
todos esses anos.

A realização deste trabalho nunca teria sido possível sem a ajuda que, direta ou indiretamente, recebi dos amigos. Foram muitos os que em diferentes circunstâncias, e de diferentes maneiras, me ajudaram. Esse trabalho evidencia os verdadeiros valores de trabalho em equipe. Meu muito obrigada a todos!

A Deus, pela presença constante em todos os dias da minha vida e por iluminar meu caminho. Obrigada Senhor por ter me ensinado a compreender que tudo na vida tem o seu momento certo para acontecer. Agradeço também por ter colocado na minha vida pessoas tão especiais que me ajudaram e me propiciaram momentos tão incríveis.

Ao professor Alexandre Reis por todos esses anos de convivência e pela orientação. Quero expressar o meu profundo agradecimento pela imensa confiança depositada em mim. Agradeço ainda pela paciência, dedicação, amizade e incentivo. Você é exemplo de determinação, ética e profissionalismo. Palavras seriam insuficientes para descrever toda a gratidão, respeito e carinho que sinto por você.

À professora Norma pela maneira sábia, generosa, gentil e paciente de ensinar e orientar. Obrigada pelas palavras de carinho e incentivo em todos os momentos.

À professora Cláudia Martins pelo exemplo de competência, profissionalismo e equilíbrio.

À Andrea Teixeira pela imensa contribuição na realização desse trabalho e pela agradável convivência.

À professora Marta de Lana pelo seu exemplo de dedicação, ética e inteligência.

Aos professores Rodolfo Giunchetti, Ricardo Toshio e Sandra Moura pela colaboração e disponibilidade.

À grande amiga Nádia Moreira, que esteve presente durante toda esta caminhada científica, da graduação ao mestrado e agora, doutorado. Obrigada pela enorme ajuda na realização deste trabalho, pelas palavras amigas, conselhos e incentivo durante os momentos difíceis e alegres. Como sempre falamos, defenderemos uma tese só, mas com certeza somos autoras de dois trabalhos de doutorado. Você me deu força quando minhas energias e fé estavam acabando. Tenho certeza que todas as dificuldades enfrentadas só nos tornaram mais fortes!

Aos amigos Rodrigo Dian e Bruno Roatt, muito obrigada por estes 8 anos de convivência. Muitas foram as alegrias e momentos difíceis, mas nada disso foi suficiente para que os valores aprendidos no início dessa caminhada fossem perdidos. Somos privilegiados porque aprendemos a superar as diferenças e a valorizar o trabalho em equipe dentro do nosso grupo de pesquisas.

À Paula Melo, obrigada pela amizade sincera. Você é um exemplo lindo de simplicidade e humildade. Uma pessoa de muitos valores e de um coração que nem cabe no peito. Agradeço pela incessante ajuda durante todos os experimentos, sem você não teria tido forças para chegar ao final. Agradeço a Deus por ter me dado o privilégio de conviver com uma pessoa tão ética, profissional e competente. Tenho certeza que Deus reserva só coisas lindas para você.

À Carolina Nogueira, por você fazer parte da minha vida. Sua presença sempre me fortaleceu e me deu forças para deixar de lado as tristezas e angústias e seguir em frente. Saudades ficarão dos experimentos na mesa central, das tardes na academia e do café comunitário com bolo de chocolate.

À Karina, Lívia e Pauline, pela amizade e convivência. Vocês tornaram os dias frios de Ouro Preto, menos tristes. Sentirei muita falta das conversas, almoços e lanchinhos.

Ao Fernando e Jamille, obrigada pela disponibilidade em ajudar sempre! Por fazerem parte de todo esse trabalho, desde as numerosas necropsias até as leituras intermináveis no citômetro de fluxo. Sem a participação de vocês esse trabalho não teria sido realizado. Sou muito grata a vocês e coloco-me a disposição para colaborar sempre.

À Ana, Kátia, Luísa, Flávia, Lucilene e Mandinha por terem compartilhado todos esses momentos comigo, fazendo com que tudo fosse mais fácil.

À Maria Chaves pelos ensinamentos das técnicas histológicas e pela amizade. E à Tânia pela prestatividade e auxílio sempre que possível.

A todos os amigos do laboratório de Imunopatologia, pela convivência e colaboração nesse trabalho: Mariana Trevisan, Liliane, Levi, Wendel, Mariana Lanna, Talitha, Marcos, Flávia, Dayane, Ludmila, Kelvinson, Gleiciane, Henrique, Sheler, João Paulo, Edith, Larissa e Lara.

Ao Departamento de Parasitologia, em especial Sumara e Sibebe, pela disponibilidade e carinho. A todos os professores que contribuíram em minha formação acadêmica e científica.

A todos os funcionários de CCA/UFOP pelo cuidado e manutenção das colônias de animais, tão importantes para a realização das pesquisas.

À minha família, em especial aos meus queridos pais (*Juarez e Terezinha*) e irmãos (*Adriano e Juarez*) pelas orações, conselhos e força dada para realizar este trabalho e principalmente, pelo grande amor depositado em mim nos momentos bons e ruins de minha vida. Amo vocês.

Ao meu querido marido *Lantiel* por ter me ensinado o significado do verdadeiro amor. Agradeço a você por fazer parte da minha história de vida, pelo amor, paciência, apoio incondicional e por me fazer acreditar que seria capaz de chegar até aqui! Te amo muito!

À Bicho do Mato, minha república em Ouro Preto que me acolheu e me permitiu conviver com pessoas maravilhosas. Obrigada pelo apoio e carinho de todas as minhas irmãzinhas selvagens. Vocês são ouro pra mim.



<b>Lista de Figuras</b> .....	ix
<b>Lista de Tabelas</b> .....	xiii
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	xiv
<b>Resumo</b> .....	xv
<b>Abstract</b> .....	xvi
<b>1 - Introdução</b> .....	1
<b>2 - Revisão da Literatura</b> .....	7
2.1 - Adjuvantes vacinais: histórico .....	8
2.2 - Mecanismos de ação dos adjuvantes.....	12
2.3 - Adjuvantes vacinais e sistema imune.....	14
2.4 - A pele como compartimento imune e importante local de imunização .....	17
<b>3 - Justificativa</b> .....	19
<b>4 - Objetivos</b> .....	21
4.1 - Objetivo Geral .....	22
4.2 - Objetivos Específicos.....	22
<b>5 - Material e Métodos</b> .....	24
Etapa 1.....	25
5.1 - Animais e grupos experimentais.....	25
5.2 - Parâmetros avaliados.....	27
5.2.1 - Parâmetros histológicos.....	27
5.2.2 - Obtenção de sobrenadante de macerado de pele para dosagens enzimáticas e de citocinas .....	28
5.2.3 - Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO) .....	28
5.2.4 - Dosagem da atividade da N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) .....	29
5.2.5 - Quantificação de citocinas por CBA ( <i>Cytometric Bead Array</i> ).....	30
5.2.6 - Parâmetros hematológicos .....	30
Etapa 2.....	32
5.2.7 - Animais e grupos experimentais .....	32
5.2.8 - Produção do antígeno vacinal .....	33
5.2.9 - Imunofenotipagem do sangue periférico .....	34
5.2.10 - Análise fenotípica de células do sangue periférico .....	35
5.2.11 - Avaliação fenotípica de células do linfonodo <i>in vitro</i> após a estimulação com antígeno de <i>L. (L.) infantum</i> .....	36

5.2.12 - Estratégia de análise imunofenotípica de células e de marcadores de ativação celular .....	38
5.2.13 - Análise estatística .....	40
<b>6 - Resultados</b> .....	<b>41</b>
Etapa 1: Resposta aos adjuvantes vacinais isoladamente.....	42
6.1 - Quantificação do infiltrado celular na pele de camundongos .....	42
6.2 - Análise da migração celular diferencial e da ativação celular (MPO e NAG)...	44
6.3 - Cinética da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias induzidas por diferentes adjuvantes vacinais .....	46
6.4 - Correlação entre os perfis de citocinas pró e anti-inflamatórias induzidas por diferentes adjuvantes vacinais .....	50
6.5 - Análise dos principais tipos celulares no sangue periférico de camundongos após a sensibilização com diferentes adjuvantes vacinais.....	52
Etapa 2: Resposta específica frente a diferentes composições vacinais constituídas por adjuvantes associados ao antígeno de L. (V.) braziliensis .....	55
6.6 - Quantificação do infiltrado celular na pele de camundongos .....	55
6.7 - Análise do marcador de ativação CD86 em células dendríticas (CD11c <sup>+</sup> ) e macrófagos (F4/80 <sup>+</sup> ) dos linfonodos drenantes .....	57
6.8 - Análise de marcadores de ativação celular recente (CD69) e intermediária (CD25) nas subpopulações de linfócitos T (CD4 <sup>+</sup> e CD8 <sup>+</sup> ) e em linfócitos B (CD19 <sup>+</sup> ) nos linfonodos drenantes .....	59
6.9 - Perfil de citocinas produzidas nos linfonodos drenantes .....	61
6.10 - Análise do perfil fenotípico de leucócitos no sangue periférico.....	64
<b>7 - Discussão</b> .....	<b>66</b>
<b>8 - Conclusões</b> .....	<b>81</b>
<b>9 - Perspectivas</b> .....	<b>86</b>
<b>10 - Referências</b> .....	<b>88</b>
<b>11 - Anexo</b> .....	<b>102</b>

### Lista de Figuras

- Figura 1:** Esquema de imunização, coleta de sangue e necropsias dos animais ..... 26
- Figura 2:** Delineamento experimental da etapa 1..... 27
- Figura 3:** Delineamento experimental da etapa 2..... 33
- Figura 4:** Análise da frequência de células NK, linfócitos T e B e monócitos CD14<sup>+</sup>. (A) Gráfico de distribuição pontual tamanho *versus* granulosidade utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 *versus* FL2 utilizado para quantificar o percentual de células NK e linfócitos em R1. (C) Gráfico de distribuição pontual FL1 *versus* granulosidade utilizado para quantificar o percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>..... 36
- Figura 5:** Análise da frequência de linfócitos T e B e da expressão de marcadores de ativação celular. (A) Gráfico de distribuição pontual tamanho *versus* granulosidade utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 *versus* FL2 utilizado para quantificar o percentual de células de linfócitos T e B e da expressão de marcadores de ativação celular em R1..... 39
- Figura 6:** Análise da frequência de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) e da expressão da molécula co-estimuladora CD86. (A) Gráfico de distribuição pontual tamanho *versus* granulosidade utilizado para a seleção da população total - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual fluorescência *versus* granulosidade utilizado para quantificar o percentual de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) em R1. (C) Gráfico de distribuição pontual FL4 ou FL1 *versus* FL2 utilizado para quantificar expressão da molécula co-estimuladora CD86..... 39
- Figura 7:** Avaliação do infiltrado celular na pele de camundongos sensibilizados com os adjuvantes vacinais: Saponina (SAP;□), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;■) e Monofosforil Lipídio A (MPL;■) nos tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a sensibilização. O grupo controle (C;□) foi inoculado com salina..... 43
- Figura 8:** Migração celular diferencial e análise de ativação celular (MPO e NAG) na pele de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais nos tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a sensibilização. 8.A: contagem diferencial em

cortes de pele corados por Hematoxilina-Eosina, mostrando os principais tipos celulares recrutados para a pele: neutrófilos ( $\square$ ), macrófagos ( $\blacksquare$ ) e linfócitos ( $\blacksquare$ ). 8.B: gráficos representam a atividade de MPO e NAG nos grupos CS ( $-\square-$ ), SAP ( $-\circ-$ ), AIF ( $-\nabla-$ ) e MPL ( $-\blacktriangle-$ ). ..... 45

**Figura 9:** Cinética de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 e IL-10) no sobrenadante de macerado de pele de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais: Saponina (SAP;  $-\circ-$ ), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;  $-\nabla-$ ) e Monofosforil Lipídio A (MPL;  $-\blacktriangle-$ ) nos tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a sensibilização. O grupo controle (C;  $-\square-$ ) foi inoculado com salina. .... 48

**Figura 10:** Análise detalhada da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 e IL-10) no sobrenadante de macerado de pele de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais: Saponina (SAP;  $\square$ ), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;  $\blacksquare$ ) e Monofosforil Lipídio A (MPL;  $\blacksquare$ ) nos tempos de 12, 48 e 168 horas após a sensibilização. O grupo controle (C;  $\square$ ) foi inoculado com salina. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas através das linhas conectoras. .... 49

**Figura 11:** Correlação entre citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) nos diferentes grupos de adjuvantes vacinais: Saponina (SAP;  $-\circ-$ ), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;  $-\nabla-$ ) e Monofosforil Lipídio A (MPL;  $-\blacktriangle-$ ) durante a cinética. .... 51

**Figura 12:** Esquema dos resultados obtidos da contagem global e diferencial do sangue de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais: Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lipídio A (MPL). .... 54

**Figura 13:** Quantificação do infiltrado celular na pele de camundongos sensibilizados com diferentes componentes vacinais: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;  $\boxtimes$ ), Saponina (SAP;  $\square$ ), LB + SAP (LBSAP;  $\boxtimes$ ), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;  $\blacksquare$ ), LB + AIF (LBAIF;  $\boxtimes$ ), Monofosforil Lipídio A (MPL;  $\blacksquare$ ) e LB + MPL (LBMPL;  $\boxtimes$ ) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;  $\square$ ) foi inoculado com salina. Os gráficos em linha representam a cinética do infiltrado em 24 e 48 horas

nos grupos CS (□), LB (\*), SAP (○), LBSAP (●), AIF (▼), LBAIF (▽), MPL (▲) e LBMPL (▲). ..... 56

**Figura 14:** Análise da expressão do marcador de ativação CD86 em células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) nos grupos sensibilizados com: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;☒), Saponina (SAP;□), LB + SAP (LBSAP;☒), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;■), LB + AIF (LBAIF;☒), Monofosforil Lipídio A (MPL;■) e LB + MPL (LBMPL;☒) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;□) foi inoculado com salina..... 58

**Figura 15:** Análise da expressão de marcadores de ativação de CD69 e CD25 em subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) nos linfonodos drenantes de animais sensibilizados com: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;☒), Saponina (SAP;□), LB + SAP (LBSAP;☒), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;■), LB + AIF (LBAIF;☒), Monofosforil Lipídio A (MPL;■) e LB + MPL (LBMPL;☒) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;□) foi inoculado com salina..... 60

**Figura 16:** Diluição da curva-padrão e valores de R<sup>2</sup> obtidos para cada citocina (IL-6, IL-2, TNF-α, IFN-γ, IL-17 e IL-10). Os valores de R<sup>2</sup> foram obtidos através da análise dos dados utilizando o 5° parâmetro logístico no programa FCAP..... 62

**Figura 17:** Perfil de citocinas produzidas nos linfonodos drenantes em animais sensibilizados com: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;☒), Saponina (SAP;□), LB + SAP (LBSAP;☒), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;■), LB + AIF (LBAIF;☒), Monofosforil Lipídio A (MPL;■) e LB + MPL (LBMPL;☒) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;□) foi inoculado com salina..... 63

**Figura 18:** Perfil fenotípico de leucócitos no sangue periférico de animais sensibilizados por antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;☒), Saponina (SAP;□), LB + SAP (LBSAP;☒), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;■), LB + AIF (LBAIF;☒), Monofosforil Lipídio A (MPL;■) e LB + MPL (LBMPL;☒) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;□) foi inoculado com salina..... 65

**Figura 19:** Esquema dos principais resultados obtidos após a sensibilização com os adjuvantes Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lipídio A (MPL), bem como suas respectivas composições vacinais.....84

**Lista de Tabelas**

**Tabela 1:** Adjuvantes em diferentes estudos vacinais ..... 12

**Tabela 2:** Leucócitos Totais e valores absolutos de neutrófilos, monócitos e linfócitos/mm<sup>3</sup> ..... 53

## Lista de Abreviaturas

ACF = Adjuvante Completo de Freund	IFN- $\alpha/\beta$ = Interferon alfa/beta
AIF/IFA = Adjuvante Incompleto de Freund	IgG = Imunoglobulina G
APC = Célula apresentadora de antígeno	IL-1 $\beta$ = Interleucina 1beta
AS02 = Emulsão MPL e a fração purificada QS-21 da saponina	IL-2 = Interleucina 2
AS03 = Emulsão $\alpha$ -tocoferol e squaleno	IL-4 = Interleucina 4
AS04 = Emulsão: MPL e sal de alumínio	IL-5 = Interleucina 5
BCG = <i>Bacillus Calmette-Guerin</i>	IL-6 = Interleucina 6
CD3 = Marcador de superfície celular de linfócitos T	IL-13 = Interleucina 13
CD4 = Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores	IL-15 = Interleucina 15
CD8 = Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxico/supressores	IL-18 = Interleucina 18
CD11c = Marcador de superfície de células dendríticas	IL-21 = Interleucina 21
CD19 = Marcador de superfície celular de linfócitos B	IL-23 = Interleucina 23
CD49b = Marcador de superfície celular de células NK	ISCOM = Complexo de saponina Quil A, colesterol e fosfolipídios
CD25 = Marcador de ativação intermediária	LBAIF/LBIFA = Antígeno LB e Adjuvante AIF
CD40 = Marcador de molécula de co-estimulação	LBMPL = Antígeno LB e Adjuvante MPL
CD69 = Marcador de ativação recente	LBSAP = Antígeno LB e Adjuvante Saponina
CD80 = Marcador de molécula de co-estimulação	LIT = <i>Liver Infusion Tryptose</i>
CD86 = Marcador de molécula de co-estimulação	LPS = Lipopolissacarídeos
CpG = Sequência de dinucleotídeo de DNA bacteriano	LTA = Leishmaniose tegumentar americana
CT = Toxina cólera	LVC = Leishmaniose visceral canina
DCs = células dendríticas	MHCII = Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
DDA = dimetildiocetadecilamônio	MPL = Monofosforil Lipídio A
EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético	MPO = Mieloperoxidase
F4/80 = Marcador de superfície celular de macrófagos	NAG = <i>N-acetil-<math>\beta</math>-D-glicosaminidase</i>
FITC = Isotiocianato de fluoresceína	NF $\kappa$ B = Fator nuclear kappa beta
FSC = <i>Forward Scatter</i> -tamanho	NK = Célula <i>Natural Killer</i>
GLA = Glicopiranosil Lipídio A	NKT = Linfócito NKT
HBV = Vírus da Hepatite B	NNN = <i>Nicolle-Novy-Neal</i>
HEL = Antígeno de lisozima de clara de ovo	NOD = Domínio de oligomerização ligados a nucleotídeo
HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana	OVA = Antígeno de Ovalbumina
HPV = Vírus do Papiloma Humano	PE = Ficoeritrina
HSP = Proteínas do choque térmico	PRRs = receptores de reconhecimento padrão
HSV = Vírus Herpes Simples	QS-21 = Fração purificada de saponina
IFN- $\gamma$ = Interferon gama	SALT = <i>Skin associated lymphoid tissue</i> - Tecido linfóide associado à pele
	SAP = Adjuvante Saponina
	SSC = <i>Side Scatter</i> -granulosidade celular
	TGF- $\beta$ = Fator de transformação do crescimento beta
	TNF- $\alpha$ = Fator de Necrose Tumoral alfa



### Resumo

Adjuvantes vacinais são substâncias que aumentam a imunogenicidade de antígenos que são co-administrados, sendo importantes para a formação de uma intensa, durável e rápida resposta imune. Neste contexto, a utilização de adjuvantes vacinais capazes de gerar uma resposta imune celular eficaz torna-se essencial para o desenho/desenvolvimento de vacinas contra a leishmaniose visceral. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a resposta imune frente aos adjuvantes vacinais: Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lípido A (MPL) após uma única dose do adjuvante aplicada na pele de camundongos. O antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB) foi utilizado como antígeno vacinal nestas formulações. Em adição, foi avaliada a resposta imune específica aos adjuvantes isoladamente e nas respectivas composições vacinais: LBSAP (LB+SAP), LBAIF (LB+AIF) e LBMPL (LB+MPL). Como controle, animais foram sensibilizados com salina estéril. Em relação aos dados obtidos sobre o microambiente imunológico induzido pelos adjuvantes vacinais exclusive, nossos principais resultados demonstraram que os três adjuvantes vacinais são capazes de promover o recrutamento de células para o local, sem danos no local do inóculo. Além disso, foram capazes de induzir migração seletiva de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. A migração de neutrófilos foi elevada em 12 horas em todos os grupos. Contudo a presença desta população foi mais evidente após a sensibilização com o adjuvante SAP em todos os tempos. No que diz respeito à produção de citocinas, observou-se aumento da produção de IL-2, IL-6 e IL-4, sugerindo um perfil misto de resposta nos animais sensibilizados com saponina. O adjuvante AIF promoveu aumento da produção de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-17, nos tempos mais tardios e de IL-4 e IL-10, mais precocemente. Observamos, também, que o adjuvante MPL induziu elevada produção de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , além de IL-6, IL-17 e IL-10. As alterações do fluxo leucocitário refletiram em modificações induzidas pelos adjuvantes vacinais na pele e nos linfonodos drenantes. Em relação à resposta imune específica frente às diferentes composições vacinais quando associadas ao antígeno total de *L. (V.) braziliensis*, nós observamos que as diferentes formulações mostraram-se imunogênicas, com aumento do infiltrado celular na pele, o que não foi observado quando o antígeno LB foi inoculado isoladamente. Nos linfonodos drenantes, importantes resultados foram observados no contexto *in vitro* após estímulo de antígeno de *L. (L.) infantum*. As formulações vacinais LBAIF e LBMPL apresentaram habilidade de aumentar a capacidade de APCs apresentarem antígenos a linfócitos T, visto pelo aumento do fenótipo de células CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>. Tanto os adjuvantes SAP e MPL isoladamente, quanto às formulações vacinais LBSAP, LBAIF e LBMPL foram capazes de ativar linfócitos através do aumento da expressão de CD69 e/ou CD25. O grupo LBSAP foi um excelente indutor de citocinas pró e anti-inflamatórias em 24 h. Contudo, no tempo de 48 horas, de modo geral, a maior produção de citocinas pró-inflamatórias foi observada nos grupos AIF, LBAIF, MPL e LBMPL. Desta maneira, os nossos dados demonstram a importância dos três adjuvantes vacinais para estimular os eventos precoces da resposta imune inata e adquirida no local da imunização, o que sugere capacidade dessas substâncias em aumentar a imunogenicidade de antígenos co-administrados. Em adição, enfatizamos que as formulações LBSAP e LBMPL são potenciais composições vacinais a serem testadas em outros modelos experimentais. De modo geral, este trabalho fornece informações relevantes sobre os elementos da resposta inata e adquirida induzidos por adjuvantes vacinais que poderão ampliar o entendimento da resposta imune após a imunização e contribuir no desenvolvimento e desenhos de vacinas seguras, imunogênicas e efetivas.

### Abstract

Vaccine adjuvants are substances that increase the immunogenicity of antigens when co-administered, being important for the formation of a strong, durable and faster immune response. In this context, the use of vaccine adjuvants to generate an effective immune response is essential to design/development of vaccines against visceral leishmaniasis. Thus, the objective of this study was to evaluate the immune response induced by different vaccine adjuvants: Saponin (SAP), Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) and monophosphoryl lipid A (MPL) after a single dose of these adjuvants inoculated in the skin mice. In addition, we evaluated the specific immune response to vaccine adjuvants alone and their respective compositions: LBSAP (LB+SAP), LBIFA (LB+IFA) and LBMPL (LB+MPL). Animals were inoculated with saline as a control group. The total antigen of *L. (V.) braziliensis* (LB) was used as vaccine antigen in the formulations with these adjuvants. In relation to the immunological microenvironment induced by vaccine adjuvants exclusively, our main results showed that the three evaluated vaccine adjuvants are able to promote recruitment of cells without damaging in local of injection. In addition, induce selective migration of neutrophils, macrophages and lymphocytes were observed. The migration of neutrophils at 12 hours was increased in all groups. However the presence of this population was more evident after sensitization with SAP adjuvant during all kinetics time points. Concerning the cytokines production, it was observed an increased production of IL-2, IL-6 and IL-4, suggesting a mixed response profile in the animals sensitized with saponin. The IFA adjuvant promoted early increased production of IL-4 and IL-10 followed by increase of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-17. We have also observed that the MPL adjuvant induced high production of IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17 and IL-10. The alteration in the leukocyte flow reflected changes induced by vaccine adjuvants in skin as well as in draining lymph nodes. Regarding the specific immune response induced by the vaccine compositions we observed that the different formulations were powerfully immunogenic, with increased cellular infiltration in the skin that it was not observed when the LB antigen was inoculated alone. In draining lymph nodes, substantial results were observed after *in vitro* stimulation with *L. (L.) infantum* antigen. The vaccine formulations LBIFA and LBMPL showed higher ability to increase the capacity of APCs to present antigens for T lymphocytes, since we observed an increase in the frequency of CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> cells. The vaccine adjuvants SAP and MPL and the vaccine formulations LBSAP, LBIFA and LBMPL were able to activate lymphocytes as demonstrated by increased expression of CD69 and/or CD25. The LBSAP group was an excellent inducer of pro and anti-inflammatory cytokines at 24 h. However, at 48 h, in general, the higher pro-inflammatory cytokines production has been observed in IFA, LBIFA, MPL and LBMPL groups. Thus, our data demonstrate the importance of the three vaccine adjuvants to stimulate the early events of the innate and acquired immune response at the site of immunization, and the ability of these substances in increasing the immunogenicity of antigens when co-administered. In addition, we emphasize that the vaccine LBSAP and LBMPL vaccine formulations are potential formulations to be tested in other experimental models. Moreover, this study provides relevant information about the elements of the innate and acquired responses induced by vaccine adjuvants. Also, the data obtained in our study could expand the knowledge about the immune response after immunization and contribute to the development of safe, immunogenic and effective vaccines.



As leishmanioses são doenças complexas e cosmopolitas causadas pela invasão das células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) do baço, fígado, medula óssea e pele por parasitos protozoários hemoflagelados do gênero *Leishmania*, transmitidos durante o repasto sanguíneo de fêmeas hematófagas dos gêneros *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Lainson & Shaw, 1987). Esse grupo de doenças apresenta um amplo espectro de formas clínicas, manifestando-se através de lesões ulceradas na pele, inflamação destrutiva na mucosa ou infecção visceral disseminada (kalazar) e são caracterizadas em função da complexidade biológica do parasito, reservatórios e vetores, bem como das interações parasito-hospedeiro (Saraiva *et al.*, 1989).

O controle da leishmaniose visceral preconizado pela OMS baseia-se na eutanásia dos animais infectados, uma vez que o tratamento com drogas utilizadas com sucesso em casos humanos como glucanato antimonial de sódio ou stiboglucanato de sódio, mostrou baixa eficácia em cães (Alencar, 1959; Alvar *et al.*, 1994). Todavia, a eliminação desses cães nem sempre é aceita por razões éticas e sociais (Desjeux, 2004). Além da eutanásia dos cães soropositivos, outras estratégias são utilizadas como controle epidemiológico tais como, tratamento sistemático de todos os casos humanos e utilização de inseticidas residuais como forma de controle vetorial (Magalhães *et al.*, 1980). Essas medidas de controle nem sempre são fáceis de serem seguidas pois, alguns fatores como: a gravidade da doença, acompanhada pelas limitações do tratamento e a possibilidade de surgimento de epidemias levam a OMS a estimular o desenvolvimento de vacinas contra LVC (O'Hagan & Valiante, 2003). Neste sentido a imunoprofilaxia destaca-se como intervenção médica de grande sucesso com redução na morbidade e mortalidade das doenças infecciosas na população humana e em algumas espécies de importância veterinária (Schijns, 2003).

A vacinação mimetiza a infecção microbiana em uma condição altamente atenuada, gerando células de memória contra patógenos específicos (Akira, 2011) através de elementos imunes efetores, tais como: anticorpos circulantes e diversos linfócitos de memória antígeno-específico, importantes para neutralização imediata do patógeno ou para a produção de peptídeos capazes de destruir células infectadas (Schijns, 2003). No entanto, a fraca imunogenicidade apresentada por algumas vacinas tem incentivado o desenvolvimento de várias estratégias para melhorar a resposta imune

e segurança dos candidatos vacinais, resultando em uma intensa busca por substâncias potencializadoras da resposta vacinal (Marciani, 2003).

Neste contexto, o termo adjuvante foi utilizado pela primeira vez por Ramon (1926) para denominar substâncias que aumentam a imunogenicidade de antígenos quando co-administrados. A utilização de substâncias adjuvantes em vacinas auxilia na formação de uma resposta imune intensa, duradoura e rápida, com uma menor quantidade de antígeno, diminuindo os custos da produção e reduzindo problemas como, por exemplo, a competição entre os antígenos em vacinas multivalentes (Gupta & Siber, 1995; Singh & O'Hagan, 2003).

Apesar de servirem essencialmente ao mesmo propósito, ou seja, aumentar a resposta imune, adjuvantes são diversos quanto à constituição química e estrutural, atividade e modo de ação (Guy, 2007), sendo divididos em: sais minerais (hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio), de origem microbiana, (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) (Vogel 1995; Singh & O'Hagan 1999; Singh & O'Hagan 2002; Kensil *et al.*, 2004; Tritto *et al.*, 2009).

A eficiência dos adjuvantes e sua participação na melhora da resposta vacinal ao antígeno podem ser explicadas por vários mecanismos. Os adjuvantes podem induzir inflamação local aumentando o tráfego celular e, conseqüentemente, o contato do antígeno com células apresentadoras de antígeno. Além disto, auxiliam na formação de um depósito do antígeno, prolongando o tempo de sua liberação e sua interação com macrófagos. Outras funções importantes dos adjuvantes incluem o aumento da velocidade e duração da resposta imune; modulação da avidéz e especificidade, direcionando a produção e distribuição de classes e subclasses de imunoglobulinas; estímulo à imunidade mediada por células; indução de imunidade de mucosas e aumento da resposta imune em indivíduos jovens (imunologicamente imaturos), senis ou imunodeficientes (Singh & O'Hagan, 1999).

Portanto, tudo leva a crer que a chave para uma resposta vacinal mais próxima da ideal deve estar no uso/associação do adjuvante certo ou na busca de novos adjuvantes. Neste sentido é de fundamental importância conhecer os efeitos dos adjuvantes antes de propor associações com antígenos vacinais. Contudo, o desafio

atual enfrentado na pesquisa de adjuvantes é encontrar a "mistura perfeita" com adjuvantes seguros, que trabalhem em sinergia, conduzindo uma resposta imune na direção desejada e para as células corretas (Gamvrellis *et al.*, 2004; Guy, 2007). Sesardic e Dobbelaer (2004) citam alguns parâmetros que devem ser observados quanto a toxicidade dos adjuvantes, tais quais: presença de reações no local da sensibilização; febre ou outros efeitos sistêmicos, incluindo aqueles mediados pelo sistema imune; teratogenicidade; efeitos adjuvantes na resposta imune; estudo da reação de hipersensibilidade para toxicidade de doses repetidas; e estudo de biodistribuição corporal do adjuvante. Deve-se salientar que um fator decisivo no licenciamento de novos adjuvantes é o perfil de segurança aceitável para o uso humano (Sesardic & Dobbelaer, 2004; Tritto *et al.*, 2009).

Deste modo, a escolha de adjuvantes em composições vacinais não deve ser realizada com base somente em observações empíricas. Atualmente, em reconhecimento aos muitos avanços no desenho e desenvolvimento de vacinas, as autoridades de licenciamento e regulamentação têm indicado uma série de ensaios vacinais não-clínicos. Essas autoridades regulamentadoras têm recomendado que novos adjuvantes também devem ser avaliados separadamente das vacinas em que estão incluídos (CPMP, 1997; FDA, 1997; WHO, 2003). Nesse sentido, um projeto racional, com base no conhecimento da resposta imune induzida, é o caminho ideal para a escolha do adjuvante correto. No entanto, é consenso a necessidade de identificar e consolidar informações sobre a disponibilidade e diversidade de possíveis adjuvantes (Alving *et al.*, 1992), uma vez que até mesmo em adjuvantes licenciados, o entendimento dos mecanismos de ação e de alvos moleculares e celulares nem sempre são compreendidos (Tritto *et al.*, 2009).

Com o avanço da imunologia novas abordagens de avaliação, por exemplo, estudo das características inflamatórias induzidas por adjuvantes tornaram-se importantes para a interpretação da capacidade de indução imunogênica e no entendimento dos efeitos colaterais locais associados ao seu uso. Deste modo, o recrutamento de leucócitos é um componente importante deste processo (Muller *et al.*, 2003).

No campo das doenças parasitárias, é importante ressaltar que o entendimento dos padrões similares de resposta protetora na LV nos modelos murinos, caninos e em humanos é fundamental para o estudo de novos imunobiológicos. Trabalhos realizados

por nosso grupo demonstraram a importância do estudo de migração celular induzida pelos constituintes da vacina LBSap e Leishmune<sup>®</sup> nos modelos hamster (Moreira, 2008; Moreira *et al.*, 2009) e cão (Vitoriano-Souza, 2008; Vitoriano-Souza *et al.*, 2008). Esses estudos cinéticos mostraram os eventos celulares da resposta imune inata e adquirida no local da sensibilização (derme). Além disso, eles indicaram a necessidade da avaliação em um modelo que permitisse maior poder investigativo da resposta imune e da capacidade de adjuvantes e antígenos vacinais promoverem recrutamento celular, sem causar reações adversas ao hospedeiro, já que existe uma série de limitações relativas a reagentes nos modelos hamster e cão.

Considerando a escassez de informações a respeito dos mecanismos imunológicos desencadeados por adjuvantes vacinais, o presente estudo propôs o desenvolvimento de uma estratégia experimental voltada à bioprospecção de adjuvantes vacinais no contexto *in vivo* e *in vitro*. Essa estratégia possibilitará em um futuro próximo a seleção de adjuvantes com características de segurança e imunogenicidade aceitáveis para compor uma vacina anti-*Leishmania*. Neste sentido, adjuvantes vacinais, muitos dos quais conhecidos na literatura científica por induzirem uma resposta predominantemente Th1 (MPL-Monofosforil Lipídio A), resposta Th1/Th2 com predomínio da resposta Th1 (saponina), ou ainda resposta predominantemente Th2 (AIF-Adjuvante Incompleto de Freund) foram selecionados e incluídos neste estudo. Neste contexto, este projeto busca de forma racional e otimizada a padronização de ensaios pré-clínicos e o estudo de adjuvantes vacinais no contexto *in vivo* e *ex vivo*. Desta forma, o estudo proposto será útil não apenas para os adjuvantes vacinais avaliados neste projeto, mas dará suporte a futuros testes com outros potenciais adjuvantes e candidatos vacinais anti-*Leishmania*.

Neste estudo, foram utilizados camundongos *Swiss* sensibilizados com uma única dose de adjuvante vacinal na região dorsal, avaliados em diferentes tempos. Na primeira etapa foi realizado um estudo cinético da resposta imunológica local e sistêmica induzidas exclusivamente pela imunização com os adjuvantes vacinais em 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas. Na segunda etapa foi avaliada a resposta imune específica frente à associação vacinal (antígeno total de *L. (V.) braziliensis* com adjuvantes) na pele, linfonodos drenantes e sangue nos tempos de 24 e 48 horas. É importante ressaltar que o entendimento dos processos desencadeados por células inflamatórias em diferentes compartimentos (pele, linfonodos drenantes e sangue) e da

produção de citocinas que medeiam o processo inflamatório induzido por substâncias imunoestimuladoras permitirá expandir o conhecimento sobre esses aditivos vacinais. Além disso, o presente estudo é importante para contribuir na seleção e no desenvolvimento de novos adjuvantes vacinais, ampliando a ação imunizante de uma vacina e reduzindo possíveis efeitos adversos.





## 2.1 - Adjuvantes vacinais: histórico

No século 20, o desenvolvimento e uso de vacinas tornaram-se uma das mais importantes ferramentas contra doenças infecciosas. Contudo, o desenvolvimento de uma nova geração de vacinas de subunidades protéicas ou DNA aumentou a segurança das imunizações, no entanto, tornou evidente a necessidade da adição de uma substância capaz de amplificar a resposta imune aos antígenos vacinais (O'Hagan, 2000). Estas substâncias são conhecidas como adjuvantes (do latim *adjuvare* = ajuda) e demonstram a capacidade de uma substância usada em combinação com um antígeno específico em produzir/induzir mais imunidade que o antígeno empregado isoladamente (Ramon, 1926).

Desde então, inúmeras substâncias foram desenvolvidas e testadas. O histórico de desenvolvimento dos adjuvantes vacinais iniciou-se com seu emprego em vacinas anti-toxóides de 1920-1940; sendo o uso em maior escala de óleos e sais de alumínio no período de 1940-1970. Já o desenvolvimento de adjuvantes sintéticos e de sistemas de “*delivery-depot*” de segunda geração surgiu de 1970-1990 e mais recentemente, de 1990 aos dias atuais, o estudo de adjuvantes associados a receptores que ativam o sistema imune inato como por exemplo, os CpGs e agonistas TLR4 (MPL) (Singh, 2007).

No início do século XX, o mais significativo adjuvante vacinal desenvolvido foi o sal de alumínio (Glenny *et al.*, 1926), sob a forma de hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio. A composição do co-precipitado de hidróxido de alumínio e subunidade toxóide de difteria foi capaz de erradicar a difteria no Canadá entre 1920 e 1930, com uma toxicidade moderada na população vacinada (Volk, 1942). Esse adjuvante em geral, forma um depósito no local da injeção e induz a produção de anticorpos e resposta do tipo 2 através da ativação dos inflamassomas NALP3, mas apresentam baixa indução na imunidade mediada por células (Kenney *et al.*, 2002; Hornung *et al.*, 2008). Em 1948, diversas vacinas associadas aos sais de alumínio foram licenciadas para o uso humano, tais como vacinas contra a difteria, o tétano e a coqueluche (Decker *et al.*, 2004). Alguns trabalhos posteriores demonstraram que, embora muito seguro e de formulação simples, seu uso tem sido relacionado com a reemergência de miopatia inflamatória (miofascite macrofágica) (Cox & Coulter, 1997, Ravindran & Ali, 2004).

Outras substâncias foram testadas com a finalidade de gerar vacinas mais potentes e com menor toxicidade. Uma destas tentativas foi o uso de *Mycobacterium*

mortos em vacinas associados a emulsões água em óleo, denominado adjuvante completo de Freund (ACF) (Freund & Hosmer, 1937). Também foi testada a emulsão sem *Mycobacterium*, que apresentou potência similar à do ACF, sendo denominada de adjuvante incompleto de Freund (AIF) (Freund, 1947). Este adjuvante possui como principais características: fácil formulação e boa resposta para indução de anticorpos, especialmente por imunógenos hidrofílicos. Além disso, foi observada uma resposta inicial associada à atração de certas células para o local do inóculo e consequente desenvolvimento de inflamação focal (Freund, 1956). No entanto, as emulsões vacinais se mostraram instáveis, restringindo o uso comercial das mesmas (Cox & Coulter, 1997). Mais recentemente, a abordagem de adjuvantes baseada em emulsões água em óleo foi retomada com os sistemas produzidos pela empresa francesa Seppic®. Neste sentido, o adjuvante Montanide™ ISA 720, composto por óleo mineral foi testado em primatas (Masina *et al.*, 2003) e cães em uma vacina anti-*Leishmania* (Rafati *et al.*, 2005) não sendo observadas reações adversas graves.

Após o período de desenvolvimento de adjuvantes de alumínio e emulsões, surgiu uma nova geração de adjuvantes compostos de pequenas moléculas derivadas de bactérias e de adjuvantes denominados de veículos particulados, de dimensões similares a bactérias e vírus. O surgimento destes novos adjuvantes só foi possível devido ao avanço da imunologia que permitiu o entendimento de interações mais complexas entre um grande número de células e seus receptores (Singh, 2007).

Ainda hoje esta geração de adjuvantes é muito utilizada em composições vacinais. Inúmeros estudos foram conduzidos utilizando o *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) em vacinas contra leishmaniose (Mauel, 2002; Ravindran & Ali, 2004). Neste contexto, alguns pesquisadores demonstraram habilidade na proteção utilizando antígenos totais de *Leishmania* spp. associado ao BCG como adjuvante contra leishmaniose tegumentar americana - LTA (Mayrink *et al.*, 1979) e na leishmaniose visceral canina - LVC (Mayrink *et al.*, 1996; Giunchetti *et al.*, 2008). Além disto, na LTA humana, o BCG foi usado na imunoquimioterapia empregando-se a Leishvacin® (primeira vacina contra leishmaniose tegumentar humana industrializada pela extinta Biobras) e propiciando a redução da dose de antimônio e tempo de tratamento (Genaro *et al.*, 1996, Toledo *et al.*, 2001). De fato, o BCG foi utilizado nos últimos anos como o adjuvante de escolha nos ensaios clínicos vacinais, utilizando-se promastigotas de *Leishmania* spp. mortas (Convit *et al.*, 1987; Mauel, 2002; Brodskyn *et al.*, 2003; Ravindran & Ali, 2004).

Neste amplo cenário de adjuvantes vacinais, as saponinas são descritas como pertencentes a um grupo de glicosídeos triterpenos obtidos da casca de árvores da espécie *Quillaja saponaria*. As saponinas são indutoras de uma intensa resposta imune Th1 (citotoxicidade mediada por LT CD8<sup>+</sup> e produção de IgG2a em camundongos) bem como, concomitante resposta Th2 (Liu *et al.*, 2002). Possivelmente, as saponinas são os adjuvantes ideais para serem utilizados em ensaios vacinais contra *Leishmania* spp. (Ravindran & Ali, 2004), pois, apresentam baixo custo, formulações simples e, geralmente, são consideradas seguras para o uso veterinário (Cox & Coulter, 1997).

Nos últimos anos, novos adjuvantes vêm sendo propostos em diferentes ensaios clínicos vacinais (Kenney *et al.*, 2002, Pink & Kieny, 2004). Neste contexto, destacam-se o MF59 (componente da vacina de influenza) indutor de imunidade humoral e celular, com capacidade de estimular a produção de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-2 em modelo murino e a expansão de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em primatas. Este adjuvante foi licenciado para o uso humano pela *European Economic Community* devido ao fato de ser um potente adjuvante com baixa toxicidade (Podda & Del Giudice, 2003).

Uma nova classe de adjuvantes sintéticos conhecidos como MPL (Monofosforil Lipídio A) e Detox (emulsão de *Mycobacterium* associado a MPL) foram aprovados para uso em uma vacina contra melanoma (Corixa's Melacine) no Canadá. Entretanto, ensaios vacinais utilizando o MPL como adjuvante associado aos antígenos recombinantes MAPS/TSA e LmSTII não lograram êxito na capacidade de induzir proteção em cães vacinados e desafiados com *L. (L.) infantum* (Fujiwara, 2003; Fujiwara *et al.*, 2005).

Uma estratégia extremamente interessante, empregada nos últimos anos, foi a associação de adjuvantes formando os chamados sistemas de adjuvantes. Destacam-se o AS02 (emulsão contendo MPL e a fração purificada QS-21 da saponina), AS03 (emulsão contendo  $\alpha$ -tocoferol e esqualeno) e AS04 (emulsão contendo MPL e sal de alumínio). Embora os testes utilizando com o AS02 com o antígeno L2E2 contra o vírus do papiloma humano não tenham conferido imunidade duradoura, este adjuvante tem sido indicado como um bom candidato para ser associado a vacinas contra *Leishmania* spp. (Ravindran & Ali, 2004).

Adjuvantes alternativos também têm sido utilizados, incluindo o Sistema Adjuvante Sigma (emulsão óleo em água contendo monofosforil lipídio A (MPL) associado a dicorinomicolato de trehalose), CpG (dinucleotídeos não-metilados) e enterotoxinas ADP-ribosiladas (Uddowla *et al.*, 2007).

As partículas ISCOMS<sup>®</sup> (complexo imunoestimulante constituído por saponina Quil A, colesterol e fosfolipídios) vêm sendo empregadas em ensaios contra doenças provocadas por vírus, bactérias, parasitos e em vacinas contra o câncer, por via parenteral, nasal ou oral (Rajput *et al.*, 2007). Este adjuvante induz forte resposta mediada por células e atividade de linfócitos T CD8<sup>+</sup> por várias semanas. Desta forma, tem sido proposta sua utilização para imunoterapia contra o câncer e em doenças infecciosas de curso crônico. Este adjuvante também parece ser interessante como um forte candidato a ser empregado em vacinas contra leishmanioses.

Na Europa, o adjuvante AS04 (combinação de MPL e alum) foi aprovado para uso humano na vacina contra a Hepatite B da Fendrix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline) e contra o vírus do papiloma humano da vacina Cervarix<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline) (Tong *et al.*, 2005; Schiller *et al.*, 2008). O adjuvante MF59 foi licenciado para uso em humanos em 1997 na Itália, e em 2000 na União Européia e outros países (Schultze *et al.*, 2008). Este foi o primeiro novo adjuvante licenciado para uso humano desde o desenvolvimento de sais de alumínio em 1920. Nos Estados Unidos, no entanto, somente os sais de alumínio são licenciados como adjuvantes vacinais para uso em seres humanos. Isto enfatiza a necessidade do desenvolvimento de novos adjuvantes e/ou de uma pesquisa mais completa sobre a segurança e a eficácia de adjuvantes disponíveis (Singh, 2007). Na *tabela 1* estão representados alguns potenciais adjuvantes vacinais.

É importante salientar que o adjuvante mais apropriado para cada vacina depende do tipo de resposta imune necessária para o estabelecimento de imunidade protetora (Singh & O'Hagan, 1999). O sucesso no desenvolvimento e utilização de um adjuvante vacinal depende de um balanço constante entre estabilidade, toxicidade, imunogenicidade, sistema de entrega do antígeno (*delivery*), tipo de imunoestimulação (resposta celular ou humoral), além de simplicidade da formulação (O'Hagan, 2000; Singh, 2007). Outro fator relevante nesse êxito é o baixo custo de produção necessário para que o adjuvante seja acessível em vacinas para toda população.

**Tabela 1:** Adjuvantes em diferentes estudos vacinais

Classificação Geral	Grupo	Nome	Importantes Funções e Propriedades Biológicas	Estratégias de Uso e Ensaio Clínicos
Sais minerais	Sais de alumínio	Hidróxido de alumínio/Fosfato de alumínio	Induz elevada produção de anticorpos e baixa indução de resposta celular	Amplamente usado em vacinas e licenciado para uso em humanos
Emulsões	Água em óleo	Montanide ISA	Atua através da formação de depósito efetivando a liberação lenta do antígeno e com boa capacidade de induzir inflamação	Estudos de fase I e II para câncer, malária e HIV
		Adjuvantes Completo e Incompleto de Freund	Boa resposta por anticorpos, especialmente por imunógenos hidrofílicos. Pode causar granulomas e abscessos no local do inóculo	Foi utilizado em estudos de fase II
	Óleo em água	MF59	Elevada resposta por anticorpos, aumento na proliferação de células T e indução de linfócitos citotóxicos	Licenciado para o uso humano em vacinas contra <i>influenza</i>
Origem microbiana	Agonistas TLR	MPL (monofosforil lipídio A)	Aumenta a expressão em células dendríticas de receptores pro-citocinas Th1, bem como quimiocinas, induz resposta celular Th1 e anticorpos	Licenciado para uso em humanos em vacinas anti-HSV, HPV e malária
		GLA (adjuvante glicopiranosil lipídeo A)	Adjuvante vacinal seguro e eficaz que tem com alvo receptores Toll em células dendríticas de humanos, potencializando a resposta imune	Licenciado e comercializada para pesquisa
		CpG (oligonucleotídeos citosina-guanina não-metilado)	Induz elevados títulos de anticorpos, rápido resultado na resposta imune e melhora a resposta imune celular	Uso em fase II em ensaios clínicos para malária, câncer e HIV
	Atenuado	BCG ( <i>Bacillus Calmette-Guerin</i> )	Seguro com potente efeito imunoestimulante considerado forte indutor tanto resposta imune humoral quanto celular	Uso licenciado como vacina
Saponinas	Derivado de Quil A	QS-21 (saponina)	Induzem intensa resposta imune Th 1 e concomitante indução de resposta do tipo 2	Foi utilizado em fase I
Sistemas de adjuvantes	Lipossomo + MPL + QS-21	AS01	Maior título de anticorpos e resposta por células T quando comparado ao AS02	Uso humano limitado devido a segurança
	MPL + QS-21	AS02	Induz resposta linfoproliferativa, anticorpos, mas sem indução de linfócitos T CD8*	Usada em vacinas contra malária, TB, HBV e HIV
	Esqualeno em emulsão óleo em água	AS03	Resposta humoral rápida após a primeira dose	Componente da vacina contra <i>influenza</i> pandêmica
	MPL + Sais de Alumínio	AS04	Aumenta os títulos de anticorpos, taxas de conversão e resposta linfoproliferativa	Componente das vacinas Fendrix® e Cervarix®, aprovado para vacinas contra HBV and HPV na Europa

Dados retirados de O'Hagan e De Gregório, 2009

## 2.2 - Mecanismos de ação dos adjuvantes

Nas últimas décadas, o interesse sobre várias substâncias que exercem efeito adjuvante tem crescido bastante. Todavia, pouca informação está disponível sobre como elas agem *in vivo*, mesmo no caso de adjuvantes já licenciados ou utilizados em pesquisas pouco é sabido como eles exercem sua atividade adjuvante. A grande maioria dos mecanismos descritos baseou-se em estudos *in vitro* usando células isoladas ou linhagens celulares (Steinman *et al.*, 2005).

Dentre os principais tipos de mecanismos clássicos de ação dos adjuvantes descritos, pode-se citar a formação de “depósitos” pelo adjuvante, o qual protege o antígeno de uma rápida degradação, assim como da eliminação pelo hospedeiro, podendo resultar em uma estimulação prolongada de células produtoras de anticorpos e

na produção de altos níveis de anticorpos pelo hospedeiro (Stills, 2005). Por outro lado, em determinadas estratégias de construção de vacinas torna-se necessário o emprego de adjuvantes que exerçam pouca ação anticorpo-gênica, mas forte ação da imunidade celular com foco direcionado às células T da resposta imune. Em adição, adjuvantes vacinais podem atuar como “veículo de entrega” importante na entrega e translocação dos antígenos do local do inóculo para os órgãos linfóides como baço e linfonodos drenantes. Nesse processo, o antígeno é capturado por células dendríticas (DCs) que rapidamente migram via sistema linfático para os linfonodos drenantes (Stills, 2005).

Os adjuvantes também podem exercer sua atividade através da imunomodulação do sistema imune na qual a função adjuvante é exercida através da estimulação direta de células do sistema imune inato como monócitos, macrófagos, células NK e NKT e DCs (Kensil *et al.*, 2004).

A imunomodulação ocorre em grande parte dos adjuvantes vacinais através dos ligantes de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que exercem sua ação na ativação da cascata de sinalização e ativação do fator de transcrição NFκB, direcionando para a inflamação (Liang *et al.*, 2004), tais como TLRs (receptores tipo *Toll*) que ligam-se a lipopolissacarídeos (LPS), flagelina, HSP60, CpG DNA, fita dupla de RNA ou peptideoglicano (Underhill & Ozinsky, 2002; Barton & Medzhitov, 2002) e NOD (Domínio de oligomerização ligados a nucleotídeo) que são sensíveis a produtos bacterianos (Inohara & Nunez, 2003; Strober *et al.*, 2006). Outros adjuvantes podem atuar sobre a resposta inata através de receptores associados à enterotoxinas bacterianas ou derivados, conhecidos como toxina colérica (CT) e também, através de toxina sensível ao calor (LT). Estudos têm mostrado que adjuvantes associados a esta via de ativação podem ser altamente tóxicos, todavia apresentam excelente imunogenicidade *in vivo* (Holmgren *et al.*, 1994; Lycke, 2005). O terceiro grupo de imunomoduladores usa componentes naturais do sistema imune inato, tais como fatores do complemento (C3d) ou anticorpos para alvos de células da imunidade inata (Singh, 2007). Um exemplo de adjuvantes desta classe são as proteínas HSP70 (Lehner, 2003).

Desta maneira, concentrar e expandir esforços no entendimento mais detalhado de como adjuvantes podem disparar a imunidade inata certamente iria auxiliar na busca de novos adjuvantes. Esse conhecimento permitiria o desenvolvimento de uma nova geração de adjuvantes com mecanismo de ação previamente conhecido e poderá contribuir para o desenvolvimento de adjuvantes com efeitos colaterais restritos, redução da dose do antígeno, além de limitar o risco de reações adversas à vacinação

(Singh, 2007). Entretanto, deve-se salientar que o efeito do adjuvante pode ser influenciado pelo esquema de imunização, via de inóculo, dose, formulação do adjuvante, seleção do antígeno, variação genética intraespecífica e status imunológico do hospedeiro (O'Hagan, 2000).

### 2.3 - Adjuvantes vacinais e sistema imune

A integração das duas distintas defesas do sistema imune, a imunidade inata e adquirida, é crítica para assegurar a rápida eliminação de um patógeno e subsequente geração de proteção duradoura (Kaech *et al.*, 2002). Os principais tipos celulares envolvidos em uma resposta imune efetora incluem células dendríticas, macrófagos, mastócitos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T e B, destacando-se as células dendríticas como as mais efetivas células apresentadoras de antígenos (APCs) (van Kooyk *et al.*, 2004; Rajcani *et al.*, 2005). Todavia, deve-se ressaltar que as células dendríticas não atuam sozinhas, necessitando da presença e interação com outras populações e subpopulações celulares (Klinman *et al.*, 1998).

Neste contexto, a ativação da resposta inata para a indução da imunidade adquirida através do recrutamento, ativação e maturação celular surge como ponto chave para o sucesso na formulação dos adjuvantes modernos (Singh, 2007). Conhecidos como “sinal de perigo” pelo sistema imune, adjuvantes podem estimular tanto a imunidade inata e adaptativa resultando em uma resposta mais precoce com maior duração e magnitude, além de influenciar no tipo de resposta imune (Coffmann *et al.*, 2010). Entretanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos imunes iniciais que precedem a diferenciação de células T *helper* (Th) induzida por adjuvantes (Korsholm *et al.*, 2009) e se adjuvantes exercem sua atividade no local da imunização ou nos linfonodos drenantes (Schijns, 2000).

De modo geral, adjuvantes podem direcionar a resposta Th1 através de células secretoras de IFN- $\gamma$  e IL-2, onde estimulam a imunidade celular contra patógenos intracelulares, ou resposta Th2 através de células secretoras de IL-4, IL-5 e IL-13 que medeiam resposta humoral contra patógenos extracelulares (Mosmann & Coffman 1989; Mosmann & Sad 1996; Mosmann *et al.* 1997). Em geral, as citocinas TGF- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-21 e IL-23 têm sido descritas por contribuir na diferenciação de células Th17 *in vitro* (Bettelli *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006).

No contexto da imunidade inata, a resposta inflamatória merece atenção especial, uma vez que é rapidamente iniciada e independe do antígeno, além de preceder



o início da resposta antígeno-específico (Korsholm *et al.*, 2009). A capacidade de indução de inflamação no local da imunização tem sido mostrada como uma característica compartilhada por vários tipos de adjuvantes conhecidos (Schijns, 2000), sendo esta uma diferença notável entre a administração do antígeno sozinho, que resulta na ausência ou em baixa imunogenicidade, e a administração de antígeno associado ao adjuvante com indução da inflamação (Schijns, 2000).

Recentemente, o estudo do papel do reconhecimento não-específico de antígenos de patógenos por células da imunidade inata através dos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) tem se tornado mais claro (Hemmi *et al.*, 2000; O'Neil, 2002). O reconhecimento inato de patógenos pelo hospedeiro não somente auxilia na eliminação rápida do patógeno até a maturação da imunidade adquirida, mas também atua na formação de um cenário inflamatório para o direcionamento e desenvolvimento de uma imunidade adaptativa apropriada (Ahmed & Gray, 1996). Como a diferenciação de células T é influenciada por diferentes sinais co-estimuladores expressos em células dendríticas, o estímulo recente destas subpopulações e o grau de inflamação no local do inóculo estão intimamente envolvidos na modulação da resposta imune e possuem maior impacto no perfil da resposta por células T (de Heusch *et al.*, 2004).

O início da inflamação pode ocorrer através da ativação de PRR expressos em diferentes formas e composições por uma variedade de células, incluindo linfócitos, granulócitos e células endoteliais (Muzio *et al.*, 2000; Faure *et al.*, 2001). O recrutamento de fagócitos ativados para o local da infecção/imunização ocorre como parte da resposta inflamatória e é mediada por moléculas de adesão celular que são induzidas na superfície de vasos endoteliais sanguíneos (Murphy *et al.*, 2008). Na inflamação aguda, os primeiros leucócitos que migram para o local da lesão ou da imunização são os neutrófilos (de 4 a 12 horas pós-estímulo) que posteriormente são substituídos por macrófagos e/ou eosinófilos (de 24 a 48 horas) dependendo do tipo de inflamação desencadeada e orquestrada por mediadores imunológicos (Ali *et al.*, 1997). De modo geral, a função coordenada da população celular presente na derme e epiderme permite que ocorra uma resposta rápida e efetiva frente à variedade de estímulos que ocorrem na interface entre o organismo e o meio externo (Williams & Kupper, 1996).

Dentre os mediadores imunológicos, as citocinas inflamatórias produzidas por células da imunidade inata no local da imunização podem ser comunicadores essenciais para a atividade adjuvante (Schijns, 2000). As citocinas são essenciais no desenvolvimento da resposta imune celular e humoral, pois elas regulam, de forma

autócrina e parácrina, a resposta imune, promovendo a migração de leucócitos a partir do sangue e a ativação de outras células do tecido cutâneo (Uchi *et al.*, 2000; Williams & Kupper, 1996). O mecanismo pelo qual adjuvantes induzem a produção de IL-12 ou IL-6/IL-4, levando à polarização da resposta das células T *helper* é desconhecido. No entanto, a ativação seletiva de determinados tipos de células da imunidade inata ou de receptores em células da imunidade inata pode auxiliar no melhor entendimento da atividade adjuvante logo após a imunização (Romani *et al.*, 1997).

A redundância na rede de citocinas formada após a sensibilização torna difícil atribuir à atividade de um adjuvante especial a uma ou mais citocinas. Algumas citocinas são cruciais para a imunogenicidade, tais quais: IFN- $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-15 e IL-18, pois influenciam a apresentação de antígenos e são importantes no desencadeamento da resposta inflamatória. Outras podem agir durante a expansão clonal e diferenciação de células T e B, como: IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  (Brewer *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1998). É importante salientar que citocinas ou moléculas co-estimuladoras podem representar imunoestimulantes naturais ideais para a escolha racional de adjuvantes com toxicidade e reações locais mínimas (Schijns, 2000).

É necessário ressaltar que na prática, o desenvolvimento de vacinas, apresenta dificuldades para transpor os resultados obtidos *in vitro*, para a complexidade do sistema imune de organismos vivos (Korsholm *et al.*, 2009). A complexidade dessa resposta *in vivo* tem sido um fator limitante para o entendimento de mecanismos de ação de diferentes adjuvantes vacinais, e por isso, informações limitadas estão atualmente disponíveis na atividade de sais de alumínio (um dos únicos adjuvantes de uso universal para vacinas humanas). Neste sentido, a recente resposta inflamatória induzida por diferentes adjuvantes é um parâmetro que alguns poucos imunologistas têm começado a estudar (Mosca *et al.*, 2008; Didierlaurent *et al.*, 2009; Korsholm *et al.*, 2009; Morel *et al.*, 2011). Neste sentido, o estudo do recrutamento celular torna-se extremamente relevante, uma vez que o número de células e a sua composição no estágio inicial, depois do estímulo, podem influenciar futuras respostas e o desenvolvimento da resposta imune adquirida e preferencialmente, de memória.

## 2.4 - A pele como compartimento imune e importante local de imunização

A pele é o maior e mais acessível órgão e atua tanto como barreira física quanto imunológica. Devido a estas características físicas, a pele atua na conexão com o meio externo, tendo importantes papéis na proteção, termorregulação, resposta imunológica, bem como na manutenção e desenvolvimento da defesa, uma vez que está constantemente sujeita a estímulos externos, tais como patógenos, agentes mecânicos, agentes químicos e resposta auto-imune (Becker, 1997; Firestein, 2004).

Quanto à estrutura da pele, esta é dividida em três camadas: epiderme, derme e hipoderme, dispostas e interligadas de modo a manter de maneira adequada o desempenho de suas funções (Becker, 1997; Firestein, 2004). Os principais tipos celulares presentes na epiderme (a camada mais externa da pele) são: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merckel. Os queratinócitos representam as mais abundantes células da epiderme, sendo fundamentais na manutenção da estrutura epidérmica, bem como, na ativação da resposta imunológica do tecido cutâneo através da produção de citocinas, quimiocinas e expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal da classe II (MHCII) (Koster & Roop, 2004; Freinkeil & Woodley, 2000). Outra importante população celular localizada na camada suprabasal da epiderme da pele e das mucosas são as células de Langerhans que desempenham importante papel no reconhecimento, captura, processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T (Chan, 2004). Além das células residentes da epiderme, várias populações celulares podem migrar para esta camada em resposta a estímulos externos, dentre as quais: os neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos, sendo essas células elementos da resposta imune inata e adquirida (Norris, 2004).

Logo abaixo da epiderme, encontra-se a derme. Esta camada consiste em um tecido conectivo com espessura superior a da epiderme, todavia apresenta uma população celular inferior. Os elementos que a constituem, bem como a organização estrutural dessa camada conferem à pele elasticidade, força tensil e resistência mecânica (Haake *et al.*, 2000). Deve-se ressaltar a importância dos vasos sanguíneos presentes na derme na infiltração de células migratórias importantes no estabelecimento do processo inflamatório (Ryan, 2004).

A camada mais profunda da pele denominada hipoderme, composta por tecido adiposo ligado por fibras colágenas forma uma barreira térmica, além de armazenar energia e proteger contra choque mecânico. Em camundongos observa-se ainda uma

camada muscular nessa região. Estruturas como folículos pilosos e glândulas podem originar-se na derme ou hipoderme (Kupper & Fuhlbrigge, 2004).

É interessante ressaltar que nas imunizações intradérmicas realizadas por via parenteral (injeção), a administração dos antígenos e adjuvantes ocorre nas camadas superficiais da pele (epiderme e derme), sítios ricos em células de defesa, que incluem os linfócitos T intra-epiteliais e as células de Langerhans, que apresentam uma considerável capacidade de capturar antígenos e de estabelecer/manter uma resposta imune local (Kupper & Fuhlbrigge, 2004, Abbas & Lichtman, 2008). Além disso, possíveis efeitos colaterais são facilmente visualizados macroscopicamente no local do inóculo ou microscopicamente em cortes histológicos, justificando a escolha dessa via de imunização em trabalhos experimentais. Deste modo, pela natureza de sua localização e presença de células importantes na geração de resposta imune, a pele torna-se um importante local para administração de vacinas.



Adjuvantes são componentes essenciais em protocolos vacinais, usados para melhorar a entrega e imunogenicidade de vacinas, uma vez que afetam a magnitude e duração da resposta imune. Uma importante função dos adjuvantes é o recrutamento de células do sistema imunológico para o local da imunização e, conseqüentemente, o estabelecimento de um ambiente local imunocompetente associado a um processo inflamatório não patogênico, caracterizando assim o efeito adjuvante dessas substâncias. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no recrutamento de células, bem como sobre a reação inflamatória desencadeada pela administração, de potenciais adjuvantes, isoladamente, ou em associação com o antígeno vacinal.

Deste modo, o estudo do processo inflamatório, bem como do recrutamento celular promovido pelos adjuvantes e antígeno de *L. (V.) braziliensis*, é de extrema importância, uma vez que a ativação da resposta imune inata mediada por diferentes tipos celulares (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células dendríticas) é extremamente importante no direcionamento da resposta imune adaptativa. Além disso, a compreensão dos efeitos induzidos por adjuvantes sobre as funções das células T são importantes para o desenho de vacinas eficazes e seguras, uma vez que ainda é limitado o número de adjuvantes licenciados para uso humano, necessitando de uma pesquisa mais completa sobre a segurança, imunogenicidade e a eficácia de adjuvantes disponíveis. Visto essa limitação e em reconhecimento aos muitos avanços no desenho e desenvolvimento de vacinas, as autoridades de licenciamento e regulamentação têm indicado uma série de ensaios vacinais não-clínicos e recomendado que novos adjuvantes também devam ser avaliados separadamente das vacinas em que estão incluídos.

Neste sentido, a busca por estratégias experimentais na pré-seleção de potenciais adjuvantes vacinais no modelo murino torna-se relevante para o desenvolvimento e estudo de novas formulações vacinais anti-*Leishmania*, podendo contribuir com resultados que auxiliem no entendimento da resposta imune pós vacinal e de possíveis efeitos adversos.



#### 4.1 - Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento de elementos da resposta imune inata e adquirida na migração celular em camundongos sensibilizados com adjuvantes vacinais isoladamente e/ou associados ao antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

#### 4.2 - Objetivos Específicos

**Etapa 1:** Avaliar a resposta imune local e sistêmica frente aos adjuvantes vacinais isoladamente, após uma única dose de adjuvante na região dorsal de camundongos *Swiss*, durante os tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas.

Para cumprir com tal etapa, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar a cinética da resposta inflamatória e a presença de diferentes células inflamatórias no local do inóculo;
- Analisar os níveis das enzimas MPO (mieloperoxidase) e NAG (N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase) em sobrenadante de macerado de pele de animais sensibilizados;
- Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em sobrenadante de macerado de pele de animais sensibilizados;
- Correlacionar os perfis de citocinas pró e anti-inflamatórias induzidas pelos adjuvantes ministrados durante o estudo cinético;
- Analisar a resposta hematológica dos animais sensibilizados por diferentes adjuvantes vacinais.



**Etapa 2:** Avaliar a resposta imune na pele, linfonodos drenantes e sangue de camundongos sensibilizados com as diferentes composições vacinais (antígeno total de *L. (V.) braziliensis* e os adjuvantes vacinais: saponina, adjuvante incompleto de Freund ou monofosforil lipídio A).

Para cumprir com tal etapa, foram propostos os seguintes objetivos específicos:

- Analisar a resposta local induzida por diferentes composições vacinais (LB+Adjuvante Vacinal);
- Avaliar no contexto *in vitro* o perfil de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>), macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) nos linfonodos drenantes;
- Avaliar no contexto *in vitro* a expressão da molécula co-estimuladora CD86 em células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) nos linfonodos drenantes;
- Avaliar no contexto *in vitro* o perfil de ativação celular (CD69 e CD25) em linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) nos linfonodos drenantes;
- Avaliar a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em sobrenadante de cultura de células de linfonodos drenantes;
- Analisar o perfil fenotípico das células mononucleares no sangue periférico: Células NK (CD49b<sup>+</sup>), monócitos (CD14<sup>+</sup>), linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e linfócitos B (CD19<sup>+</sup>).



## Etapa 1

### 5.1 - Animais e grupos experimentais

Na primeira etapa deste trabalho foram utilizados 140 camundongos machos *Mus musculus* albinos da linhagem *Swiss* com aproximadamente 2 a 3 meses de idade, obtidos da colônia de animais do setor de criação do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram mantidos em *racks* ventiladas com alimentação e água *ad libitum* por todo o tempo do experimento.

Os animais foram inoculados pela via intradérmica na região dorsal com os adjuvantes vacinais em uma dose única e avaliados após os tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas. Os animais do grupo controle foram inoculados com solução salina estéril 0,9% por via intradérmica.

Este projeto foi aprovado pela Câmara de Experimentação Animal do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP N° 008/2009 – 3 de março/2009) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) (Anexo 1) e os procedimentos utilizados neste trabalho estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para avaliar os efeitos provocados pelos diferentes adjuvantes, os animais foram distribuídos em 4 grupos experimentais com 5 animais para cada tempo da cinética, conforme descritos abaixo:

**Grupo CS:** inoculado com 50 $\mu$ L de solução salina estéril 0,9% (controle salina);

**Grupo SAP:** inoculado com o adjuvante Saponina (Sigma Chemical CO, St Louis, USA) na concentração de 100 $\mu$ g/dose no volume final de 50 $\mu$ L;

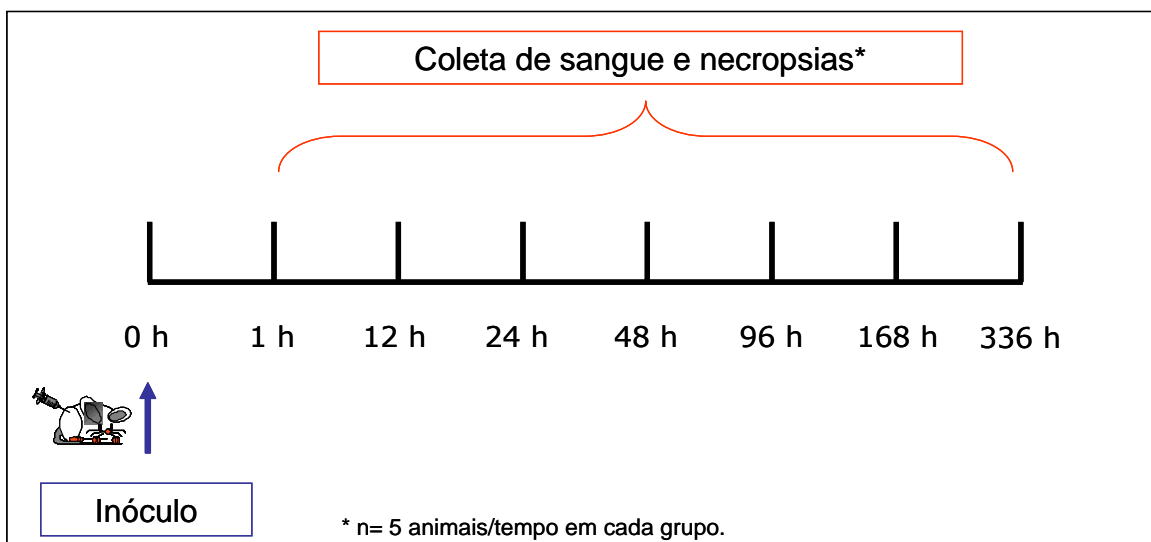
**Grupo AIF:** inoculado com o adjuvante incompleto de Freund (composição para cada mL: 0,85mL de óleo de parafina e 0,15mL de monoleato de manida, Sigma Chemical CO, St Louis, USA) na dose de 50 $\mu$ L;

**Grupo MPL:** inoculado com o adjuvante MPL-SE<sup>®</sup> (emulsão estável: 1000 $\mu$ g/mL de monofosforil lipídio A, 85,8mg/mL de esqualeno, 22,7mg/mL de glicerol, 20mg/mL de emulsificador e 1mL de água estéril) (Corixa, Hamilton, MT, USA) na concentração de 50 $\mu$ g/dose no volume final de 50 $\mu$ L.

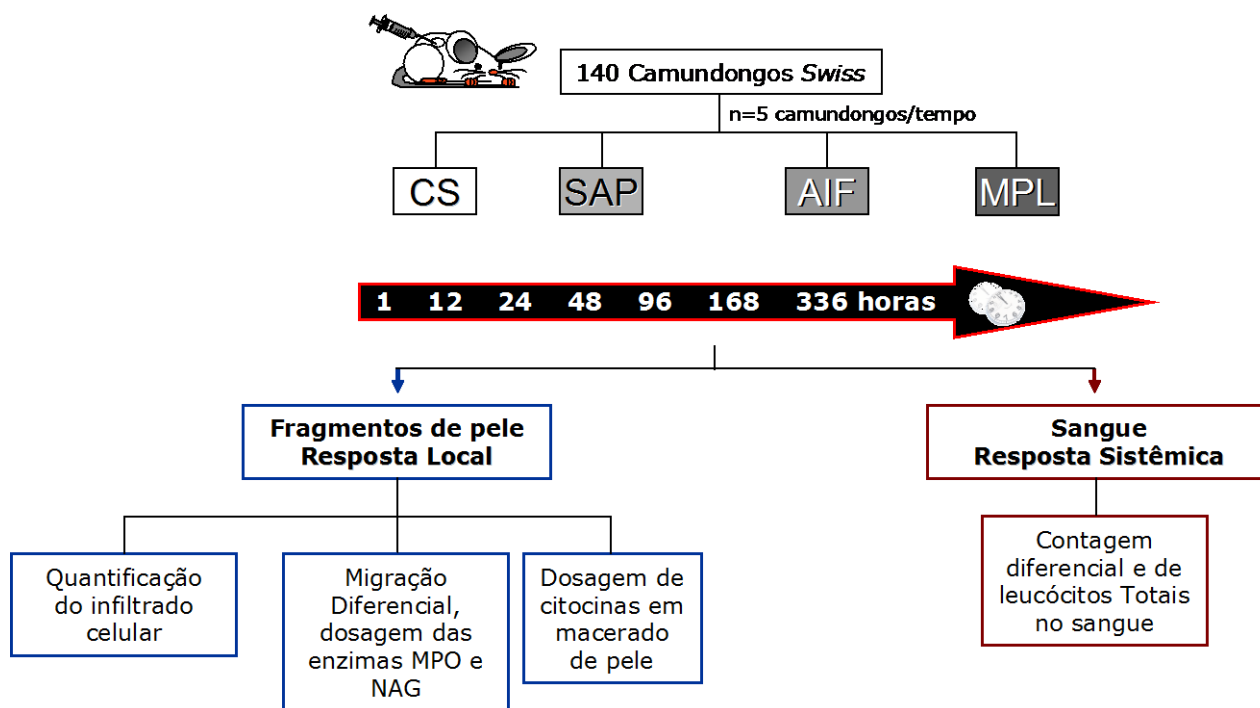
As doses inoculadas de cada adjuvante tiveram volume final estabelecido em 50 $\mu$ L, dose recomendada para o modelo murino utilizando a via intradérmica para

imunização, em conformidade com o estabelecido pelo *Guidelines for the Research Use of Adjuvants* da *Office of Animal Care and Use Staff* (<http://oacu.od.nih.gov/ARAC/freunds.pdf>). As concentrações utilizadas dos adjuvantes foram fundamentadas de acordo com trabalhos da literatura.

Após o inóculo (tempo 0), cinco animais de cada grupo em cada hora da cinética (1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas) foram anestesiados pela administração intraperitoneal de tiopental sódico 2,5% diluído conforme instrução do fabricante (Tiopentax – Cristalia®, 30mg/Kg) para a coleta de sangue. Logo após este procedimento, os animais receberam uma dose letal de anestésico e realizou-se a necropsia, onde foram coletados fragmentos da pele da região dorsal, do local onde os adjuvantes foram inoculados.



**Figura 1:** Esquema de imunização, coleta de sangue e necropsias dos animais



**Figura 2:** Delineamento experimental da etapa 1.

## 5.2 - Parâmetros avaliados

### 5.2.1 - Parâmetros histológicos

Os fragmentos de pele foram aderidos a um pedaço de cartolina branca com a derme voltada para baixo, evitando-se a deformação do tecido e ondulação epidérmica e, desta forma obtendo-se uma melhor qualidade do corte. As amostras de pele foram fixadas em formol 10% por 24 horas, e, posteriormente, processadas e incluídas em parafina. Após o processamento histológico, o material foi cortado em micrótomo na espessura de cinco micrômetros e o corte obtido foi corado por Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação das alterações histopatológicas, bem como, quantificação do infiltrado celular e avaliação do perfil de células inflamatórias presentes no infiltrado.

Para a quantificação do infiltrado celular, os cortes foram fotografados e analisados através da análise de imagem por morfometria. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B utilizando-se o programa Leica Application Suite (Versão 2.4.0 R1, Leica Microsystems-Switzerland Ltd) e todas as imagens foram analisadas com o auxílio do software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 (Leica Microsystems-Switzerland Ltd) no Laboratório

Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. A análise da pele foi realizada através da contagem de todos os núcleos celulares, excluindo os folículos pilosos, anexos da pele e células da epiderme.

A escolha pela análise em 20 imagens foi devido a estudos prévios realizados no laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP), onde foram demonstrados que esse número de campos é suficiente para a obtenção de um resultado representativo da lâmina inteira (Vitoriano-Souza, 2008; Vitoriano-Souza *et al.*, 2008).

Para avaliação do perfil celular na pele foi realizada a contagem diferencial (em %) das principais células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos) na pele de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais.

### **5.2.2 - Obtenção de sobrenadante de macerado de pele para dosagens enzimáticas e de citocinas**

Para a dosagem enzimática de N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) e de citocinas, as amostras de pele foram processadas conforme descrito a seguir. Inicialmente, os fragmentos de pele foram pesados e armazenados em tubos cônicos de 2mL devidamente identificados. O processo de maceramento dos tecidos para NAG foi realizado com 2,0mL de solução de NaCl a 0,9% w/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Sigma Chemical CO, St Louis, USA) utilizando o homogeneizador de tecido (Polytron Homo mix). As amostras destinadas a dosagem de citocinas foram maceradas utilizando tampão específico para citocinas (PBS contendo inibidores de proteases: 0,1mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1mM de cloreto de benzetônio, 10mM de EDTA e 20KI de aprotinina A e 0,05% de Tween 20).

Após a maceração das amostras, procedeu-se à centrifugação a 5000xg durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior ensaio enzimático e dosagem de citocinas.

### **5.2.3 - Dosagem da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada nos grânulos azurófilos de neutrófilos. A dosagem de MPO vem sendo empregada como um marcador bioquímico de recrutamento e ativação de leucócitos polimorfonucleares (Bradley *et al.*, 1982).

As amostras de pele foram maceradas em um microtubo com 2,0mL de solução de NaCl a 0,9% w/v contendo 0,1% v/v de Triton X-100 (Sigma Chemical CO, St Louis, USA) utilizando o homogeneizador de tecido (Polytron Homo mix). Nos tubos contendo a suspensão com o *pellet* (300 µL) adicionou-se 600µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio, Sigma-Aldrich Co St. Louis, MO, USA) a 0,75%, em tampão fosfato de sódio a 80 mM, pH 5,4. Essa mistura foi homogeneizada com pipeta, seguida pela sonicação das mesmas por 10 segundos em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor® - Branson Sonic Power Co. EUA), e após esse processo foram recolocadas no gelo. Logo após essa etapa, realizou-se a centrifugação das mesmas a 10000xg por 10 minutos a 4°C, onde foi coletado o sobrenadante dessa mistura.

O ensaio enzimático foi realizado da seguinte maneira: em uma placa de 96 poços foi adicionado 25µL da amostra, posteriormente foi colocado 50µL do substrato TMB (3,3', 5'5-Tetramethylbenzidine, Sigma Chemical CO, St Louis, USA) e realizou-se a incubação a 37°C por 10 minutos. A reação foi paralisada com 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450nm. A atividade de MPO foi expressa em densidade óptica (D.O)/mg de tecido.

#### 5.2.4 - Dosagem da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) é uma enzima lisossômica produzida por macrófagos ativados. A dosagem do NAG é uma técnica utilizada como índice da infiltração de leucócitos mononucleares nos sítios inflamatórios (Bailey, 1988).

Após a obtenção do sobrenadante de macerado da pele procedeu-se o ensaio enzimático: 100µL do sobrenadante das amostras (diluído 1:6) foram adicionados a placa de ELISA em duplicata. Às amostras foram adicionados 100µL do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glicosamina) (Sigma-Aldrich Co St. Louis, MO, USA) diluído a 2,24 mM em tampão citrato-fosfato pH 4,5. Sobrenadante e substrato foram incubados a 37°C durante 10 minutos. A curva padrão foi preparada em duplicata a partir de uma solução estoque de 400nmol/mL de p-nitrofenol. Para paralisar a reação foi adicionado 100µL de tampão glicina pH 10,6 (misturados volumes iguais de glicina a 0,8M; NaCl a 0,8M e NaOH a 0,8M) em todos os poços (relativos ao branco, à curva padrão e às amostras). A absorbância foi medida por espectrofotometria em leitor ELISA a 400nm.

Os resultados foram expressos como atividade de NAG em nmol/mL de p-nitrofenol/mg de tecido.

### 5.2.5 - Quantificação de citocinas por CBA (*Cytometric Bead Array*)

O kit de quantificação de citocinas murinas (*BD Cytometric Bead Array – CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit*) foi utilizado para quantificar as citocinas IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-4 e IL-10 no sobrenadante de macerado da pele de camundongos. Para a realização desta quantificação os experimentos foram conduzidos conforme especificações da bula e protocolo de marcação proposto pelo fabricante com pequenas modificações (Becton, Dickinson and Company, Catalog N°. 560485). Antes da execução da técnica, as amostras foram descongeladas em banho-maria a 37°C e, posteriormente, centrifugadas a 10000xg por 10 minutos para a coleta do sobrenadante. O padrão foi reconstituído 15 minutos antes com 2,0mL do Reagente G (solução tampão) e obtiveram-se as seguintes diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128 e 1/256. Uma mistura de *beads* foi preparada antes do uso, cerca de 3 $\mu$ L de cada suspensão de *beads* para cada ensaio. Durante a execução do ensaio, adicionou-se 21 $\mu$ L das misturas de *beads* a 25 $\mu$ L dos padrões, nas respectivas diluições; e também a 25 $\mu$ L das amostras nos respectivos tubos para a realização do ensaio. Logo em seguida, adicionou-se em todos os tubos 18 $\mu$ L do Reagente B (Reagente de detecção marcado com PE) e incubou-se por 2 h, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, adicionou-se 500 $\mu$ L do Reagente F (solução de lavagem) em cada tubo, centrifugou-se a 600xg por 7 min a 18°C. O sobrenadante foi aspirado com auxílio de bomba de vácuo, deixando aproximadamente 100 $\mu$ L do sobrenadante em cada tubo e novamente, adicionou-se 100 $\mu$ L do Reagente F em cada tubo e procedeu-se a leitura. Para a leitura das amostras foi utilizado o citômetro de fluxo (FACScalibur® Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Os dados obtidos foram armazenados em mídia eletrônica e analisados com o software FCAP Array Software™ (Soft Flow Hungary Ltd, BD Biosciences).

### 5.2.6 - Parâmetros hematológicos

A coleta de sangue foi realizada com o anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) pelo plexo orbital com auxílio de uma pipeta, onde 50 $\mu$ L



do sangue foi processado, para a realização do hemograma no aparelho Auto Hematology Analyzer (Mindray BC-2800Vet, Hamburgo, Alemanha). O perfil hematológico dos animais foi determinado e avaliado pelos parâmetros relacionados à série vermelha (eritrócitos e plaquetas) e branca (global de leucócitos). Uma parte dessa amostra de sangue, aproximadamente 10 $\mu$ L foi utilizada na confecção de esfregaços que foram corados pelo *Giemsa* para a contagem diferencial de células. Assim, o leucograma foi realizado por microscopia óptica em objetiva de imersão 100x, por meio da contagem de 100 leucócitos por lâmina no sentido de complementar os parâmetros da série branca (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos).

Cerca de 200 $\mu$ L de sangue coletado em EDTA foi utilizado para a realização da imunofenotipagem das células mononucleares do sangue periférico, conforme será descrito mais adiante.

Coletou-se também sangue em um tubo sem anticoagulante, centrifugado a 10000xg por 10 minutos para obtenção das amostras de soro, que foram aliquotadas e congeladas a - 80°C para futuras análises

## Etapa 2

A segunda etapa desse trabalho teve como objetivo avaliar a resposta imune específica compartimentalizada (pele, linfonodos drenantes e sangue) frente à sensibilização com a associação do antígeno total de *L. (V.) braziliensis* e adjuvantes vacinais (saponina, adjuvante incompleto de Freund ou monofosforil lipídio A).

### 5.2.7 - Animais e grupos experimentais

A avaliação da resposta imune específica à composição vacinal foi realizada através da sensibilização de 96 camundongos *Swiss* intradermicamente com uma única dose na região dorsal, onde a pele do local, os linfonodos drenantes e sangue foram coletados para a realização das análises propostas nos tempos de 24 e 48 horas. Os animais foram distribuídos em 8 grupos experimentais com 6 animais cada:

**Grupo CS:** inoculado com 50µL de solução salina estéril 0,9% (controle salina);

**Grupo LB:** inoculado com o antígeno vacinal (antígeno total de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*) na concentração de 60µg/dose diluído em solução salina estéril 0,9% em volume final de 50µL;

**Grupo SAP:** inoculado com o adjuvante Saponina (Sigma Chemical CO, St Louis, USA) na concentração de 100µg/dose em volume final de 50µL;

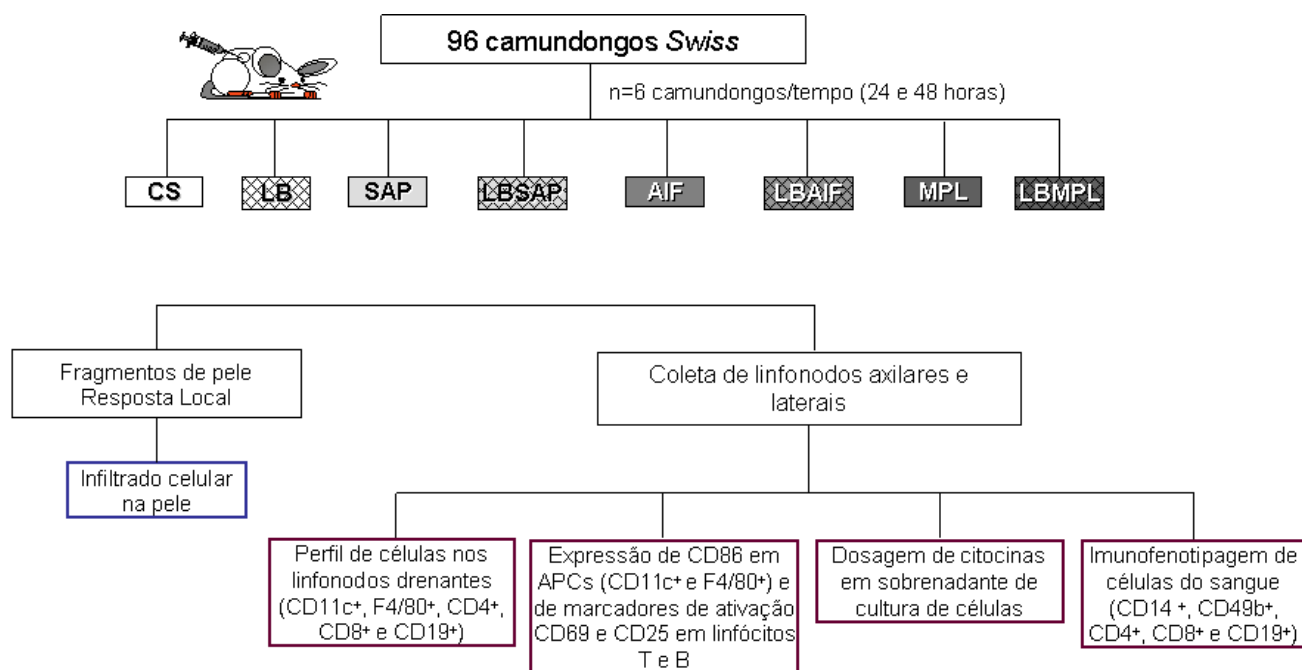
**Grupo LBSAP:** inoculado com a associação: antígeno vacinal LB (60µg/dose) e adjuvante Saponina (100µg/dose) em volume final de 50µL;

**Grupo AIF:** inoculado com o adjuvante incompleto de Freund (composição para cada mL: 0,85mL de óleo de parafina e 0,15mL de monoleato de manida, Sigma Chemical CO, St Louis, USA) na dose de 50µL;

**Grupo LBAIF:** inoculado com a associação: antígeno vacinal LB (60µg/dose) e adjuvante incompleto de Freund em volume final de 50µL;

**Grupo MPL:** inoculado com o adjuvante MPL-SE<sup>®</sup> (emulsão estável: 1000µg/mL de monofosforil lipídio A, 85,8mg/mL de esqualeno, 22,7mg/mL de glicerol, 20mg/mL de emulsificador e 1mL de água estéril) (Corixa, Hamilton, MT, USA) na concentração de 50µg/dose no volume final de 50µL;

**Grupo LBMPL:** inoculado com a associação: antígeno vacinal LB (60µg/dose) e adjuvante monofosforil lipídio A (50µg/mL) em volume final de 50µL.



**Figura 3:** Delineamento experimental da etapa 2.

### 5.2.8 - Produção do antígeno vacinal

O antígeno vacinal utilizado neste trabalho foi produzido a partir de cultura da cepa de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) cultivada em meio de cultura ágar-sangue, Nicolle-Novy-Neal (NNN) associado ao *Liver Infusion Tryptose* (LIT). A cultura foi expandida em meio LIT até a obtenção de massa de promastigotas suficiente para a produção do antígeno vacinal conforme metodologia descrita por Giunchetti e colaboradores (2007).

Realizou-se a lavagem do sedimento de *L. (V.) braziliensis* com salina estéril 0,9%, descartando o sobrenadante. Após a lavagem, os tubos com a massa (sedimento) de *L. (V.) braziliensis* foram imersos em nitrogênio líquido por 30 segundos e, em seguida, em banho-maria a 37°C até o descongelamento. Repetiu-se o procedimento por 3 vezes. O rompimento das promastigotas foi continuado em ultra-som (Sonifier Cell Disruptor®- Brason Sonic Power Co. EUA) através de 5 ciclos de 1 minuto a 40 Watts em intervalos de 15 segundos.

Novamente, os tubos foram imersos em nitrogênio líquido, seguido pelo descongelamento em banho-maria a 37°C (repetido 3 vezes). Posteriormente, em ultra-som, foram realizados 5 ciclos de 1 minuto. Finalmente, a verificação do rompimento

da *Leishmania* foi confirmada através da confecção de lâmina para examinar a presença de promastigotas íntegras. O antígeno vacinal foi alíquotado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Forma Scientific, EUA). A concentração protéica foi dosada pelo método de Lowry (1951). A concentração do antígeno total em suspensão utilizada em cada dose foi de  $60\mu\text{g}/\text{dose}$  em solução salina estéril.

### 5.2.9 - Imunofenotipagem do sangue periférico

O perfil imunofenotípico das populações e subpopulações de células do sangue periférico de camundongos foi avaliado por citometria de fluxo. Anti-CD3 (PE Hamster anti-Mouse CD3, clone 145-2C11, Biolegend), anti-CD-4 (PercP-Cy<sup>TM</sup> 5.5 Rat anti-Mouse CD4, clone RM4-5, BD Pharmingen<sup>TM</sup>), anti-CD8 (FITC Rat anti-Mouse CD8a, clone 5H10, Catalg), anti-CD14 (FITC Rat anti-Mouse CD14, clone Sa2-8, eBioscience), anti-CD19 (FITC Rat anti-Mouse CD19, clone 6D5, Catalg) e anti-CD49b (FITC Rat Anti-Mouse CD49b, clone DX5, BD Pharmingen<sup>TM</sup>) foram os anticorpos utilizados nesse experimento.

Para a realização desta metodologia, foram colocados  $5\mu\text{L}$  do anticorpo monoclonal previamente diluído em PBS-W estéril (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina - BSA e 0,1% de azida sódica), seguido pela adição de  $25\mu\text{L}$  de sangue periférico total coletado em EDTA (Sigma) em cada tubo. Estas amostras foram homogeneizadas em *vórtex* e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, adicionando-se 2mL de solução de lise (*Facs lysing solution* - Becton Dickinson, San Jose, EUA) em constante homogeneização em *vórtex*, incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação ( $600\times g$  por 7 minutos a  $18^{\circ}\text{C}$ ). O sobrenadante foi descartado e então iniciada a etapa de lavagem dos leucócitos com 3mL de PBS-W (pH 7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas.

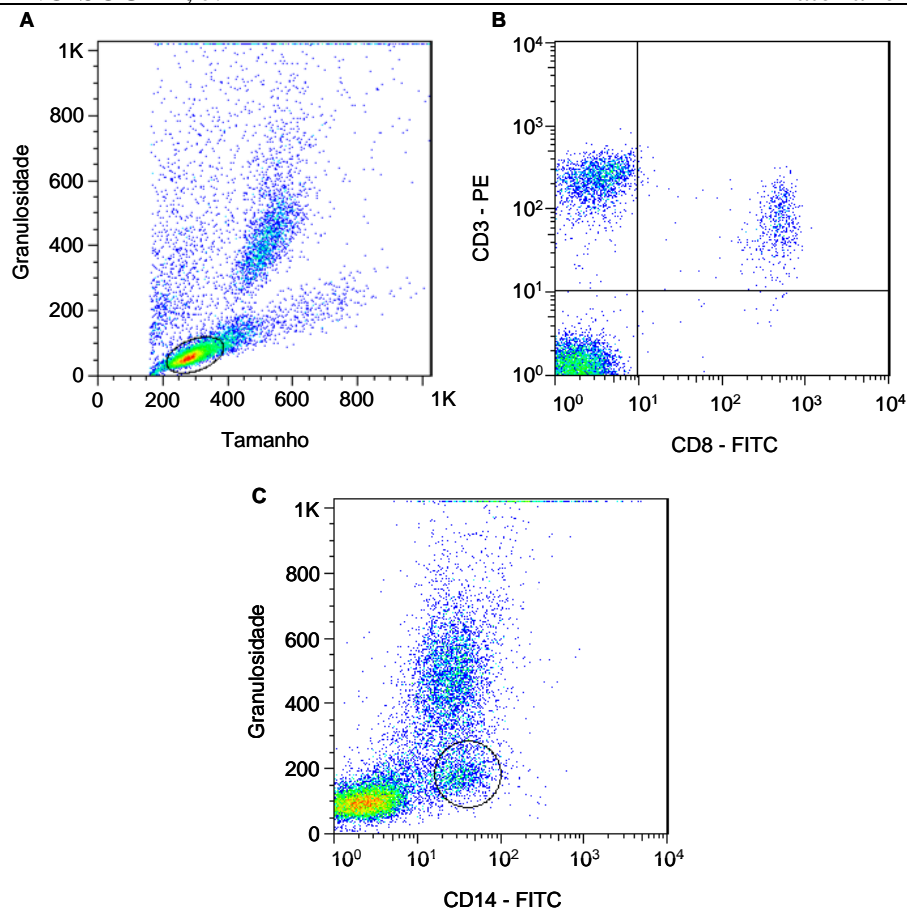
Na etapa final, os leucócitos foram fixados com  $200\mu\text{L}$  de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1 % de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2) e os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA). Um total de 15.000 eventos foi lido para cada amostra. O programa CELLQuest® (Franklin Lakes, NJ, USA) foi utilizado para a aquisição dos dados. O

programa Flow Jo (Flow Cytometry Analysis Software 7.6, Tree Star, Inc. Ashland, USA) foi utilizado para análise de dados. Ligações inespecíficas foram monitoradas através de isotipos marcados com fluorocromos combinados para fornecer controles negativos confiáveis. Houve monitoração da autofluorescência através de um controle negativo de suspensão de células incubadas na ausência de anticorpos marcados com fluorocromos, mas na presença de tampões de diluição e de lavagem.

#### **5.2.10 - Análise fenotípica de células do sangue periférico**

A análise da frequência de células mononucleares foi realizada de acordo com o fenótipo selecionado. A avaliação das células NK e linfócitos T e B foi realizada através de análise convencional, onde a população celular de interesse (R1) (Figura 4A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a frequência de populações celulares, dentro de R1, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (Figura 4B).

A análise de monócitos CD14<sup>+</sup> foi realizada a partir da construção de gráficos de fluorescência FL1/anti-CD-14 FITC *versus* granulosidade (SSC) (Figura 4C).



**Figura 4:** Análise da frequência de células NK, linfócitos T e B e monócitos CD14<sup>+</sup>. (A) Gráfico de distribuição pontual tamanho *versus* granulosidade utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 *versus* FL2 utilizado para quantificar o percentual de células NK e linfócitos em R1. (C) Gráfico de distribuição pontual FL1 *versus* granulosidade utilizado para quantificar o percentual de monócitos CD14<sup>+</sup>.

#### 5.2.11 - Avaliação fenotípica de células do linfonodo *in vitro* após a estimulação com antígeno de *L. (L.) infantum*

Para identificar as populações de células presentes nos linfonodos drenantes dos camundongos sensibilizados com os adjuvantes vacinais ou pela associação do antígeno de *L. (V.) braziliensis* e adjuvantes (saponina, adjuvante incompleto de Freund ou monofosforil lipídio A) e analisar a capacidade de ativação celular induzida em cada grupo experimental, foram realizadas imunofenotipagens das células dos linfonodos de camundongos no contexto *in vitro*, nos tempos de 24 e 48 horas, por citometria de fluxo.

Em uma capela de fluxo laminar, os linfonodos drenantes (laterais e axilares) foram retirados e macerados em meio RPMI 1640 para obtenção de células, as quais foram centrifugadas a 600xg a 10°C por 7 minutos, e ressuspensas em volume de 1mL

para a contagem das mesmas em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) com o líquido de Turk. As células do macerado dos linfonodos drenantes foram ajustadas a uma suspensão contendo  $5 \times 10^5$  células/poço. A seguir, 250 $\mu$ L dessa suspensão foram distribuídos em duplicata em placas de microcultura de 48 poços com fundo chato. Essa suspensão celular foi cultivada com 250 $\mu$ L de meio RPMI (acrescido com soro fetal bovino, penicilina,  $\beta$ -mercaptoetanol e L-glutamina) e com 25 $\mu$ L dos estímulos diluídos (10 $\mu$ g/mL de mitógeno concanavalina-A ou 25 $\mu$ g/mL de antígeno sonificado de *L. (L.) infantum*).

As células foram incubadas por 72 horas em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 600xg a 10°C por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado em microtubos em freezer a -80°C para posterior dosagem das citocinas. A suspensão celular destinada a imunofenotipagem foi removida da microplaca com auxílio de pipeta Pasteur para tubos de poliestireno (Falcon<sup>®</sup> 2054, Becton Dickinson, San Diego, EUA) com 1,5mL de RPMI 1640 para subsequente centrifugação a 600xg a 10°C por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas para o volume de 500 $\mu$ L.

Os anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos anti-células utilizados nesse trabalho foram: Anti-CD3 (PE Hamster anti-Mouse CD3, clone 145-2C11, Biolegend), anti-CD-4 (PercP-Cy<sup>™</sup> 5.5 Rat anti-Mouse CD4, clone RM4-5, BD Pharmingen<sup>™</sup>), anti-CD8 (FITC Rat anti-Mouse CD8a, clone 5H10, Catalg), anti-CD14 (FITC Rat anti-Mouse CD14, clone Sa2-8, eBioscience), anti-CD19 (FITC Rat anti-Mouse CD19, clone 6D5, Catalg), anti-CD11c (APC Hamster Anti-Mouse CD11c, clone HL, BD Pharmingen<sup>™</sup>), anti-F4/80 (FITC Anti-Mouse F4/80 Antigen, clone BM8, eBioscience). Os marcadores relacionados à ativação celular foram: anti-CD86 (PE Rat anti-Mouse CD86, clone GL1, BD Pharmingen<sup>™</sup>), anti-CD69 (Hamster anti-Mouse CD69, clone H1.2F3, BD Pharmingen<sup>™</sup>) e anti-CD25 (PE Rat anti-Mouse CD25, clone 3C7, BD Pharmingen<sup>™</sup>).

O ensaio foi realizado com a incubação de 50 $\mu$ L da suspensão celular e 5 $\mu$ L de cada anticorpo (em diluição previamente padronizada) por 30 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após este período, adicionou-se 1mL de PBS-W e centrifugou-se a 600xg a 10°C por 10 minutos. O tubo foi vertido, as células ressuspendidas em 200 $\mu$ L da solução fixadora. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo e 20000 eventos por amostra foram adquiridos. O programa CELLQuest<sup>®</sup>

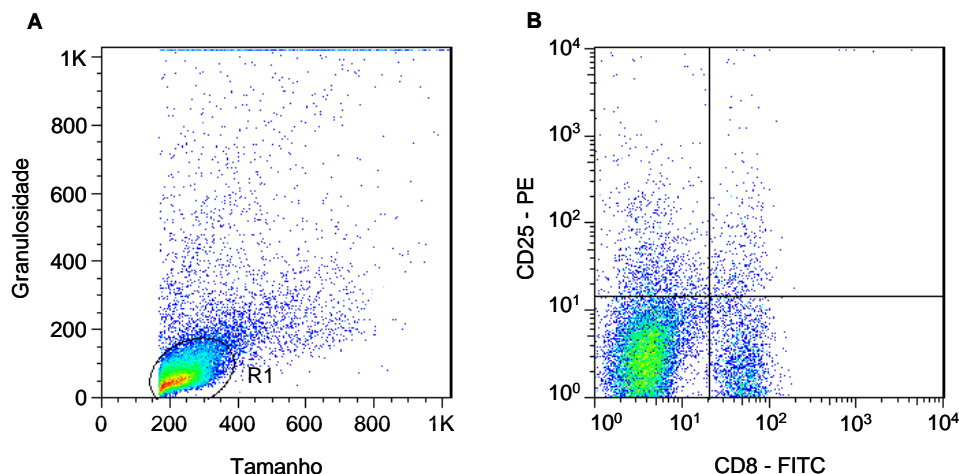
(Franklin Lakes, NJ, USA) foi utilizado para a aquisição dos dados e o programa Flow Jo (Flow Cytometry Analysis Software 7.6., Tree Star, Inc. Ashland, USA) para a análise. Como descrito no experimento anterior de citometria de fluxo, foram realizados controles para verificar ligações inespecíficas e autofluorescência.

#### **5.2.12 - Estratégia de análise imunofenotípica de células e de marcadores de ativação celular**

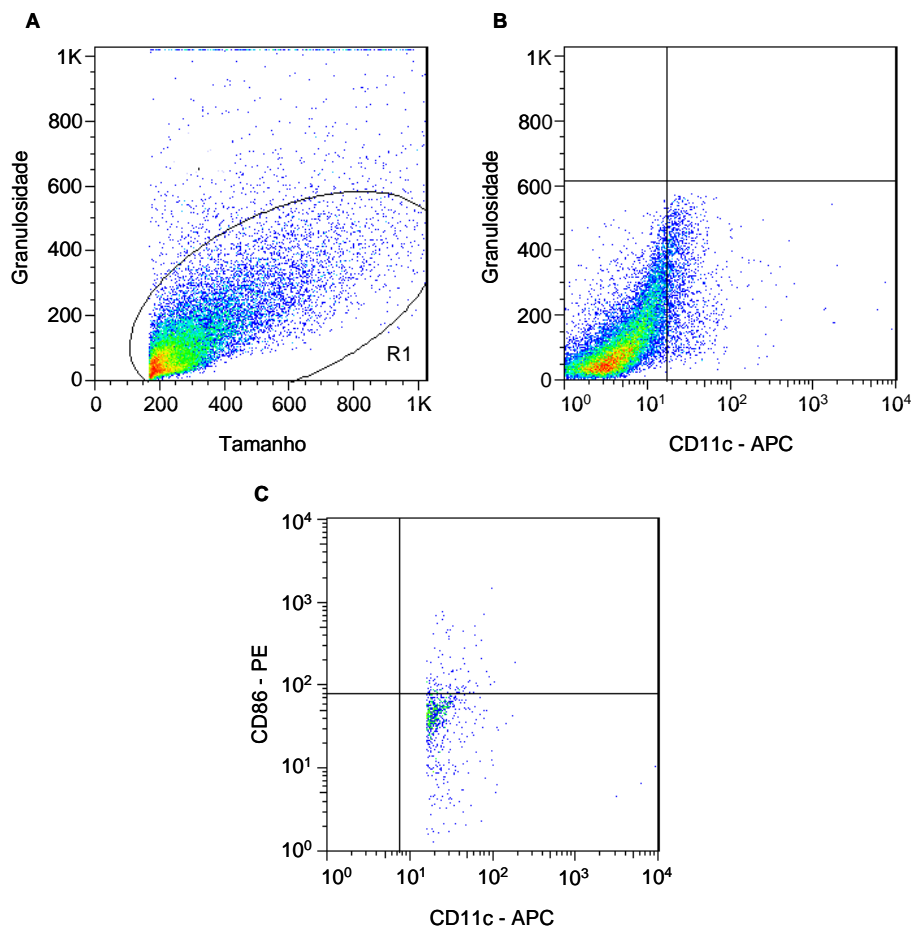
Os dados obtidos por citometria de fluxo foram analisados de acordo com os fenótipos selecionados. Deste modo, a análise da frequência dos linfócitos T e B foi realizada através da análise convencional, onde a população celular de interesse (R1) (Figura 5A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a frequência de populações celulares expressando marcadores de ativação (CD25 e CD69) dentro de R1 foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (Figura 5B).

A análise de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) foi realizada através da seleção de toda população obtida em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 6A). Após essa seleção, foram construídos gráficos de fluorescência (FL4-CD11c<sup>+</sup> e FL1-F4/80<sup>+</sup>) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 6B). Dentro de cada população de interesse, a expressão da molécula co-estimuladora CD86 foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência (Figura 6C).





**Figura 5:** Análise da frequência de linfócitos T e B e da expressão de marcadores de ativação celular. (A) Gráfico de distribuição pontual tamanho *versus* granulosidade utilizado para a seleção da população de linfócitos – R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 *versus* FL2 utilizado para quantificar o percentual de células de linfócitos T e B e da expressão de marcadores de ativação celular em R1.



**Figura 6:** Análise da frequência de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) e da expressão da molécula co-estimuladora CD86. (A) Gráfico de distribuição pontual tamanho *versus* granulosidade utilizado para a seleção da população total - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual fluorescência *versus* granulosidade utilizado para quantificar o percentual de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) em R1. (C) Gráfico de distribuição pontual FL4 ou FL1 *versus* FL2 utilizado para quantificar expressão da molécula co-estimuladora CD86.

### 5.2.13 - Análise estatística

Os resultados obtidos foram planilhados e os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Para comparação entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA one-way). Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi empregado como pós-teste para determinar as diferenças específicas entre as médias. Correlações foram realizadas entre citocinas de perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório utilizando o coeficiente de Pearson ( $r$ ).



O delineamento experimental desse trabalho foi subdividido em duas etapas, sendo os resultados apresentados em duas partes: a primeira, referente à resposta induzida por adjuvantes na pele e no sangue, e a segunda aos resultados da resposta imune específica à composição vacinal nos compartimentos: pele, linfonodos drenantes e sangue.

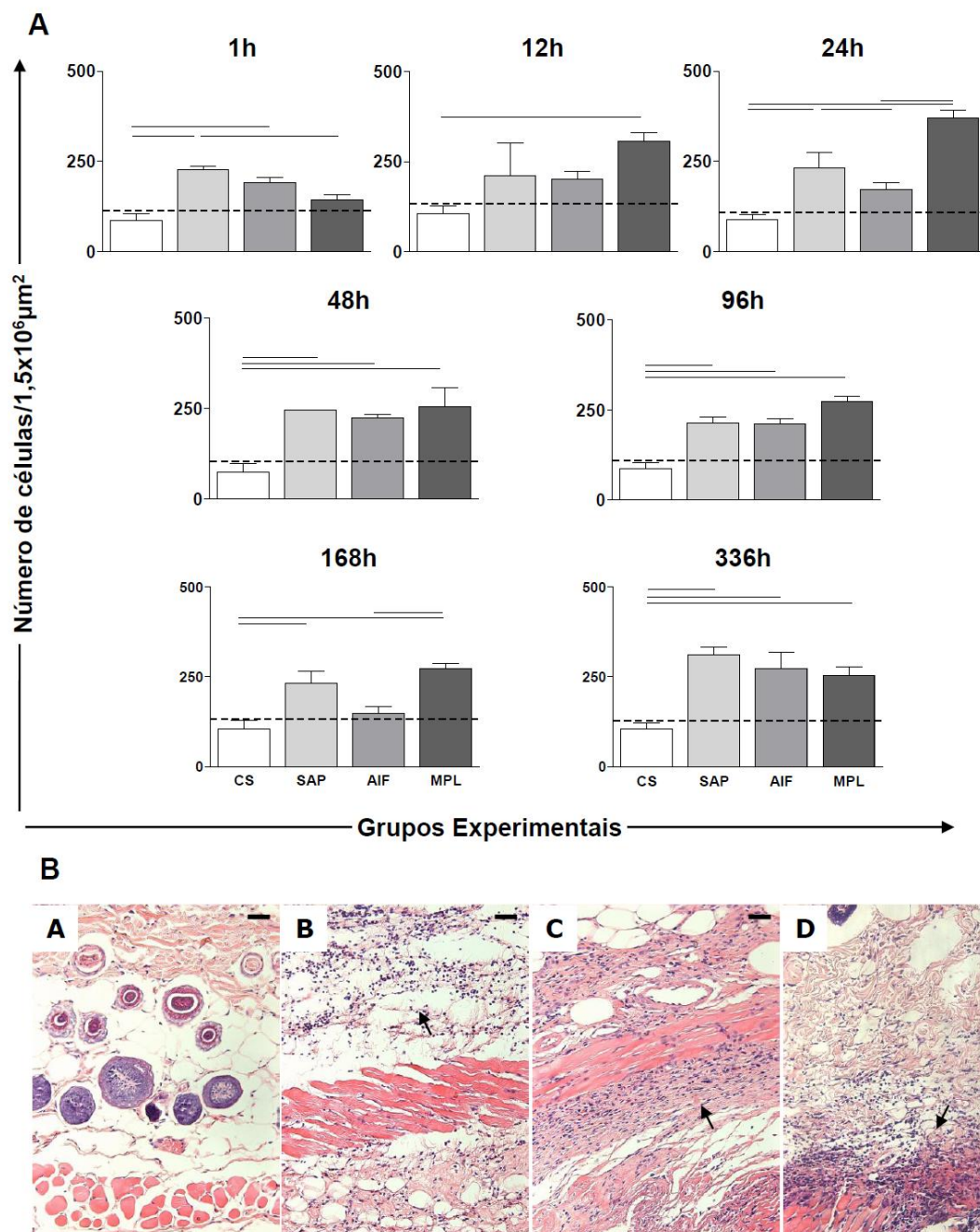
## **Etapa 1: Resposta aos adjuvantes vacinais isoladamente**

### **6.1 - Quantificação do infiltrado celular na pele de camundongos**

Considerando que a indução da inflamação no local da imunização é uma característica compartilhada por diferentes classes de adjuvantes e está intimamente relacionada aos danos causados por estes aditivos vacinais, decidiu-se avaliar a resposta inflamatória causada pelos adjuvantes vacinais [Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lipídio A (MPL)] na pele de camundongos após os tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas (h) sendo os resultados obtidos apresentados na Figura 7.

Os resultados mostraram que os três adjuvantes induziram inflamação com aumento significativo da migração celular para o local da sensibilização, porém o início desse processo foi observado em tempos distintos. O adjuvante Saponina induziu na pele aumento no número de células inflamatórias recrutadas no tempo inicial de 1 h, todavia esse aumento foi novamente observado a partir de 24 h e manteve-se até o final da avaliação cinética. O AIF apresentou aumento no infiltrado celular no tempo inicial de 1 h, no entanto, aumento significativo só foi observado novamente a partir de 48 h. O adjuvante MPL promoveu aumento do recrutamento celular a partir de 12 h, sendo mantido até o final da cinética (Figura 7.A).

Na figura 7.B, visualiza-se a intensidade e distribuição do infiltrado celular na pele induzido pelos três diferentes adjuvantes vacinais em relação ao controle. Nos grupos SAP e AIF o infiltrado celular apresentou-se difuso, com predomínio de células inflamatórias nas camadas adiposa e muscular que compõem a hipoderme. Entretanto, o grupo MPL promoveu recrutamento celular mais focal, associado à camada muscular da hipoderme. É importante destacar, que não foram observadas ulcerações na pele dos animais sensibilizados.



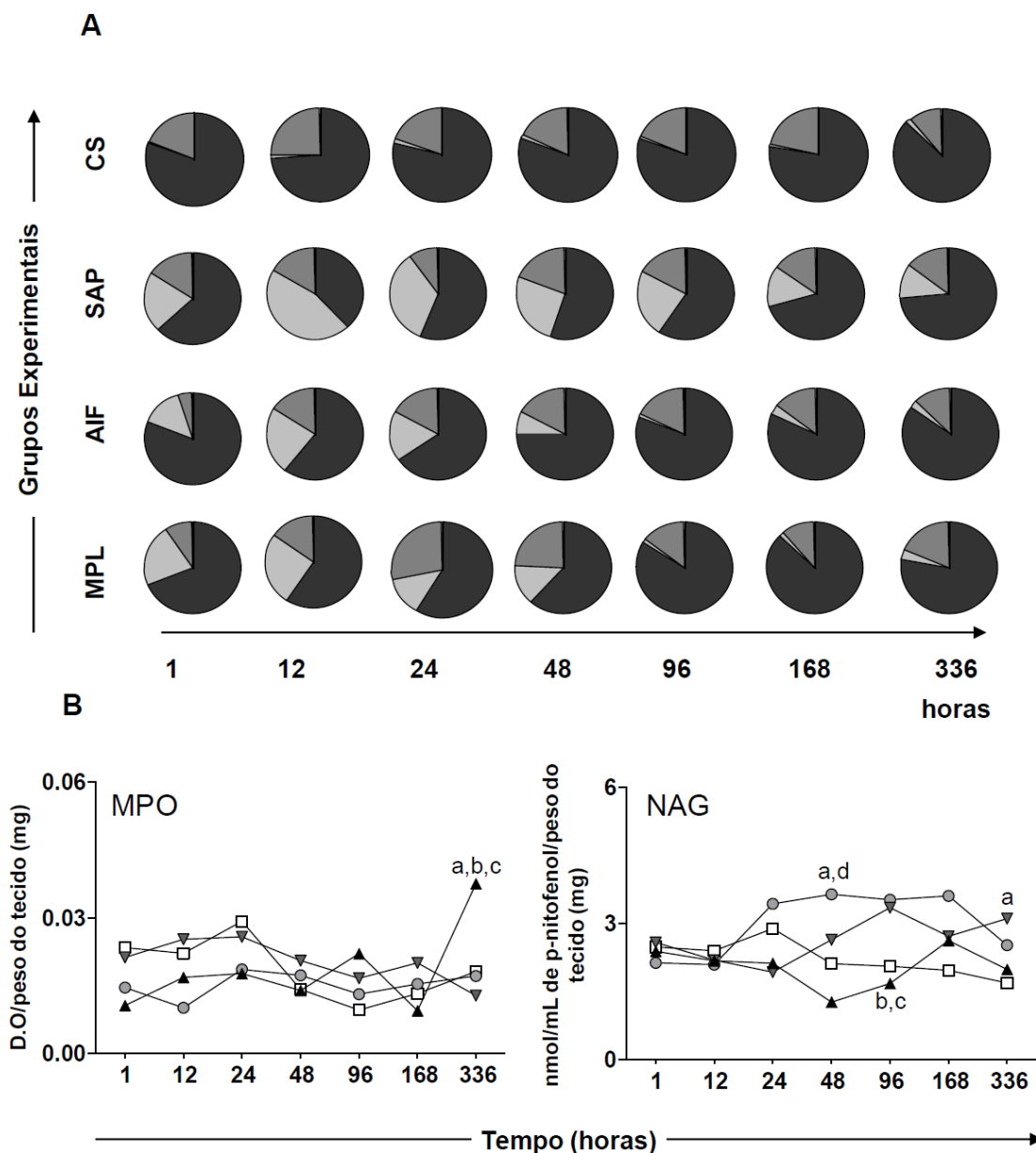
**Figura 7:** Avaliação do infiltrado celular na pele de camundongos sensibilizados com os adjuvantes vacinais: Saponina (SAP;□), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;□) e Monofosforil Lipídio A (MPL;□) nos tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a sensibilização. O grupo controle (C;□) foi inoculado com salina. 7.A: quantificação dos núcleos celulares na pele. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão de cinco camundongos por grupo em cada tempo. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos da pele de animais controle. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas pelas linhas conectoras. 7.B: fotomicrografias de cortes histológicos representativas do infiltrado celular em 48 horas em (A) grupo controle, (B) SAP, (C) AIF e (D) MPL. As setas indicam o processo inflamatório. Hematoxilina-Eosina, 20X, barra=100 $\mu\text{m}$ .

## 6.2 - Análise da migração celular diferencial e da ativação celular (MPO e NAG)

Depois de confirmado o recrutamento de células inflamatórias para o local do inóculo, os principais tipos celulares presentes no foco inflamatório foram avaliados, bem como a ativação das populações celulares através da dosagem da atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO) e N-acetil- $\beta$ -D-glicosinamidase (NAG). Os resultados estão apresentados na figura 8.

A contagem diferencial das células na pele por meio da microscopia óptica revelou que os principais tipos celulares presentes foram neutrófilos, macrófagos e linfócitos. É importante ressaltar que a contagem diferencial realizada no tecido nos permite identificar a presença de: neutrófilos, macrófagos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos. Contudo, não foram detectados mastócitos e eosinófilos na pele destes animais. No grupo controle, observou-se predomínio de células mononucleares (macrófagos e linfócitos). Nos grupos sensibilizados com os adjuvantes vacinais, além de macrófagos e linfócitos, houve migração seletiva de neutrófilos, sendo que a mesma apresentou um pico em 12 h nos grupos SAP, AIF e MPL, correspondente ao pico de inflamação aguda. Contudo, observou-se que o adjuvante Saponina induziu intenso fluxo de neutrófilos quando comparado aos demais grupos no intervalo de 1 a 336 h após estímulo. Os adjuvantes AIF e MPL promoveram recrutamento de neutrófilos de 1 a 48 h, contudo, estes foram recrutados em menor proporção até o final da cinética (Figura 8.A).

Na figura 8.B está representada a atividade enzimática de MPO (referente a neutrófilos) e NAG (referente a macrófagos). Os resultados mostraram aumento da atividade de MPO apenas no grupo MPL quando comparado aos demais em 336 h. Quanto à atividade de NAG, observou-se em 48 h, aumento da atividade no grupo SAP quando comparado aos grupos controle e MPL. Em 96 h, esse aumento foi verificado nos grupos SAP e AIF em relação ao grupo MPL e em 336 h, houve aumento significativo no grupo AIF quando comparado ao controle.



**Figura 8:** Migração celular diferencial e análise de ativação celular (MPO e NAG) na pele de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais nos tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a sensibilização. 8.A: contagem diferencial em cortes de pele corados por Hematoxilina-Eosina, mostrando os principais tipos celulares recrutados para a pele: neutrófilos (□), macrófagos (■) e linfócitos (▣). 8.B: gráficos representam a atividade de MPO e NAG nos grupos CS (□), SAP (○), AIF (▽) e MPL (▲). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos são representadas pelas letras "a", "b", "c" e "d", referentes aos grupos CS, SAP, AIF e MPL, respectivamente.

### 6.3 - Cinética da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias induzidas por diferentes adjuvantes vacinais

A indução de citocinas por células efectoras é importante para a criação de um microambiente favorável ao estabelecimento de uma resposta imune adequada à resposta vacinal. Nesse sentido, a fim de complementar os resultados referentes a resposta imune induzida após a sensibilização, foi realizada a quantificação das seguintes citocinas em sobrenadante de macerado de pele: IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 e IL-10 e os resultados estão apresentados nas figuras 9 e 10.

Os dados obtidos mostraram que o adjuvante Saponina foi capaz de induzir a produção de citocinas em níveis mais sutis quando comparado aos outros adjuvantes. Os principais resultados nesse grupo foram aumento dos níveis de IL-2, IL-6 e IL-4, o que sugere um padrão misto de produção de citocinas. Em relação ao AIF, observou-se que esse adjuvante induziu inicialmente produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) e apenas nos tempos tardios citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ). Contudo, vale ressaltar que a citocina IL-17 teve sua maior produção no mesmo intervalo de tempo das anti-inflamatórias. O adjuvante MPL foi capaz de produzir citocinas pró-inflamatórias em maiores níveis quando comparado aos demais grupos, mostrando aumento significativo de TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-17 em diferentes tempos. A IL-10 foi a única citocina anti-inflamatória aumentada nesse grupo, apresentando um pico de produção em 96 horas (Figura 9).

Na Figura 10 estão representados os gráficos com as análises comparativas entre os grupos experimentais nos tempos de 12, 48 e 168 h a fim de mostrar mais detalhadamente alterações na produção de citocinas após a sensibilização com diferentes adjuvantes vacinais.

Quanto à produção de IL-6, observou-se o pico de produção desta citocina em 12 horas com aumento nos grupos SAP, AIF e MPL em comparação ao controle. Em 48 h, este aumento significativo foi observado apenas no grupo MPL em relação aos grupos controle, SAP e AIF, enquanto que em 168 h esse aumento de IL-6 ocorreu tanto no grupo AIF quanto em MPL em relação ao controle.

Os dados mostraram em relação a IL-2 em 12 h, aumento dos níveis dessa citocina nos grupos SAP e MPL quando comparado aos grupos controle e AIF. Em 48h,



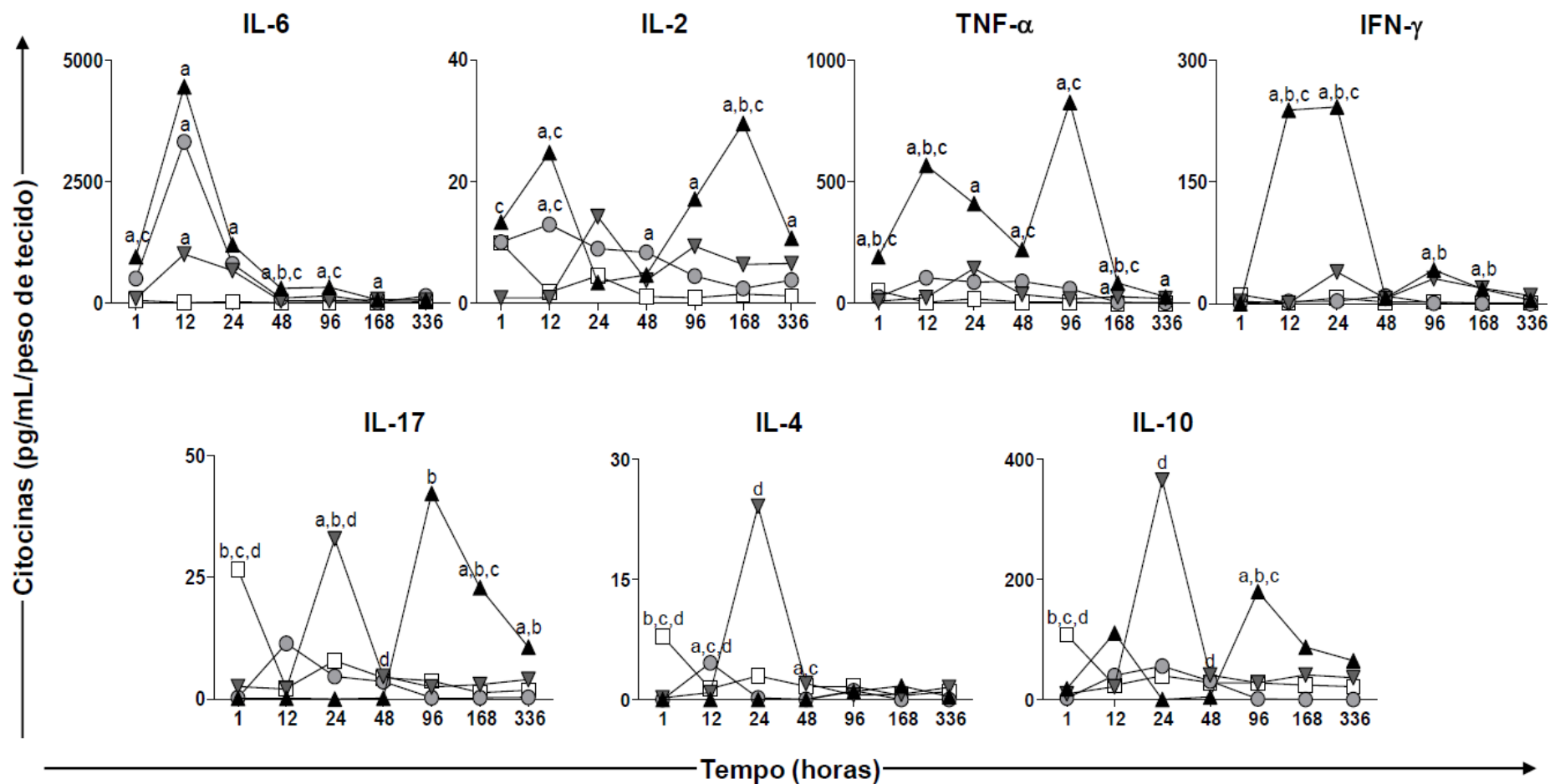
houve aumento da produção no grupo SAP em relação ao controle. Já em 168 h esse aumento foi observado no grupo MPL quando comparado aos demais.

Em relação à produção de TNF- $\alpha$ , em 12 e 168 h, os níveis desta citocina mostraram-se aumentados no grupo MPL em comparação aos demais grupos. Já no tempo de 48 horas esse aumento tornou-se evidente apenas em relação aos grupos controle e AIF. Entretanto, o aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  só foi observado mais tardiamente, em 168 h no grupo AIF em comparação ao controle.

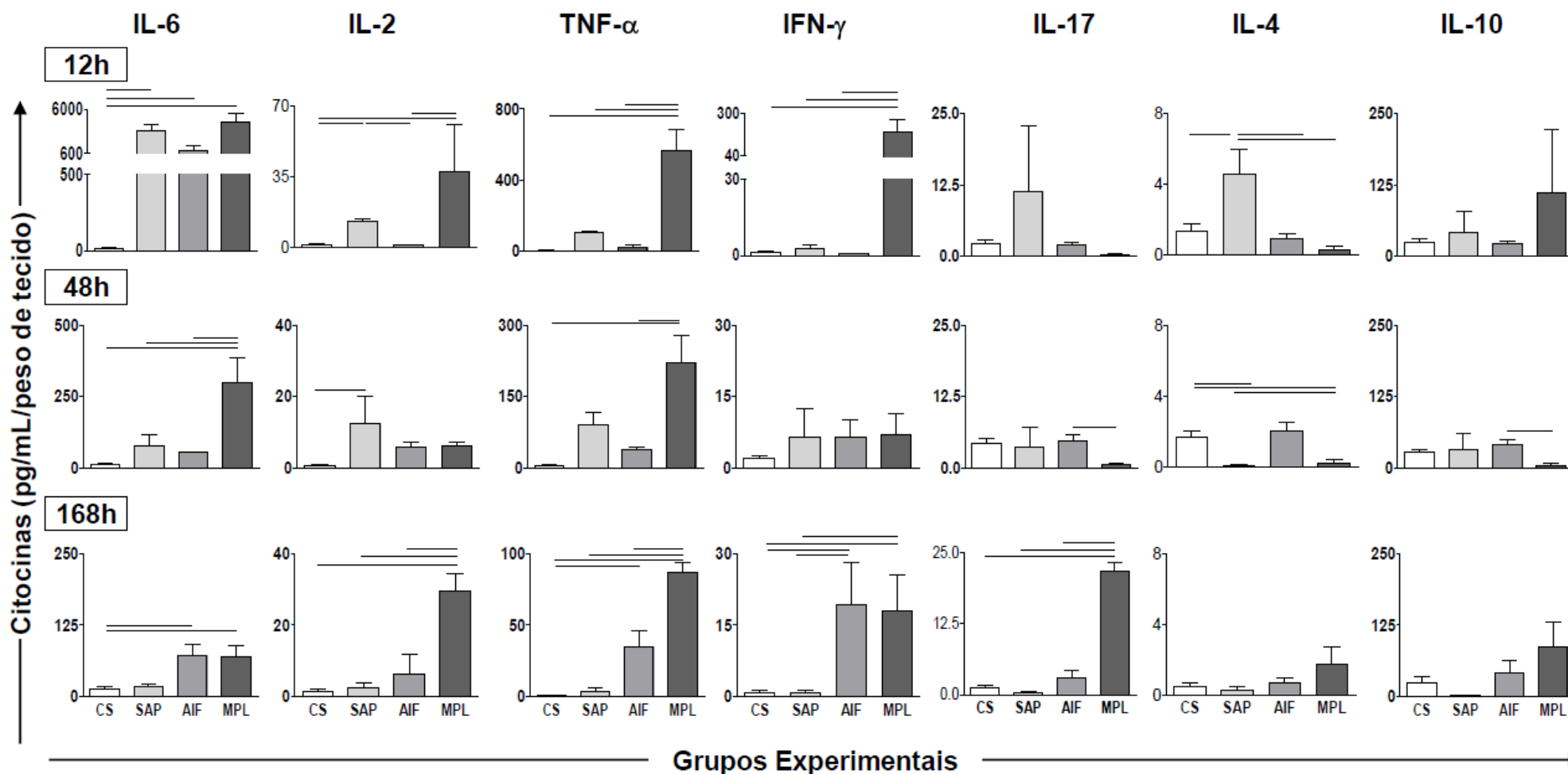
A análise de IFN- $\gamma$  mostrou em 12 h, níveis mais elevados desta citocina no grupo MPL em relação aos grupos controle, SAP e AIF. Em 168 h, foram observados aumentos nos níveis de IFN- $\gamma$  nos grupos AIF e MPL em comparação aos grupos controle e SAP.

Quanto a produção de IL-17, em 48 h, notou-se aumento nos níveis de IL-17 no grupo AIF em comparação ao grupo MPL. Em 168 h, aumento significativo foi observado no grupo MPL em relação aos grupos controle, SAP e AIF.

Em relação às citocinas anti-inflamatórias, em 12 h, foi observado aumento dos níveis de IL-4 no grupo SAP em relação aos grupos controle, AIF e MPL. Em 48 h, redução desta citocina foi observada em SAP e MPL em comparação aos grupos controle e AIF. Houve diminuição de IL-10 no grupo MPL quando comparado ao grupo AIF, em 48 h (Figura 10).



**Figura 9:** Cinética de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 e IL-10) no sobrenadante de macerado de pele de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais: Saponina (SAP;  $\circ$ ), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;  $\nabla$ ) e Monofosforil Lipídio A (MPL;  $\blacktriangle$ ) nos tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 horas após a sensibilização. O grupo controle (C;  $\square$ ) foi inoculado com salina. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos são representadas pelas letras "a", "b", "c" e "d", referentes aos grupos CS, SAP, AIF e MPL, respectivamente.

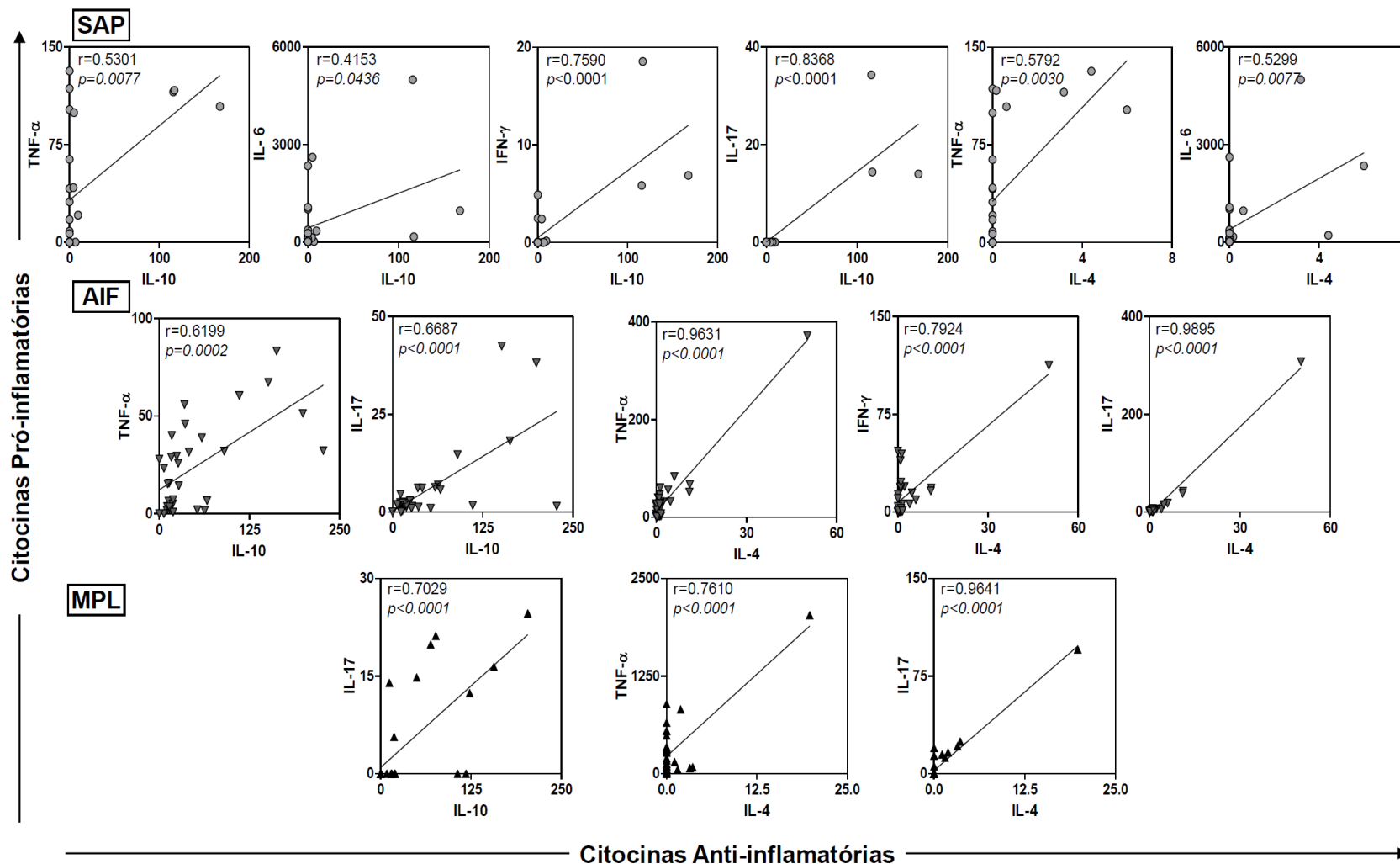


**Figura 10:** Análise detalhada da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-4 e IL-10) no sobrenadante de macerado de pele de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais: Saponina (SAP; □), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF; ■) e Monofosforil Lipídio A (MPL; ■) nos tempos de 12, 48 e 168 horas após a sensibilização. O grupo controle (C; □) foi inoculado com salina. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estão indicadas através das linhas conectoras.

#### 6.4 - Correlação entre os perfis de citocinas pró e anti-inflamatórias induzidas por diferentes adjuvantes vacinais

A presença de citocinas pró e anti-inflamatórias é necessária para o equilíbrio da resposta imune e desenvolvimento de vacinas mais seguras e eficientes. A fim de verificar possíveis associações entre distintos perfis de citocinas, análises de correlação foram realizadas e estão apresentadas na Figura 11.

No grupo sensibilizado com o adjuvante Saponina, pode-se observar correlações positivas entre a citocina IL-10 e outras, tais como: TNF- $\alpha$  ( $r=0,5301$ ,  $p=0,0077$ ), IL-6 ( $r=0,4153$ ,  $p=0,0436$ ), IFN- $\gamma$  ( $r=0,7590$ ,  $p<0,0001$ ) e IL-17 ( $r=0,8368$ ,  $p<0,0001$ ). Houve também correlações positivas entre IL-4 e TNF- $\alpha$  ( $r=0,5792$ ,  $p=0,0030$ ), e entre IL-4 e IL-6 ( $r=0,5299$ ,  $p=0,0077$ ). Em relação ao grupo sensibilizado com o adjuvante AIF, verificou-se correlações positivas entre IL-10 e as citocinas TNF- $\alpha$  ( $r=0,6199$ ,  $p=0,0002$ ) e IL-17 ( $r=0,6687$ ,  $p<0,0001$ ). Entre IL-4 e TNF- $\alpha$  ( $r=0,9631$ ,  $p<0,0001$ ), IFN- $\gamma$  ( $r=0,7924$ ,  $p<0,0001$ ) e IL-17 ( $r=0,9895$ ,  $p<0,0001$ ). No grupo MPL, as principais correlações foram observadas entre IL-10 e IL-17 ( $r=0,7029$ ,  $p<0,0001$ ) e entre IL-4 e as seguintes citocinas: TNF- $\alpha$  ( $r=0,7610$ ,  $p<0,0001$ ) e IL-17 ( $r=0,9641$ ,  $p<0,0001$ ).



**Figura 11:** Correlação entre citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17) e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) nos diferentes grupos de adjuvantes vacinais: Saponina (SAP;  $\circ$ ), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;  $\nabla$ ) e Monofosforil Lipídio A (MPL;  $\blacktriangle$ ) durante a cinética. Os resultados foram significantes quando  $p<0,05$ . Correlações entre perfis de citocinas pró e anti-inflamatórias nos grupos SAP, AIF e MPL foram realizadas através do coeficiente de Pearson (r).

### **6.5 - Análise dos principais tipos celulares no sangue periférico de camundongos após a sensibilização com diferentes adjuvantes vacinais**

Após a avaliação da resposta imune local, decidiu-se avaliar a resposta sistêmica através da análise de leucócitos totais e dos valores absolutos de neutrófilos, monócitos e linfócitos, obtidos pelo leucograma realizado durante os tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h após a sensibilização com os diferentes adjuvantes vacinais (Tabela 2).

Os resultados mostraram que não houve alterações induzidas por adjuvantes vacinais em relação ao número de células vermelhas do sangue (dados não mostrados). Quanto à série branca, os resultados mostraram que, inicialmente, houve redução significativa no número de leucócitos totais nos grupos SAP e MPL, no entanto, estes valores tornaram-se aumentados após as 24 horas e foram mantidos durante os tempos de 48, 96 e 336 h no grupo SAP. No grupo AIF, os valores mostraram-se aumentados a partir de 96 h até 336 h.


Em relação às diferenças observadas nas populações de células do sangue, verificou-se que a população de neutrófilos foi maior no grupo SAP durante os tempos dos 12, 24 e 48 após a sensibilização. No grupo AIF, houve aumento de neutrófilos durante os tempos de 168 e 336 h. No grupo MPL foi observado aumento de neutrófilos em 12 h apenas.

Também foram observadas alterações na população de linfócitos com redução inicial nos grupos SAP e MPL. No grupo SAP estes valores tornaram-se aumentados em 96 e 336 h. No grupo AIF, também foi observada redução em 12 h e aumento em 96, 168 e 336 h. A análise dos monócitos mostrou alterações em alguns pontos avaliados. No grupo SAP, aumento de monócitos foi observado em 48 e 336 h enquanto no grupo AIF houve aumento em 168 e 336 h.

**Tabela 2:** Leucócitos Totais e valores absolutos de neutrófilos, monócitos e linfócitos/mm<sup>3</sup>

Adjuvantes		Contagem de leucócitos no sangue - (mm <sup>3</sup> )						
		Tempos (h)						
		1	12	24	48	96	168	336
<b>CS</b>	Leucócitos Totais	6900±244,9	5520±2008	6900±3037	6660±1662	6720±985,9	3300±924,7	4080±1134
	Neutrófilos	1022±286,5	696,8±352,3	837,0±194,3	396,0±218,3	776,4±211,8	391,2±107,9	816,6±353,3
	Monócitos	69,0±2,4	55,2±20,1	105,0±79,6	79,8±33,6	92,4±33,8	38,2±7,5	58,2±32,9
	Linfócitos	5810±230,2	4590±1746	5958±2867	6184±1488	5851±805,5	2852±918,7	3196±831,1
<b>SAP</b>	Leucócitos Totais	3300±793,7 <sup>a,c</sup>	6000±1897	10350±900 <sup>c,d</sup>	9000±2728 <sup>d</sup>	9525±5588 <sup>d</sup>	9075±2765	9750±3969 <sup>a</sup>
	Neutrófilos	757,5±430,3	3714±1368 <sup>a,c</sup>	3740±1679 <sup>a,c,d</sup>	3018±2044 <sup>a,c,d</sup>	1750±1358	1331±557,2	1661±1378
	Monócitos	39,7±14,9 <sup>a,c,d</sup>	70,5±17,2	103,5±9,0	178,5±48,6 <sup>d</sup>	116,3±65,2	111,0±43,3	145,0±31,2 <sup>a</sup>
	Linfócitos	2068±721,5	2216±638,2	6507±1090	5804±1983	7703±4269 <sup>d</sup>	7603±2439	7898±3749 <sup>a</sup>
<b>AIF</b>	Leucócitos Totais	6420±962,8	3300±2001	5940±712,5	6360±1635	8160±1332 <sup>d</sup>	11100±2741 <sup>a</sup>	9840±1297 <sup>a</sup>
	Neutrófilos	690,0±323,9	1144±696,9	732,0±324,5	827,4±341,3	563,4±86,70	1413±388,5 <sup>a</sup>	1093±330,4
	Monócitos	93,0±69,2	43,5±14,8	103,2±27,9	114,0±76,5	117,0±56,1	135,6±67,2 <sup>a</sup>	147,0±43,4 <sup>a,d</sup>
	Linfócitos	5637±666,4	2011±1578 <sup>a</sup>	5093±1439	5419±1506	7480±1357 <sup>d</sup>	9551±2792 <sup>a</sup>	8612±1282 <sup>a</sup>
<b>MPL</b>	Leucócitos Totais	4800±1358 <sup>a</sup>	5460±1090	6180±1301	4300±458,3	2650±1854,4	7150±5123	6900±3050
	Neutrófilos	1384±795,4	2428±518,4 <sup>a</sup>	1391±331,7	699,0±366,8	760,5±228,3	987,0±770,5	1179±664,8
	Monócitos	88,8±51,5 <sup>a,c</sup>	73,8±22,5	105,8±97,6	72,0±42,2 <sup>a</sup>	65,0±19,4	83,0±48,7	75,7±18,8
	Linfócitos	3317±573,8	2958±717,3	4704±1319	3009±891,9	1811±907,4	6080±4394	5623±2603

Valores absolutos (média ± desvio padrão) do leucograma de camundongos inoculados com salina (CS) ou sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais: Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lipídio A (MPL). As letras “a”, “b”, “c” e “d” indicam diferenças significativas (p<0,05) em relação aos grupos CS, SAP, AIF e MPL, respectivamente.



Leucócitos Totais	1h	12h	24h	48h	96h	168h	336h
SAP	↓	-	↑	↑	↑	-	↑
AIF	-	-	-	-	↑	↑	↑
MPL	↓	-	-	-	-	-	-

Diferencial de leucócitos	1h	12h	24h	48h	96h	168h	336h
SAP	↓ Linf.	↑ Neutróf.	↑ Neutróf.	↑ Neutróf. Monóc.	↑ Linf.	-	↑ Monóc. Linf.
AIF	-	↓ Linf.	-	-	↑ Linf.	↑ Neutróf., Monóc., Linf.	↑ Monóc. Linf.
MPL	↓ Linf.	↑ Neutróf.	-	↓ Linf.	↓ Linf.	-	-

**Figura 12:** Esquema dos resultados obtidos da contagem global e diferencial do sangue de camundongos sensibilizados com diferentes adjuvantes vacinais: Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lipídio A (MPL).



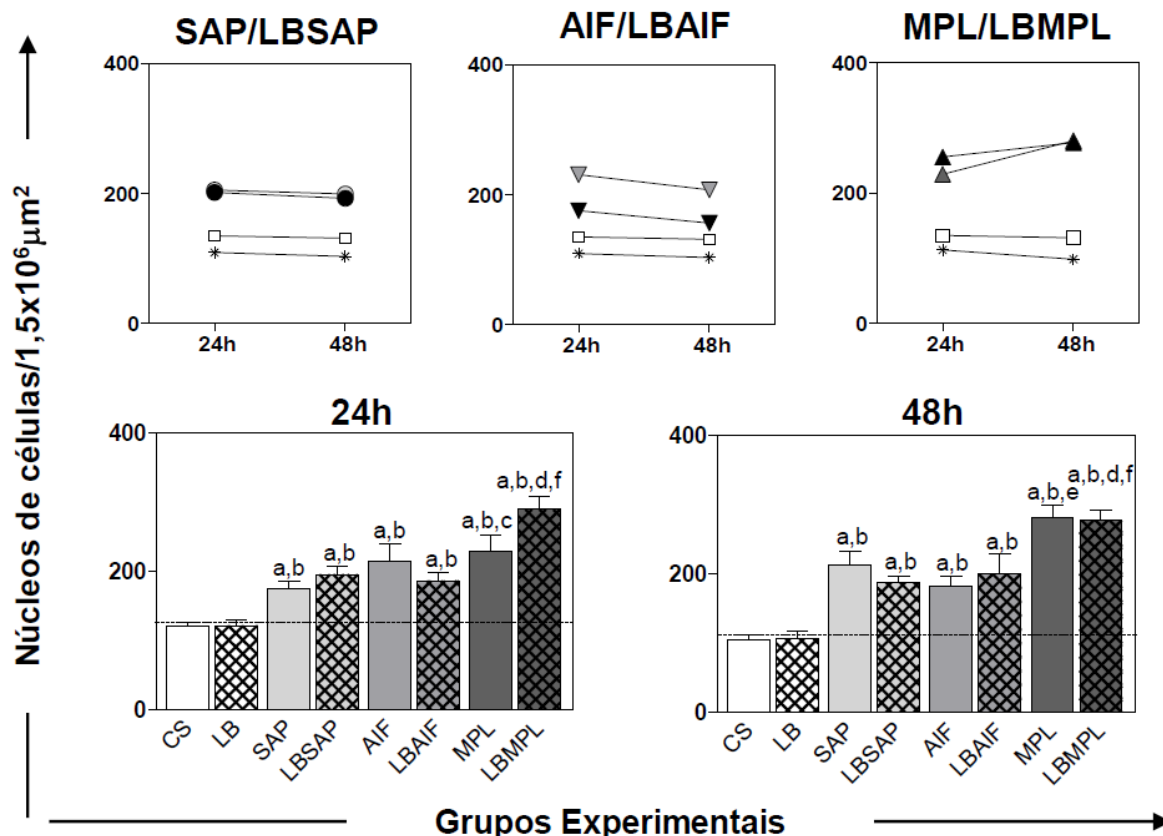
## **Etapa 2: Resposta específica frente a diferentes composições vacinais constituídas por adjuvantes associados ao antígeno de *L. (V.) braziliensis***

Os resultados apresentados nessa etapa foram realizados nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização e representam tempo recente e início do tempo tardio da cinética na etapa 1. Após esses tempos, amostras de pele foram avaliadas por histologia e culturas de células de linfonodo foram estimuladas no contexto *in vitro* com antígeno solúvel de *L. (L.) infantum* e avaliadas após 72 horas. As análises comparativas foram realizadas entre os grupos CS e LB em relação aos adjuvantes (SAP, AIF e MPL) ou apenas em relação à composição vacinal (LBSAP, LBAIF e LBMPL). Em adição, foram realizadas comparações entre o adjuvante e a associação com o antígeno total de *L. (V.) braziliensis* correspondente (SAP/LBSAP, AIF/LBAIF e MPL/LBMPL).

### **6.6 - Quantificação do infiltrado celular na pele de camundongos**

A quantificação do infiltrado celular está apresentada na figura 12. Os dados obtidos dessa análise demonstraram em 24 h aumento significativo no número de células na pele dos animais dos grupos SAP, LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL quando comparados aos grupos CS e LB. A análise comparativa mostrou que entre os adjuvantes, o grupo MPL apresentou maior infiltrado celular quando comparado ao grupo SAP. Em relação às composições vacinais, o grupo LBMPL induziu maior recrutamento celular quando comparado a LBSAP e LBAIF. Não foram observadas diferenças entre o adjuvante e a sua respectiva associação como mostrados nos gráficos em linha.

No tempo de 48 h, os aumentos significativos nos grupos SAP, LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL quando comparado aos grupos CS e LB foram mantidos. A análise comparativa, novamente, mostrou que os grupos MPL e LBMPL mostraram maior intensidade do infiltrado celular quando comparado ao grupo AIF, e quando comparados aos grupos LBSAP e LBAIF, respectivamente. Nesse tempo, também não foram observadas diferenças entre o adjuvante e a sua respectiva associação. Também não foram observadas diferenças significativas dentro do mesmo grupo em relação ao tempo.



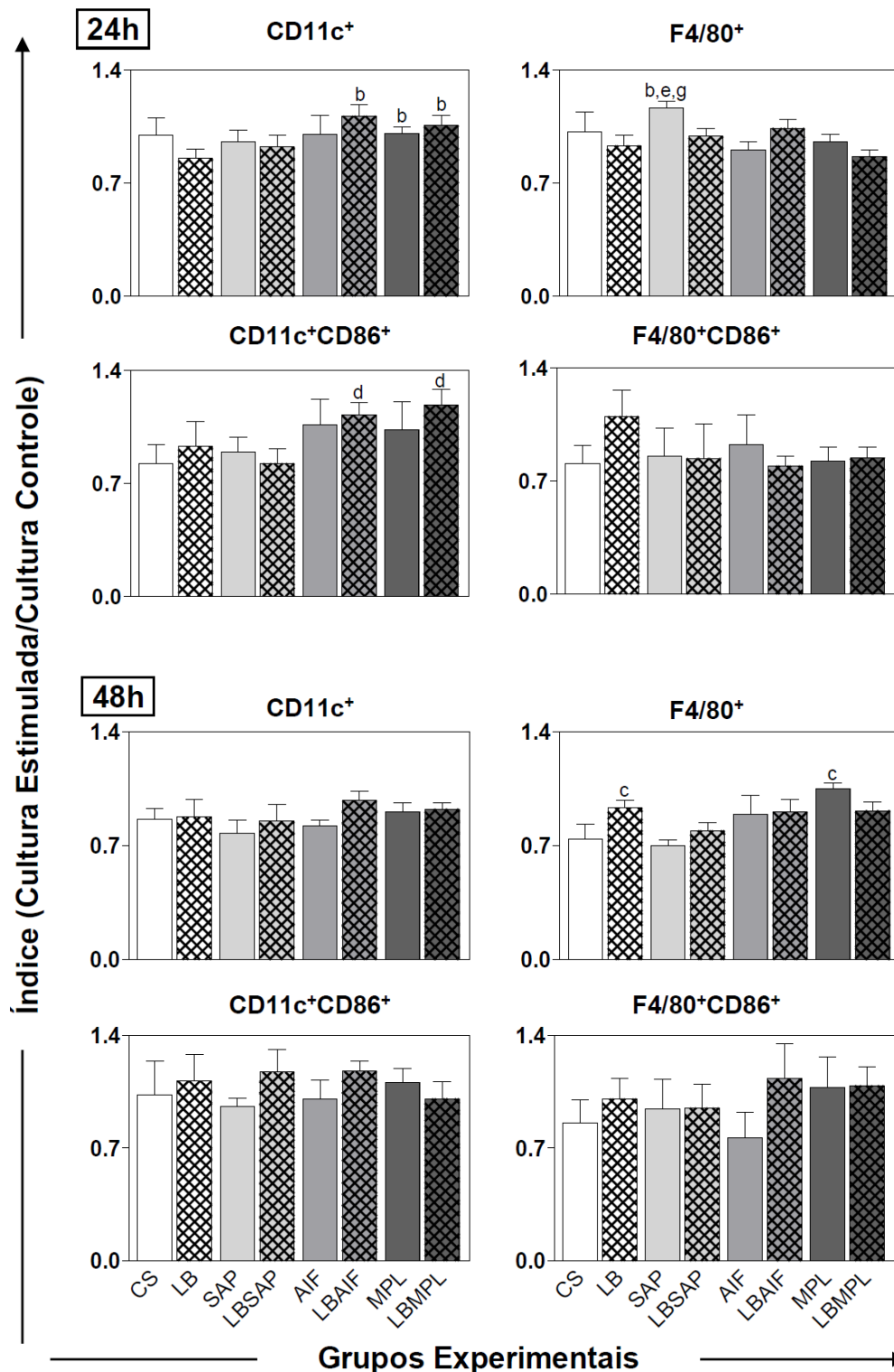
**Figura 13:** Quantificação do infiltrado celular na pele de camundongos sensibilizados com diferentes componentes vacinais: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;▣), Saponina (SAP;□), LB + SAP (LBSAP;▣), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;▣), LB + AIF (LBAIF;▣), Monofosforil Lipídio A (MPL;▣) e LB + MPL (LBMPL;▣) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;□) foi inoculado com salina. Os gráficos em linha representam a cinética do infiltrado em 24 e 48 horas nos grupos CS (□), LB (—\*), SAP (—○), LBSAP (—●), AIF (—▽), LBAIF (—▼), MPL (—▲) e LBMPL (—▲). Os resultados estão expressos como média±desvio-padrão. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos da pele de animais controle. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos são representadas pelas letras "a", "b", "c", "d", "e", "f", referentes aos grupos CS, LB, SAP, LBSAP, AIF e LBAIF, respectivamente.

### 6.7 - Análise do marcador de ativação CD86 em células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) dos linfonodos drenantes

A fenotipagem das células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) nos linfonodos drenantes nos tempos de 24 e 48 h após a sensibilização foi realizada com o objetivo de investigar o efeito da sensibilização intradérmica com diferentes composições vacinais sobre a resposta imune no contexto *in vitro*. Deste modo, avaliou-se o percentual médio de células ativadas presentes na cultura de linfonodo através das análises dos fenótipos CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> e F4/80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>. Os dados estão apresentados na Figura 13 na forma de um fator denominado índice, que corresponde à razão dos valores das análises das Culturas Estimuladas/Culturas Controle.

Os resultados mostraram aumento das células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) nos grupos LBAIF, MPL e LBMPL quando comparado ao grupo LB em 24 h. Quando avaliada a ativação dessas células, observou-se aumento nos índices na análise de CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> nos grupos LBAIF e LBMPL em relação grupo LBSAP. Em relação aos macrófagos (F4/80<sup>+</sup>), houve aumento dessas células no grupo SAP quando comparado aos grupos LB, AIF e MPL. Todavia, não foram observadas diferenças quando avaliado o marcador de ativação CD86.

Em 48 h, não foram observadas diferenças significativas quando avaliados os índices de células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>. A análise de macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) demonstrou aumento dessa célula nos grupos LB e MPL em relação ao grupo SAP. Não foram observadas diferenças quando o fenótipo F4/80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> foi avaliado.



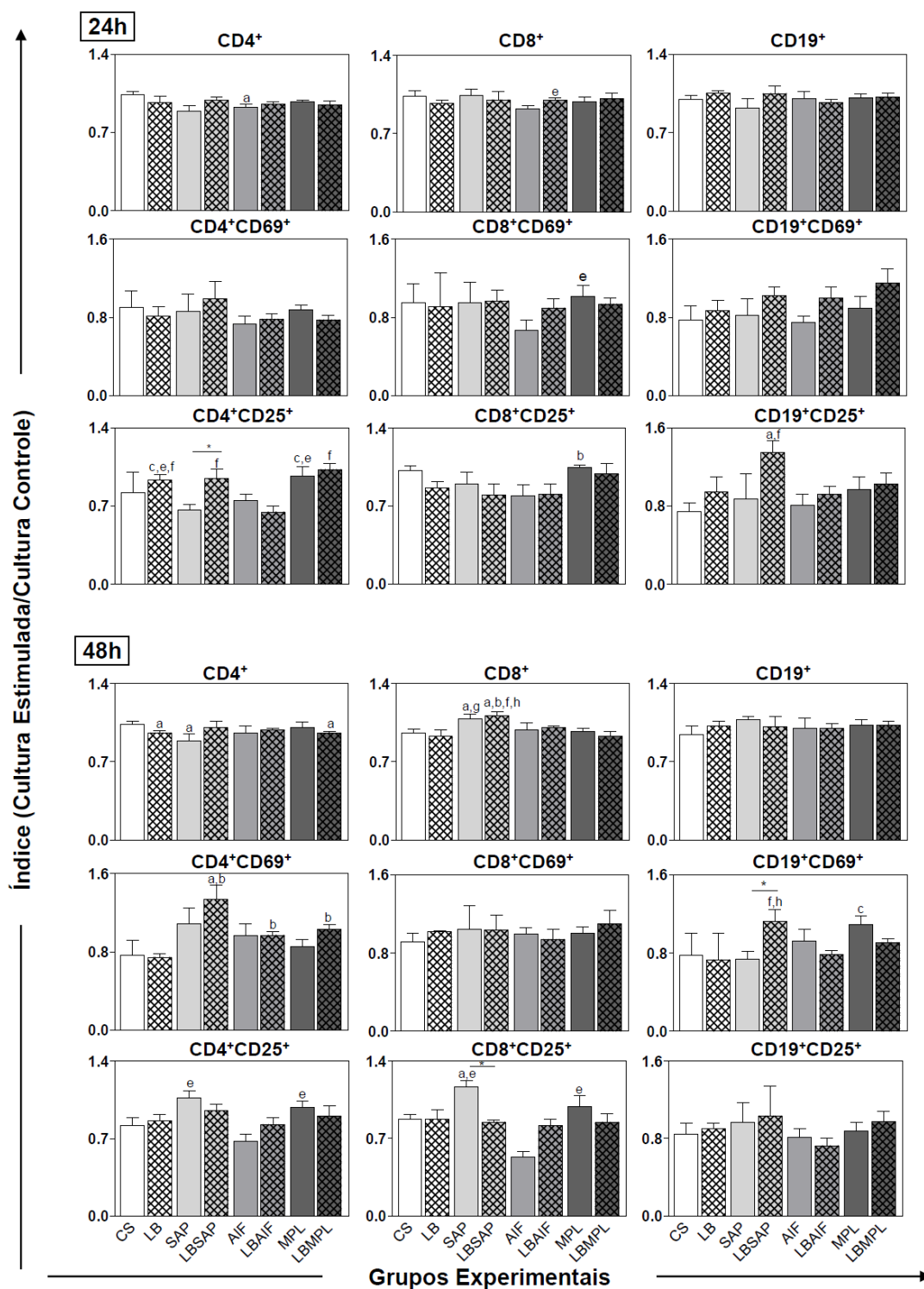
**Figura 14:** Análise da expressão do marcador de ativação CD86 em células dendríticas (CD11c<sup>+</sup>) e macrófagos (F4/80<sup>+</sup>) nos grupos sensibilizados com: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB; ▨), Saponina (SAP; □), LB + SAP (LBSAP; ▩), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF; ▤), LB + AIF (LBAIF; ▥), Monofosforil Lipídio A (MPL; ▦) e LB + MPL (LBMPL; ▧) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS; □) foi inoculado com salina. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos são representadas pelas letras "a", "b", "c", "d", "e", "f", "g" e "h" referentes aos grupos CS, LB, SAP, LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL, respectivamente.

### **6.8 - Análise de marcadores de ativação celular recente (CD69) e intermediária (CD25) nas subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>) e em linfócitos B (CD19<sup>+</sup>) nos linfonodos drenantes**

Após analisada a presença de células apresentadoras de antígeno no linfonodo, novas análises foram realizadas a fim de verificar a capacidade de adjuvantes e/ou composições vacinais ativarem especificamente linfócitos T e B. Esses resultados estão apresentados na Figura 14.

Em 24 h, a análise dos resultados mostrou redução de CD4<sup>+</sup> no grupo AIF em relação ao grupo controle, e aumento nos índices de CD8<sup>+</sup> no grupo LBAIF quando comparado ao grupo AIF. A análise da expressão de moléculas de ativação recente (CD69) por índice mostrou aumento da expressão de linfócitos T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> no grupo MPL em relação ao grupo AIF. Em relação a CD25, houve aumento nos fenótipos de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no grupo LB quando comparado aos grupos SAP, AIF e LBAIF. No grupo MPL, observou-se aumento em relação aos grupos SAP e AIF. Esse aumento também foi observado em LBSAP e LBMPL quando comparado ao grupo LBAIF. Houve aumento nos índices de CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no grupo MPL em relação ao grupo LB. A análise de linfócitos B CD19<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> mostrou aumento no grupo LBSAP em relação aos grupos controle e LBAIF.

Em 48 h, a análise dos resultados demonstrou redução nos índices de CD4<sup>+</sup> nos grupos LB, SAP e LBMPL em relação ao grupo controle. Em relação à análise por índice da população de CD8<sup>+</sup>, pode-se observar aumento no grupo SAP em relação aos grupos controle e MPL. Adicionalmente, no grupo LBSAP houve aumento quando comparado aos grupos controle, LB, LBAIF e LBMPL. A análise de marcadores de ativação recente mostrou aumento na expressão do fenótipo de CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> nos grupos LBSAP em relação aos grupos controle e LB, ainda foram observados aumentos nos grupos LBAIF e LBMPL em relação ao grupo LB. Em relação aos índices de CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> foi observado aumento no grupo LBSAP em relação aos grupos SAP, LBAIF e LBMPL. No grupo MPL foi verificado aumento em relação ao grupo SAP. A análise de marcadores de ativação intermediária mostrou aumento dos fenótipos de CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> nos grupos SAP e MPL em relação ao grupo AIF. Houve aumento nos índices do fenótipo CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no grupo SAP quando comparado aos grupos controle, LBSAP e AIF. Houve aumento desse fenótipo no grupo MPL em relação ao grupo AIF.



**Figura 15:** Análise da expressão de marcadores de ativação de CD69 e CD25 em subpopulações de linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ) e linfócitos B ( $CD19^+$ ) nos linfonodos drenantes de animais sensibilizados com: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB; ▨), Saponina (SAP; □), LB + SAP (LBSAP; ▩), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF; ■), LB + AIF (LBAIF; ▤), Monofosforil Lipídio A (MPL; ▥) e LB + MPL (LBMPL; ▦) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS; □) foi inoculado com salina. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos são representadas pelas letras "a", "b", "c", "d", "e", "f", "g" e "h", referentes aos grupos CS, LB, SAP, LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL, respectivamente. Diferenças entre o adjuvante e a respectiva associação vacinal estão representadas pela linha conectora e asterisco.

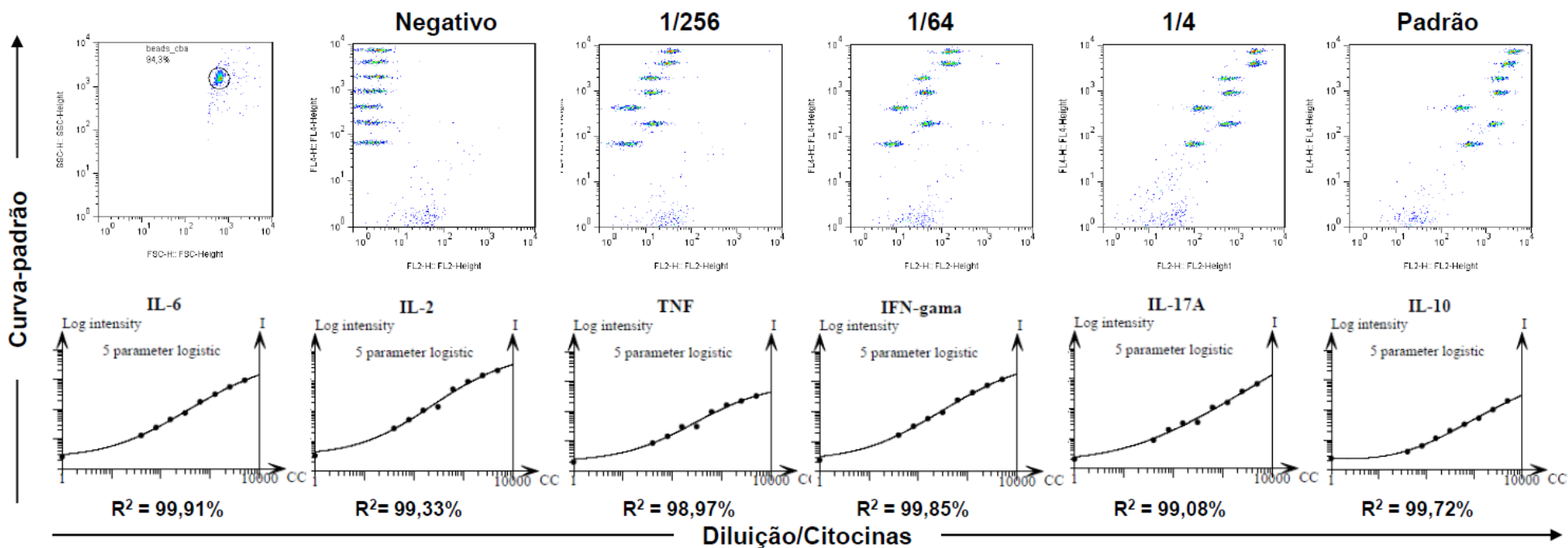
## 6.9 - Perfil de citocinas produzidas nos linfonodos drenantes

O padrão de citocinas produzidas por células da imunidade inata e adaptativa foi analisado através da quantificação por citometria de fluxo, utilizando o *Kit* CBA. Os resultados de alguns pontos analisados estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

Na figura 15 estão representadas as diluições da curva-padrão com concentrações conhecidas de cada citocina (apenas alguns pontos foram mostrados). A análise da curva-padrão de cada citocina foi realizada através do 5º parâmetro logístico e os valores de  $R^2$  mostram a acurácia da reação, demonstrando a confiabilidade de todos os resultados obtidos.

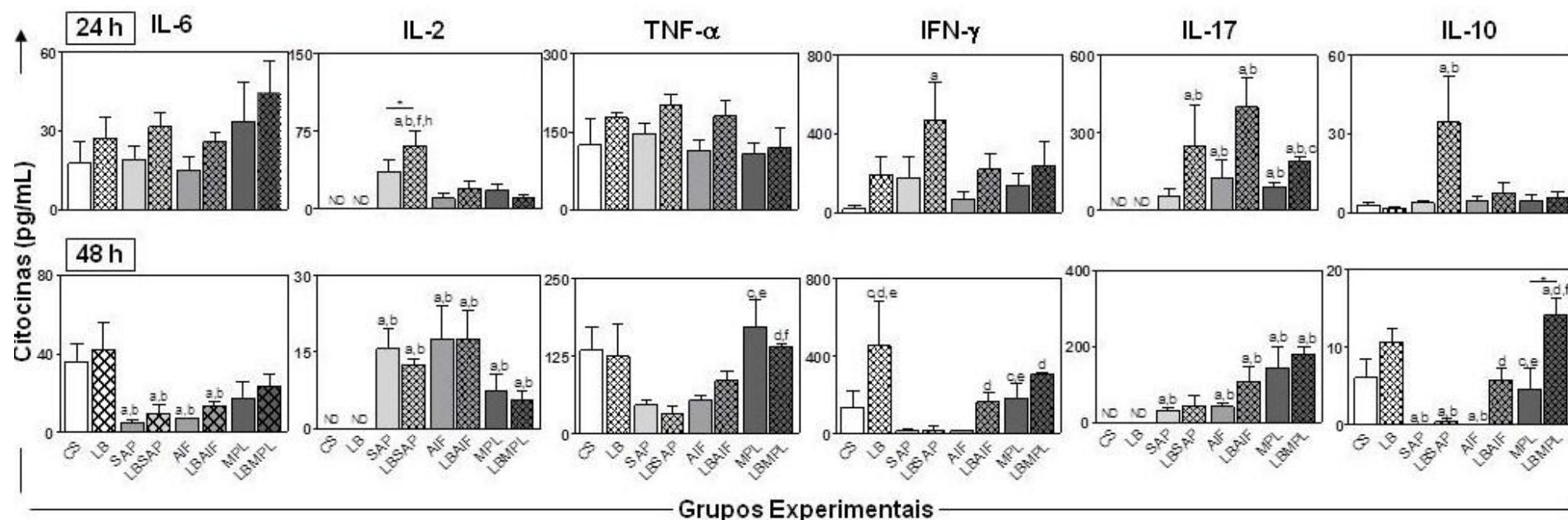
A quantificação da produção de citocinas por células de cultura de linfonodo mostrou em 24 h que os animais do grupo LBSAP produziram maiores níveis de IL-2 em relação aqueles dos demais grupos; IFN- $\gamma$  apenas em relação ao controle; IL-17 em relação aos grupos controle e LB e, IL-10 em relação aos grupos controle e LB. Os grupos AIF, LBAIF, MPL e LBMPL promoveram aumento significativo de IL-17 apenas quando comparado aos grupos controle e LB (Figura 16).

Em 48 h, observou-se redução nos níveis da citocina IL-6 nos grupos SAP, LBSAP, AIF e LBAIF quando comparado principalmente aos grupos controle e LB. Para a citocina IL-2 observou-se aumento nos grupos SAP, LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL quando comparados aos grupos controle e LB. Em relação à TNF- $\alpha$ , houve maiores níveis dessa citocina nos grupos MPL quando comparados aos grupos SAP e AIF, no grupo LBMPL houve aumento em relação aos grupos LBSAP e LBAIF. A análise de IFN- $\gamma$  demonstrou aumento nos níveis dessa citocina no grupo LB em relação aos grupos SAP, LBSAP e AIF. No grupo MPL foi verificado aumento em relação SAP e AIF e, nos grupos LBAIF e LBMPL foi verificado aumento em relação ao grupo LBSAP. Sobre IL-17 foi detectado aumento desta citocina nos grupos SAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL em relação aos grupos controle e LB. A análise de IL-10 mostrou redução desta citocina nos grupos SAP, LBSAP e AIF em relação aos grupos controle e LB. Essa redução foi verificada ainda nos grupos SAP e AIF em relação ao grupo controle; no grupo LBSAP observou-se redução em relação ao grupo LBAIF. No entanto foi observado aumento significativo no grupo LBMPL em relação aos grupos controle, LBSAP, LBAIF e MPL (Figura 16).



**Figura 16:** Diluição da curva-padrão e valores de R<sup>2</sup> obtidos para cada citocina (IL-6, IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10). Os valores de R<sup>2</sup> foram obtidos através da análise dos dados utilizando o 5<sup>o</sup> parâmetro logístico no programa FCAP.





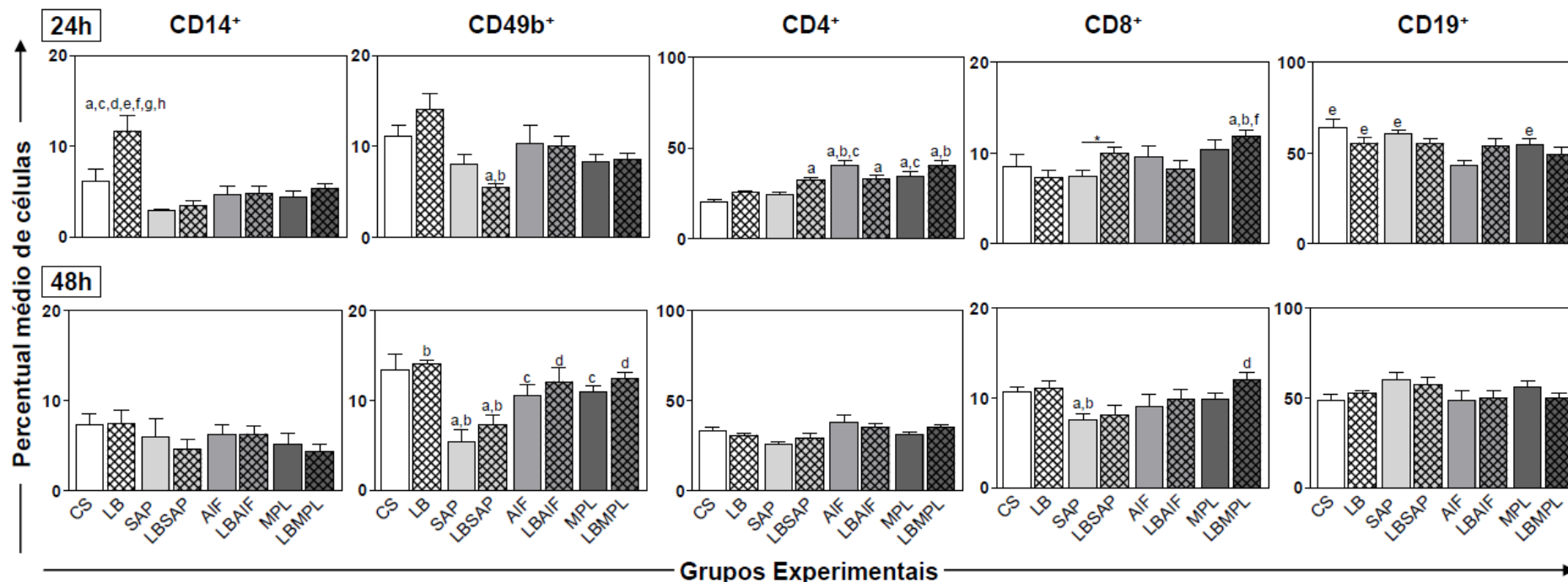
**Figura 17:** Perfil de citocinas produzidas nos linfonodos drenantes em animais sensibilizados com: antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;▨), Saponina (SAP;□), LB + SAP (LBSAP;▩), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;■), LB + AIF (LBAIF;▧), Monofosforil Lipídio A (MPL;■) e LB + MPL (LBMPL;▤) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;□) foi inoculado com salina. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos são representadas pelas letras "a", "b", "c", "d", "e", "f", "g" e "h", referentes aos grupos CS, LB, SAP, LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL, respectivamente. Diferenças entre o adjuvante e a respectiva associação vacinal estão representadas pela linha conectora e asterisco. ND: não detectado

### 6.10 - Análise do perfil fenotípico de leucócitos no sangue periférico

O perfil imunofenotípico de células mononucleares do sangue periférico foi avaliado por citometria de fluxo, visando analisar a resposta sistêmica. Esses dados são complementares à resposta imune aos estímulos iniciada no local do inóculo, e posteriormente, direcionada ao linfonodo drenante e, subsequentemente, ao sangue periférico. Os resultados estão apresentados na Figura 17 e expressos como percentual médio de células.

No sangue periférico, em 24 h houve aumento no percentual dos monócitos (CD14<sup>+</sup>) no grupo LB quando comparado aos demais. Foi observado redução no percentual das células NK (CD49b<sup>+</sup>) no grupo LBSAP quando comparado aos grupos controle e LB. Em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup> houve aumento no percentual dessa células nos grupos: LBSAP e AIF em relação ao controle; no grupo AIF em relação aos grupos LB e SAP; no grupo LBAIF em relação ao controle; no grupo MPL em relação aos grupos controle e SAP; e LBMPL quando comparado ao controle e LB. Em relação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> houve aumento no percentual no grupo LBMPL quando comparado aos grupos controle, LB e LBAIF. Houve aumento em LBSAP quando comparado ao grupo SAP. A análise de linfócitos B mostrou redução no percentual dessa célula no grupo AIF quando comparado aos grupos controle, LB, SAP e MPL.

Em 48 h, poucas alterações foram verificadas. Em relação às células NK (CD49b<sup>+</sup>) foi observada redução significativa no grupo SAP em relação aos grupos controle, LB, AIF e MPL; também foi observado redução no grupo LBSAP, quando comparado aos grupos controle, LB, LBAIF e LBMPL. Novamente, observou-se aumento no percentual dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no grupo LBMPL em relação ao grupo LBSAP. Houve redução desses linfócitos no grupo SAP em relação aos grupos controle e LB. Não foram observadas diferenças entre os grupos quando avaliadas as outras populações.



**Figura 18:** Perfil fenotípico de leucócitos no sangue periférico de animais sensibilizados por antígeno total de *L. (V.) braziliensis* (LB;▣), Saponina (SAP;▣), LB + SAP (LBSAP;▣), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF;▣), LB + AIF (LBAIF;▣), Monofosforil Lipídio A (MPL;▣) e LB + MPL (LBMPL;▣) nos tempos de 24 e 48 horas após a sensibilização. O grupo controle (CS;▣) foi inoculado com salina. Os resultados estão expressos em média±desvio-padrão. Diferenças significativas (p<0,05) entre os grupos são representadas pelas letras "a", "b", "c", "d", "e", "f", "g" e "h", referentes aos grupos CS, LB, SAP, LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL, respectivamente. Diferenças entre o adjuvante e a respectiva associação vacinal estão representadas pela linha conectora e asterisco.



Uma resposta imune precoce e efetiva a adjuvantes vacinais pode significativamente melhorar a imunogenicidade e eficácia das vacinas através da ativação do sistema imune inato e conseqüente, desenvolvimento da resposta imune adquirida e, preferencialmente, de longa duração (Singh, 2007; Coler *et al.*, 2011). Nesse sentido, adjuvantes vacinais são essenciais no aumento da imunogenicidade através de inflamação local, recrutamento e ativação de linfócitos não específicos e persistência do antígeno no local do inóculo (Singh & O'Hagan, 1999). Além disso, estas substâncias aditivas realizam importante papel no recrutamento de várias células do sistema imune, na taxa de captura de antígenos e na produção de citocinas inflamatórias (Medzhitov & Janeway, 1997; Kensil *et al.*, 2004). Tais aspectos constituem uma sinopse do que poderá acontecer logo após estes eventos iniciais que sem dúvida orquestram todo o processo de imunogenicidade pós vacinal. Ainda hoje, importantes questões sobre os mecanismos envolvidos no recrutamento celular não estão esclarecidas (O'Hagan & De Gregório, 2009; Gerdt, 2011). Pouco se sabe do local, onde essas substâncias atuam efetivamente, para o estabelecimento de uma adequada resposta imune, se na pele (local da imunização) ou nos linfonodos drenantes (Schijns, 2000), bem como, se são capazes de induzir uma resposta de repercussão sistêmica.

Um ponto crítico na indução da resposta imune é o local da imunização, pois esse, juntamente com a dose do antígeno e a escolha do adjuvante, poderão influenciar no tipo de resposta imune (O'Hagan, 2000). Desta forma, a imunização intradérmica foi selecionada devido à sua acessibilidade que torna a pele um atrativo órgão para “entrega” de vacinas (Becker, 1997; Firestein, 2004). Além disso, a pele representa um importante ambiente imunológico conhecido por SALT (*Skin associated lymphoid tissue* - Tecido linfóide associado à pele) composto principalmente por células de Langerhans e células apresentadoras de antígeno dérmicas, que circulam entre a pele e linfonodos; queratinócitos e células endoteliais, que produzem diferentes citocinas e; linfócitos, que extravasam da circulação para a pele (Dahl, 1996; Champion *et al.*, 1998; Debenedictis *et al.*, 2001).

O entendimento de como adjuvantes vacinais interagem com a resposta imune inata e adquirida irá contribuir na seleção de adjuvantes vacinais e no desenho de novas vacinas mais seguras e imunogênicas (Garçon & Leo, 2010). Neste contexto, este trabalho oferece dados relevantes sobre elementos da resposta imune inata e adquirida

através do estudo do microambiente celular e de mediadores inflamatórios induzidos pelos adjuvantes vacinais isoladamente: Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lipídio A (MPL) e do entendimento da resposta imune específica após a sensibilização com as diferentes composições vacinais, utilizando o antígeno total de *L. (V.) braziliensis* como antígeno vacinal.

Na primeira etapa deste trabalho, camundongos foram sensibilizados com uma única dose de adjuvante na região dorsal e posteriormente, avaliados durante uma cinética nos tempos de 1, 12, 24, 48, 96, 168 e 336 h. Os parâmetros avaliados foram reação inflamatória (migração e ativação de células inflamatórias para o local do inóculo) e de citocinas de perfil pró e anti-inflamatório. Além disso, avaliou-se a resposta sistêmica através da análise do leucograma durante toda a cinética experimental. Reações macroscópicas também foram analisadas e documentadas com objetivo de subsidiar informações a respeito da inocuidade/toxicidade e segurança dos adjuvantes empregados.

Nesse sentido, foi empregada a análise morfométrica objetivando a quantificação do infiltrado celular. Nossos resultados demonstraram que todos os três adjuvantes utilizados foram capazes de promover recrutamento de células para o local do inóculo. Essa capacidade de induzir inflamação local é uma importante característica compartilhada pela maioria dos adjuvantes conhecidos e está intimamente relacionada à imunogenicidade dessas substâncias (Schijns, 2000). No entanto, pode-se observar que cada adjuvante induziu esse processo inflamatório de modo particular e estas peculiaridades na gênese do foco inflamatório no local da imunização podem ser a chave para discriminar o grau de eficiência dos adjuvantes. Assim, nossos resultados evidenciaram que o adjuvante SAP promoveu aumento do infiltrado celular em 1 h, mostrando novos aumentos significativos a partir de 24 h até o final da cinética, sendo que o infiltrado celular na pele desses animais apresenta-se de forma difusa na camada adiposa da hipoderme. O adjuvante AIF também induziu aumento do infiltrado em 1 h, no entanto, observou-se novo aumento desse infiltrado mais tardiamente que a saponina, a partir de 48 h até o final da cinética. De modo similar, ao grupo SAP, o infiltrado celular desse grupo apresentou-se de forma difusa, no entanto, na camada muscular da hipoderme. O grupo MPL induziu aumento da migração celular para a pele a partir de 12 h até o último tempo, todavia, o infiltrado celular induzido por esse adjuvante mostrou-se focal na camada muscular da hipoderme. Estudos anteriores realizados por pesquisadores de nosso grupo de pesquisa, empregando a saponina como adjuvante

vacinal, demonstraram a capacidade deste adjuvante em formar infiltrado inflamatório do tipo difuso e com mínimas injúrias no local do inóculo (Vitoriano-Souza, 2008; Vitoriano-Souza *et al.*, 2008; Moreira, 2008; Moreira *et al.*, 2009). Por outro lado, as diferenças observadas no tempo de indução da inflamação e na distribuição do infiltrado celular podem estar relacionadas à heterogeneidade dessas substâncias quanto à composição estrutural e aos mecanismos de ação dos diferentes adjuvantes (Gupta *et al.*, 1995; Vogel, 1995). É importante mencionar que não foram observadas ulcerações nos animais sensibilizados (dados não mostrados). Esse resultado é muito importante, visto que a segurança é um fator primordial no licenciamento de adjuvantes em vacinas humanas e que novos adjuvantes devem ser imunogênicos, no entanto, com mínimas injúrias ao tecido saudável (Schijns, 2000; Garçon & Leo, 2010).

O estudo do perfil das células migratórias é muito importante, uma vez, que pode ser um indicador essencial do processo inflamatório local que está diretamente relacionado ao perfil das citocinas presentes nesse microambiente (Stewart *et al.*, 1984). Além disso, o número de células e a composição do infiltrado celular durante o estágio inicial depois do estímulo influenciarão no direcionamento das futuras respostas e o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida (Teixeira *et al.*, 2005). A migração diferencial após o início do processo inflamatório pode ocorrer através da ativação dos receptores de reconhecimento padrão que são expressos em diferentes formas e composições por uma variedade de células, incluindo linfócitos, granulócitos e células endoteliais (Muzio *et al.*, 2000; Faure *et al.*, 2001).

Nesse sentido, a capacidade desses adjuvantes promoverem recrutamento diferencial de células inflamatórias para o local do inóculo, bem como, a ativação celular foi aqui avaliada através da contagem diferencial das células da pele bem como, pelas dosagens da atividade das enzimas MPO e NAG. Em adição, os resultados mostraram migração diferencial de neutrófilos para o local do inóculo, sendo que a presença dessas células foi mais persistente nos animais sensibilizados com o adjuvante SAP durante a maior parte da cinética. Nos grupos AIF e MPL, a presença dessas células foi observada em maiores percentuais no intervalo de 1 a 48 h, todavia, observou-se recrutamento dessas células em pequenas proporções nos tempos mais tardios. A presença de neutrófilos poderia contribuir na formação do microambiente e polarização da resposta imune, visto que essas células assim como outros leucócitos (monócitos e linfócitos) também podem ser polarizadas em direção a distintos fenótipos da resposta imune (tipo 1 e 2) (Fridlender *et al.*, 2009).

De modo não esperado, a atividade da enzima MPO foi verificada apenas tardiamente no grupo MPL, sugerindo que apesar do grande influxo dessa população no grupo SAP, aparentemente, elas não estavam ativadas. Populações celulares de macrófagos e linfócitos também estavam presentes no local da inoculação. A atividade da enzima NAG mostrou a presença de macrófagos ativados na pele de animais sensibilizados com os adjuvantes SAP e AIF. Esses resultados permitem inferir que existe a participação de diferentes populações e subpopulações celulares no contexto da resposta imune local. Korsholm e colaboradores (2009) também enfatizaram que os adjuvantes vacinais podem afetar diferentes populações de células no local da imunização, conduzindo um rápido recrutamento seletivo de células.

Estudos realizados com diferentes adjuvantes vacinais têm mostrado resultados similares aos obtidos neste trabalho. Calabro e colaboradores (2011) em seu estudo com o adjuvante MF59 sugeriram que a ação deste adjuvante é baseada em um elemento central de recrutamento de células da imunidade inata para o local da imunização com sucessivas migrações de populações celulares. Estes autores mostraram que os neutrófilos são os primeiros e o mais abundante tipo celular a acumular-se no músculo, seguido por monócitos inflamatórios, eosinófilos e células dendríticas. Contudo, estes autores não relacionaram a adjuvanticidade do adjuvante MF59 exclusivamente aos neutrófilos, ao contrário, apontaram para o elevado grau de redundância do sistema imune inato ou, alternativamente, a outros tipos de células (Calabro *et al.*, 2011). Já Smith e colaboradores (1999) observaram inflamação local intensa, com o recrutamento precoce de neutrófilos e mastócitos, seguido por macrófagos, células dendríticas e linfócitos após a sensibilização com o adjuvante ISCOM. A resposta inflamatória induzida pela associação DDA (dimetildioctadecilamônio) e MPL também foi significativa com a presença de um exsudado inflamatório constituído por neutrófilos, monócitos/macrófagos e células NK ativadas (Korsholm *et al.*, 2009).

Neste contexto, neutrófilos são populações celulares muito importantes, uma vez que podem induzir, através da secreção de mediadores inflamatórios e quimiocinas, recrutamento seletivo de células imunes (van Gisbergen *et al.*, 2005). Evidências recentes têm sugerido que neutrófilos podem produzir moléculas anti-inflamatórias e fatores que promovem a resolução da inflamação (Mantovani *et al.*, 2011). Em adição, os neutrófilos podem desempenhar um papel importante como veículo para o transporte de antígenos para os linfonodos drenantes para posterior processamento e apresentação por células dendríticas (Bennouna *et al.*, 2003). A intercomunicação de neutrófilos e



células dendríticas imaturas poderia resultar na maturação das últimas, e assim na maior capacidade de apresentação de antígenos e proliferação das células T (Appelberg, 2007). No entanto, estudos realizados por Yang e colaboradores (2010) mostraram o papel negativo de neutrófilos na resposta adaptativa por linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B após a imunização com o antígeno HEL (lisozima de clara de ovo) e diferentes adjuvantes. Esse trabalho mostrou que neutrófilos migram rapidamente para os linfonodos drenantes vindos do local da imunização através de vasos linfáticos, e essas células podem competir com células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) na captura de antígenos. Portanto, um estudo ainda mais detalhado com foco nas populações de neutrófilos poderá auxiliar no melhor entendimento do papel destas células no direcionamento da resposta imune adaptativa.

Outro potencial alvo celular para ação de adjuvantes são os macrófagos que atuam como células de defesa do sistema imunitário. Eles estão localizados em distintos tecidos linfóides ao longo do corpo e respondem através de uma variedade de receptores, incluindo lipopolissacarídeo (LPS), manose e dinucleotídeos CpGs que são conservados em agentes patogênicos através da evolução (Medzhitov & Janeway, 1997). Eles secretam uma variedade de citocinas, incluindo as interleucinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  que mobilizam células da imunidade inata, e oferecem sinais para células T através de IL-10, IL-12 e IL-18 para iniciar a resposta imune específica contra patógenos intracelulares e extracelulares (Dahl, 1996). É interessante mencionar que a maioria dos leucócitos dérmicos são macrófagos, que extravasam através das paredes venulares e então se tornam diferenciados. Macrófagos promovem o *clearance* do microambiente dérmico ao longo da membrana basal e participam dos mecanismos efetores no local da lesão (Allgower *et al.*, 1995). Neste âmbito, nossos dados reforçam a relevância do estudo da resposta imune induzida por adjuvantes vacinais *in vivo*, onde diferentes tipos de células podem cooperar no estabelecimento de um microambiente integrado e imunocompetente (Mosca *et al.*, 2008).

Embora os adjuvantes SAP, AIF e MPL sejam capazes de direcionar a resposta imune, cada um deles possui um mecanismo que pode diferenciar na intensidade ou na duração da resposta imune. Deste modo, após avaliar a inflamação local e migração diferencial, decidiu-se também por investigar o perfil de citocinas na pele. Sabe-se que o meio de citocinas pode orientar uma resposta imune para a tolerância ou imunidade (Banchereau & Steinman, 1988). Citocinas pró-inflamatórias, secretadas por células

residentes e recrutadas, estimulam diretamente as células que, em seguida, apresentam antígenos no linfonodo drenante (Iwasaki & Medzhitov, 2004).

Em relação à produção de citocinas na pele, foi observado que o adjuvante saponina induziu a produção de IL-2 em 12 e 48 h e, a produção de IL-6 e IL-4 em 12 h após o inóculo, mostrando a formação de microambiente com perfil de resposta mista (Cox & Coulter, 1997). Kensil e colaboradores (1998) demonstraram no modelo murino, que a saponina é um adjuvante potente para a indução de resposta por linfócitos T citotóxicos e secreção de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) e anticorpos do isotipo IgG2a. Behboudi e colaboradores (1999) observaram a capacidade de várias saponinas *Quillaja* em formulações ISCOMATRIX em induzir citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\alpha$  e IL-6. O mecanismo de ação da saponina não está ainda completamente elucidado, mas as experiências *in vitro* sugerem que esse adjuvante pode melhorar a apresentação de antígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs) e, por conseguinte, otimizar a resposta no compartimento imune de células T-específicas. Além disso, a saponina tem sido utilizada para melhorar a resposta de células B, embora ainda não seja estabelecido se isto ocorre através de um efeito direto ou através de APCs e estimulação das células T (Fogg *et al.*, 2007). O mecanismo de ação direto da saponina QS-21 poderia ser de modo não específico através da permeabilização das membranas celulares constituídas por colesterol no processo de saponificação (Goldenthal *et al.*, 1985).

O adjuvante AIF também foi capaz de induzir a produção de citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos tempos finais da análise bem como elevar o perfil de citocinas Th17 (IL-6 e IL-17), mais tardiamente. Em tempos mais recentes (24 e 48 h), observou-se a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10). Esses resultados mostraram que esse adjuvante pode induzir a produção de citocinas com distintos perfis, contudo a demora na produção de citocinas pró-inflamatórias poderia sugerir o direcionamento para a resposta Th2, uma vez que essa resposta pode se desenvolver na ausência de mediadores da resposta Th1 (Jankovic *et al.*, 2001). A maior parte dos efeitos induzidos pelo AIF deve-se a sua constituição química, visto que a combinação de óleo de parafina e surfactante, os dois componentes de AIF, não são imunologicamente ou farmacologicamente inertes. Desse modo, esse adjuvante por si só exerce vários efeitos sobre o sistema imunológico, localmente e sistemicamente (Castro *et al.*, 1993). No entanto, há pouca informação disponível sobre a indução de citocinas pelo adjuvante

AIF isoladamente. Em ratos que receberam o adjuvante AIF, mRNA para o TNF- $\alpha$  foi induzido rapidamente, com expressão limitada de mRNA de IFN- $\gamma$  e nenhuma expressão de mRNA de IL-2. Notavelmente, quando a ovalbumina foi adicionada ao AIF, mRNA de IL-4 em vez de mRNA para TNF- $\alpha$  foi detectado, sugerindo um desvio para a capacidade de resposta Th2 (Mussener *et al.*, 1995).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que, entre os adjuvantes vacinais avaliados, o MPL foi capaz de induzir maiores níveis das citocinas Th1 (IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) em diferentes momentos da cinética em comparação ao controle e também em relação aos grupos SAP e AIF. Torna-se importante ressaltar que estas são as citocinas requeridas para uma resposta de memória de longa duração, quando produzidas concomitantemente por uma subpopulação de células T CD4<sup>+</sup>, conforme já foi observado em estudos anteriores com vacinas para leishmanioses. Tais citocinas quando produzidas por células multifuncionais T CD4<sup>+</sup> estão intimamente relacionadas a função efetora e de proteção (Darrah *et al.*, 2007). Este adjuvante foi também importante indutor de citocinas Th17 (IL-6 e IL-17). MPL induziu aumento significativo na produção de IL-10 no tempo tardio, importante para o controle da resposta inflamatória. Essa maior produção de citocinas Th1 está relacionada ao fato desse adjuvante ser um agonista de TLR4, importante na ativação da resposta imune inata através da ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$  B e da expressão subsequente de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-6. Sendo assim, MPL pode aumentar a imunogenicidade via produção de uma grande variedade de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas via sinalização de TLR4 (Baldrige *et al.*, 2005). A contribuição de MPL para a resposta imunológica no local do inóculo foi demonstrada através da presença das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , e IFN- $\gamma$ ) e quimiocinas (CCL2/MCP-1 e CCL3/MIP-1  $\alpha$ ) em homogeneizados preparados a partir do inóculo intramuscular e avaliação nos tempos de 3, 6, e 24 h pós-injeção e 7 dias pós-injeção (Didierlaurent *et al.*, 2009). É importante destacar que a heterogeneidade na cinética de produção citocinas provavelmente reflete as diferenças na regulação da expressão e/ou na atividade de diferentes células recrutadas (Morel *et al.*, 2011). Didierlaurent e colaboradores (2009) demonstraram em seus estudos que o adjuvante MPL possui a capacidade de induzir precocemente a produção de citocinas, e essa produção é independente da presença de antígenos ou de outros adjuvantes associados.

Outra questão relevante avaliada em nosso estudo foi a resposta imune sistêmica que foi aqui investigada através de alterações hematológicas na série vermelha (eritrócitos e plaquetas) e série branca (global de leucócitos). Os resultados mostraram que não houve alterações induzidas por adjuvantes vacinais em relação ao número de células vermelhas do sangue (dados não mostrados). Em relação à série branca (global de leucócitos) foram observados em alguns tempos aumentos significativos, todavia, essas alterações mantiveram-se dentro dos valores de referência normal para esse modelo. No tempo inicial de 1 h foi observada redução no número de leucócitos nos grupos SAP e MPL em relação ao grupo controle. Essa redução nos valores sugere que os leucócitos inicialmente migram em direção ao foco inflamatório vindos do sangue periférico. A expressão de genes pró-inflamatórios e mediadores inflamatórios presentes no local do inóculo com adjuvantes vacinais induz a migração de células a partir da circulação sanguínea para o local de imunização (Mosca *et al.*, 2008). No entanto, estes valores no grupo SAP foram aumentados a partir de 24 h após a inóculo. No grupo AIF, esses valores encontram-se elevados a partir das 96 h até 336 h. Esse aumento de leucócitos na circulação sanguínea provavelmente é decorrente da manutenção do estímulo na pele que induz mediadores inflamatórios e recrutamento celular para esse local.

Sobre as diferenças observadas nas populações de células sanguíneas, ficou evidenciado que a população de neutrófilos foi significativamente maior no grupo SAP durante períodos de 12, 24 e 48 h após a inoculação. No grupo AIF houve aumento significativo de neutrófilos durante os tempos tardios de 168 e 336 h. Para o grupo MPL observou-se aumento de neutrófilos em 12 h apenas. O aumento de neutrófilos em tempos recentes após sensibilização é consistente com a capacidade de essas células se mobilizarem rapidamente a partir da medula óssea para o sangue em resposta a infecções/imunizações (Borregaard, 2010; Mantovani *et al.*, 2011). Esse aumento de neutrófilos no sangue periférico resulta no aumento do infiltrado de neutrófilos visualizado na pele onde se inicia a resposta inflamatória aguda, conforme discutido anteriormente.

A análise de monócitos identificou alterações desta população em alguns pontos avaliados da cinética. No grupo SAP houve aumento de monócitos em 48 e 336 h, enquanto no grupo AIF, este aumento ocorreu tardiamente em 168 e 336 h. Alterações também foram detectadas nos grupos quanto a população de linfócitos com redução inicial em grupos SAP e MPL. No grupo de SAP estes valores mostraram-se elevados

em 96 e 336 h. No grupo AIF, também foi observada redução em 12 horas e aumentos em 96, 168 e 336 h. A redução de linfócitos nos tempos iniciais está relacionada à fase recente da resposta imune que é caracterizada por uma queda brusca no número de linfócitos nos linfonodos eferentes e por recrutamento de linfócitos do sangue para linfonodos estimulados (Hay *et al.*, 1974). De modo interessante, observou-se uma expansão mais tardia de neutrófilos, monócitos e linfócitos nos animais sensibilizados com adjuvante AIF. Esses resultados podem estar relacionados à persistência da emulsão água em óleo (w/o) no local da injeção que assim estimulam as células imunes mais tardiamente. A capacidade de manter o antígeno no local do inóculo é efetivamente estabelecida por adjuvantes baseado em óleos que possuem capacidade de formar depósitos para entrega do antígeno (Freund, 1956; Lascelles *et al.*, 1989). De modo geral, as alterações no fluxo celular originárias do sangue periférico foram mais proeminentes nos grupos SAP e AIF, e mais sutil no grupo MPL. Os dados sugerem que estas alterações no fluxo de leucócitos refletem alterações no local do inóculo e na resposta imune no linfonodo drenante induzidas pelos adjuvantes vacinais, mostrando a dinâmica da resposta imune após a imunização intradérmica.

Diferentes autores relacionam a ativação da resposta inata restrita ao local de inóculo e aos linfonodos drenantes à redução dos efeitos adversos, enquanto que a resposta sistêmica exacerbada com alta produção de citocinas e óxido nítrico poderiam acarretar maior número ou intensidade de efeitos colaterais (Didierlaurent *et al.*, 2009; Morel *et al.*, 2011).

Diante do exposto na primeira etapa, ou seja, dos mecanismos imunes direcionados pelos adjuvantes isoladamente, decidiu-se avaliar a resposta imune específica frente às diferentes composições vacinais com o objetivo de investigar após o inóculo intradérmico, quais células estariam presentes e ativadas nos linfonodos drenantes, além de estudar a resposta imune no sangue periférico. Neste sentido, animais sensibilizados com os adjuvantes e/ou associação com o antígeno *L. (V.) braziliensis* foram avaliados após os tempos de 24 e 48 h, onde análises histológicas da pele foram realizadas. Além disso, células de cultura de linfonodos estimuladas com antígeno solúvel de *L. (L.) infantum* foram avaliadas quanto ao perfil celular e de ativação de células dendríticas, macrófagos, linfócitos T e B e de produção de citocinas no sobrenadante. O perfil imunofenotípico de células do sangue periférico também foi avaliado.

Os resultados referentes à quantificação do infiltrado celular mostraram que tanto os adjuvantes vacinais isoladamente quanto as composições vacinais foram capazes de induzir processo inflamatório na pele nos tempos de 24 e 48 h em relação aos grupos controle e LB. Os grupos MPL e LBMPL se destacaram mostrando maior recrutamento celular, contudo sem causar reações macroscópicas evidentes. Todavia, a administração do antígeno isolado não foi capaz de induzir reações inflamatórias significativas. Estudos prévios realizados em nosso laboratório mostraram que o antígeno LB não promove intenso recrutamento celular, demonstrando a importância da utilização concomitante de um adjuvante vacinal para melhorar a imunogenicidade desse antígeno no local do inóculo vacinal (Vitoriano-Souza *et al.*, 2008). Além disso, não foram observadas diferenças entre o adjuvante vacinal e a respectiva composição vacinal. Esses dados reforçam o papel dos adjuvantes vacinais na indução de imunogenicidade. Duewell e colaboradores (2011) ao estudarem a resposta imune no linfonodo drenante do local da imunização, não observaram diferenças significativas entre o adjuvante ISCOMATRIX e a vacina OVA/ISCOM quando avaliaram o recrutamento e a ativação de linfócitos B e subpopulações de linfócitos T (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>). Deste modo, eles sugerem que esses efeitos foram mediados pela capacidade imunoestimulante do adjuvante vacinal. Em concordância com esses resultados, é importante destacar a ocorrência de uma notável diferença entre a administração do antígeno sozinho, o que resulta na ausência ou baixa imunogenicidade e, a administração do antígeno associado ao adjuvante vacinal é a indução de migração celular promovendo a inflamação (Schijns, 2000).

Neste contexto, os mecanismos que determinam o desenvolvimento de uma resposta imune potente requerem a translocação do antígeno do local do inóculo para os linfonodos drenantes, onde ocorrerá a apresentação de antígenos para os linfócitos T e B (Harmsen *et al.*, 1985; Rosen *et al.*, 1990). Sendo assim, o estudo de células apresentadoras (células dendríticas e macrófagos) e expressão da molécula co-estimuladora CD86 no linfonodo torna-se relevante e contribuem no entendimento destes fenômenos. Sabe-se que os sinais de danos (inflamação, células apoptóticas e necrose) induzidos por adjuvantes vacinais, recrutam células dendríticas e macrófagos para o local de administração para manter a homeostase tecidual (Elliott *et al.*, 2009) e possivelmente, resulta na migração destas células para os linfonodos drenantes.

A análise de células apresentadoras de antígenos no linfonodo mostrou em 24 h aumento significativo nos índices dessas células nos grupos LBAIF, MPL e LBMPL.

Contudo, essas células mostraram aumento da expressão de CD86 apenas nos grupos LBAIF e LBMPL. Esses resultados mostram a importância do antígeno para a ativação da resposta imune antígeno-específica, caracterizada por reconhecimento e processamento do antígeno vacinal, ativação, proliferação e diferenciação em células efetoras/memória que serão responsáveis pelos mecanismos imunes efetores (Janeway, 2001). Além disso, reforça a importância da imunogenicidade local, uma vez que na ausência de sinais de inflamação ou infecção, células dendríticas apresentam baixa expressão de MHCII e moléculas co-estimuladoras. Entretanto, células dendríticas quando expostas a sinais inflamatórios ou a componentes derivados dos patógenos, alteram seu fenótipo com aumento da expressão dessas moléculas (Guermonprez *et al.*, 2002). Deve-se salientar que a expressão de moléculas co-estimuladoras nas APCs é considerada essencial para uma eficiente apresentação antigênica a células T e B virgens (Janeway, 1989; Medzhitov & Janeway, 1997; Iwasaki & Medzhitov, 2004). Em adição, a maior expressão de CD86 (B7-2) tem mostrado aumento da resposta imune mediada por linfócitos T (Kim *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos por nós neste estudo mostraram que as composições vacinais LBAIF (LB+emulsão água em óleo) e LBMPL (LB+agonista TLR4) foram capazes de induzir e ativar células dendríticas no linfonodo e, esses resultados estão em concordância com outros trabalhos. Shen & Yang (2012) demonstraram que a exposição de células pré-tratadas com emulsões adjuvantes induz maturação de células dendríticas com aumento da expressão de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80 e CD86). Formulações vacinais contendo MPL também foram capazes de induzir maior expressão da molécula co-estimuladora CD86 em células dendríticas migradas para o linfonodo drenante local em 24 e 72 horas (Didierlaurent *et al.*, 2009).

Quanto aos macrófagos, nossos resultados demonstraram aumento nos índices dessas células em 24 h no grupo SAP, enquanto que em 48 h, esse aumento foi observado nos grupos LB e MPL. Contudo não houve aumento significativo na expressão de CD86 em macrófagos. Nossos resultados sugerem que o antígeno e os adjuvantes vacinais isoladamente não foram capazes de induzir aumento na expressão de CD86. Entretanto, Didierlaurent e colaboradores (2009) observaram aumento na expressão de CD40 em monócitos, mas não na expressão de CD86 em formulações contendo MPL no tempo de 24 h.

Para ampliar o entendimento da resposta imune específica foi realizada a análise do perfil de linfócitos T e B e expressão de marcadores de ativação recente (CD69) e

intermediária (CD25). A indução rápida e transitória da expressão de CD69 em células T sugere o aumento na ativação e/ou diferenciação, como ocorre com CD40L (CD154) ou CD25 (Sancho *et al.*, 2005).

Os resultados aqui obtidos mostraram que o antígeno LB foi capaz de promover aumento significativo do fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em 24 h. O adjuvante SAP induziu aumento do fenótipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> no tempo de 48 h. Já o adjuvante MPL foi capaz de aumentar os índices de CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> em 24 h; no tempo de 48h foi capaz de aumentar os índices dos fenótipos CD19<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. Todavia, entre as composições vacinais, LBSAP mostrou-se mais eficiente em ativar linfócitos T CD4<sup>+</sup> e linfócitos B através da expressão de CD69 e CD25 em 24 e 48h. O grupo LBAIF foi capaz de ativar linfócitos T CD4<sup>+</sup> via CD69 em 48 h. O LBMPL mostrou maiores índices na expressão dos marcadores CD69 e CD25 em linfócitos T CD4<sup>+</sup>. De modo geral, os dados mostraram que tanto SAP e MPL quanto LBSAP, LBAIF e LBMPL foram capazes de ativar linfócitos. É importante destacar que a ativação de uma resposta imune é consequência de diferentes interações envolvendo vários tipos celulares, por exemplo, o desenvolvimento da resposta mediada por linfócitos T depende da interação entre esses tipos celulares e APCs, para que possam proliferar e se diferenciar em células efetoras. De modo geral, a ligação sustentada entre linfócitos T e APCs é crítica para a completa ativação, incluindo a entrada no ciclo celular e expressão de genes de citocinas, embora um reconhecimento transitório também possa estimular a expressão de CD69 e CD25 (Miller *et al.*, 2003). Contudo, nossos dados sugerem que em algumas situações pode ocorrer ativação de linfócitos de modo independente do antígeno como observados nos grupos SAP e MPL. DUEWELL e colaboradores (2011) também não observaram diferenças quanto ao perfil de ativação induzido pela vacina OVA/ISCOM ou pelo adjuvante isoladamente ISCOMATRIX, mostrando ativação de linfócitos independente da presença do antígeno e relaciona-se a atividade adjuvante dessa substância.

A resposta imune a um antígeno protéico pode ser determinada pelo ambiente no qual este é encontrado (Murtaugh *et al.*, 2002). Neste sentido, a formação de um microambiente com distintas citocinas pode direcionar a resposta imune efetiva. Sendo assim, sobrenadante de cultura de células de linfonodos drenantes foram coletados a fim de avaliar a produção de citocinas neste órgão linfóide. Os dados mostraram que em 24 h o grupo LBSAP induziu maior produção de citocinas IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 e IL-10, ao passo que os outros grupos induziram apenas a produção de IL-17 nesse tempo.



Em 48 h, observou-se produção de IL-2 em todos os grupos quando comparado aos grupos controle e LB, aumento de TNF- $\alpha$  nos grupos MPL e LBMPL, aumento de IFN- $\gamma$  nos grupos LB, LBAIF, MPL e LBMPL, redução de IL-6 nos grupos SAP, LBSAP, AIF e LBAIF, aumento de IL-17 nos grupos SAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL e aumento de IL-10 no grupo LBMPL. Esses dados sugerem que a migração e ativação de células para os linfonodos drenantes, tais como células dendríticas, macrófagos, células NK e linfócitos T foi acompanhada pela produção de citocinas associadas a cada tipo celular. Conclusões similares foram descritas por Smith e colaboradores (1999), ao avaliar o infiltrado local de células do exsudato peritoneal (PEC) após estímulo com o adjuvante ISCOMs.

Como dito anteriormente na etapa 1, a resposta sistêmica reflete o que provavelmente está ocorrendo no local do inóculo e nos linfonodos drenantes, mostrando a dinâmica da resposta imune após as imunizações. A função mais importante da microcirculação durante a resposta inflamatória é a de assegurar uma rápida e abundante entrega de leucócitos para o tecido inflamado. Nos mamíferos adultos saudáveis, todas as células brancas do sangue são produzidas pela medula óssea, onde se originam a partir de células-tronco pluripotentes hematopoiéticas. Os neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos, células B e células NK amadurecem na medula óssea, enquanto a maioria dos linfócitos T requer o timo nesse processo (Ley, 2001).

Nesse sentido, nesta etapa foram investigados os principais fenótipos de células sanguíneas por citometria de fluxo. Os dados mostraram que as principais alterações ocorreram em 24 h: o aumento de monócitos circulantes no grupo LB pode sugerir que o antígeno LB induz a proliferação dessas células na medula óssea, promovendo aumento dessa população no sangue periférico que provavelmente migrarão para o tecido inflamado (Laudanna *et al.*, 2002) onde se diferenciarão em macrófagos (Iwasaki & Medzhitov, 2004) e posteriormente, migrarão para o linfonodo, onde foi observado seu aumento em 48 h nesse mesmo grupo. De modo interessante, existe uma acentuada redução de células NK no grupo SAP em 24 h e nos grupos SAP e LBSAP em 48 h. Essa redução pode estar relacionada à característica da saponina em ativar células NK (Kensil *et al.*, 2004). Deste modo, haveria recrutamento recente de células NK para o linfonodo, migradas do sangue e não dos tecidos, induzido por este adjuvante, com recente produção de IFN- $\gamma$  neste local (Martín-Fontecha *et al.*, 2004). Os valores

percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> mostraram-se aumentados nos grupos LBSAP, AIF, LBAIF, MPL e LBMPL, sugerindo que após a migração para órgãos linfóides pode ocorrer expansão clonal e diferenciação em células efectoras (Kaech *et al.*, 2002; Iwasaki & Medzhitov, 2004). De forma interessante, houve aumento no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> apenas nos grupos LBSAP e LBMPL. Esses dados mostram que existe uma indução de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> preferencialmente pelas formulações LBSAP e LBMPL e que esse aumento no sangue pode refletir mais tardiamente em uma resposta mais efetiva.

Sendo assim, os resultados apresentados neste trabalho estimulam a continuação do estudo de abordagens pré-clínicas para o entendimento da resposta imune induzida por adjuvantes vacinais na obtenção de vacinas mais efetivas e seguras. A análise da resposta imune frente aos adjuvantes isoladamente mostrou que essas substâncias contribuem no recrutamento de diferentes tipos de células e citocinas importantes na formação de um microambiente favorável para o processamento do antígeno, apresentação e subsequente, estimulação da resposta imune celular. Aparentemente, a combinação vacinal de LBAIF parece representar uma possível vacina anti-*Leishmania*. Entretanto, torna-se necessário, maiores estudos que possam inclusive empregar combinações de outros adjuvantes com direcionamento para uma resposta Th1. Estes estudos de combinação de adjuvantes vêm sendo conduzidos em nosso laboratório por outros pesquisadores e esperamos em breve poder definir melhor o emprego do AIF em vacinas contra leishmanioses. As formulações vacinais LBSAP e LBMPL também são potenciais formulações a serem empregadas e testadas em outros modelos experimentais. Nossos dados mostraram que estas formulações induziram uma forte imunogenicidade com presença de inflamação com ativação de diferentes populações celulares, com produção de citocinas de perfil misto preferencialmente Th1 e, além disso, mostraram-se seguras sem ulcerações locais. Contudo, embora esses adjuvantes aparentemente mimetizem a capacidade dos patógenos para ativar o sistema imune inato, a complexidade dos sinais não específicos gerados com muitas sobreposições e mecanismos redundantes podem dificultar o entendimento da resposta imune antígeno-específico (Smith *et al.*, 1999).



O conjunto de dados obtidos no trabalho intitulado: “Envolvimento de elementos da resposta imune inata e adquirida na migração celular em camundongos sensibilizados com adjuvantes vacinais isoladamente e/ou associados com antígeno de *L. (V.) braziliensis*” nos permite concluir:

Em relação à resposta imune frente aos adjuvantes vacinais isoladamente:

- Os adjuvantes vacinais SAP, AIF e MPL compartilham características comuns a essas substâncias de induzirem imunogenicidade através da reação inflamatória. No entanto, apresentam pequenas diferenças quanto ao início da migração e a distribuição das células inflamatórias que devem ser consideradas na seleção de adjuvantes vacinais.
- Cada adjuvante foi capaz de induzir a formação de um microambiente de citocinas: o adjuvante SAP induziu perfil misto Th1/Th2; o adjuvante AIF induziu intensa produção de distintas citocinas, contudo parece estar direcionado para o perfil Th2; o adjuvante MPL apresenta excelente habilidade para produzir citocinas Th1. Além disso, as análises de correlação mostraram interessante balanço imune entre a produção de citocinas desses dois perfis. No grupo SAP pode-se observar correlações positivas entre: IL-10/TNF- $\alpha$ , IL-10/IL-6, IL-10/IFN- $\gamma$ , IL-10/IL-17, IL-4/TNF- $\alpha$  e IL-4/IL-6; no grupo AIF entre IL-10/TNF- $\alpha$ , IL-10/IL-17, IL-4/TNF- $\alpha$ , IL-4/IFN- $\gamma$ , IL-4/IL-17 e no grupo MPL entre IL-10/IL-17, IL-4/TNF- $\alpha$  e IL-4/IL-17, sugerindo que cada adjuvante manteve esse equilíbrio de modo particular.
- As alterações do fluxo leucocitário no sangue refletem provavelmente modificações induzidas por adjuvantes vacinais na pele e nos linfonodos drenantes.

Em relação à resposta imune específica frente às diferentes composições vacinais quando associadas ao antígeno total de *L. (V.) braziliensis*:

- A capacidade de induzir reação inflamatória observada nas diferentes formulações vacinais deve-se a presença do adjuvante vacinal empregado, visto que o antígeno LB isoladamente não induziu recrutamento celular no local do inóculo.
- As formulações vacinais LBAIF e LBMPL apresentam habilidade de aumentar a capacidade de APCs apresentarem antígenos a linfócitos T, visto pelo aumento do fenótipo de células CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>.
- Tanto os adjuvantes vacinais SAP e MPL quanto às formulações vacinais LBSAP, LBAIF e LBMPL foram capazes de ativar linfócitos através do aumento da expressão de CD69 e/ou CD25.
- A migração e ativação de células para os linfonodos drenantes, tais como células dendríticas, macrófagos e linfócitos T foi acompanhada pela produção de citocinas associadas a cada tipo celular. O grupo LBSAP foi um excelente indutor de citocinas pró e anti-inflamatórias em 24 horas. Contudo, no tempo de 48 horas, de modo geral, a maior produção de citocinas pró-inflamatórias foi observada nos grupos AIF, LBAIF, MPL e LBMPL.

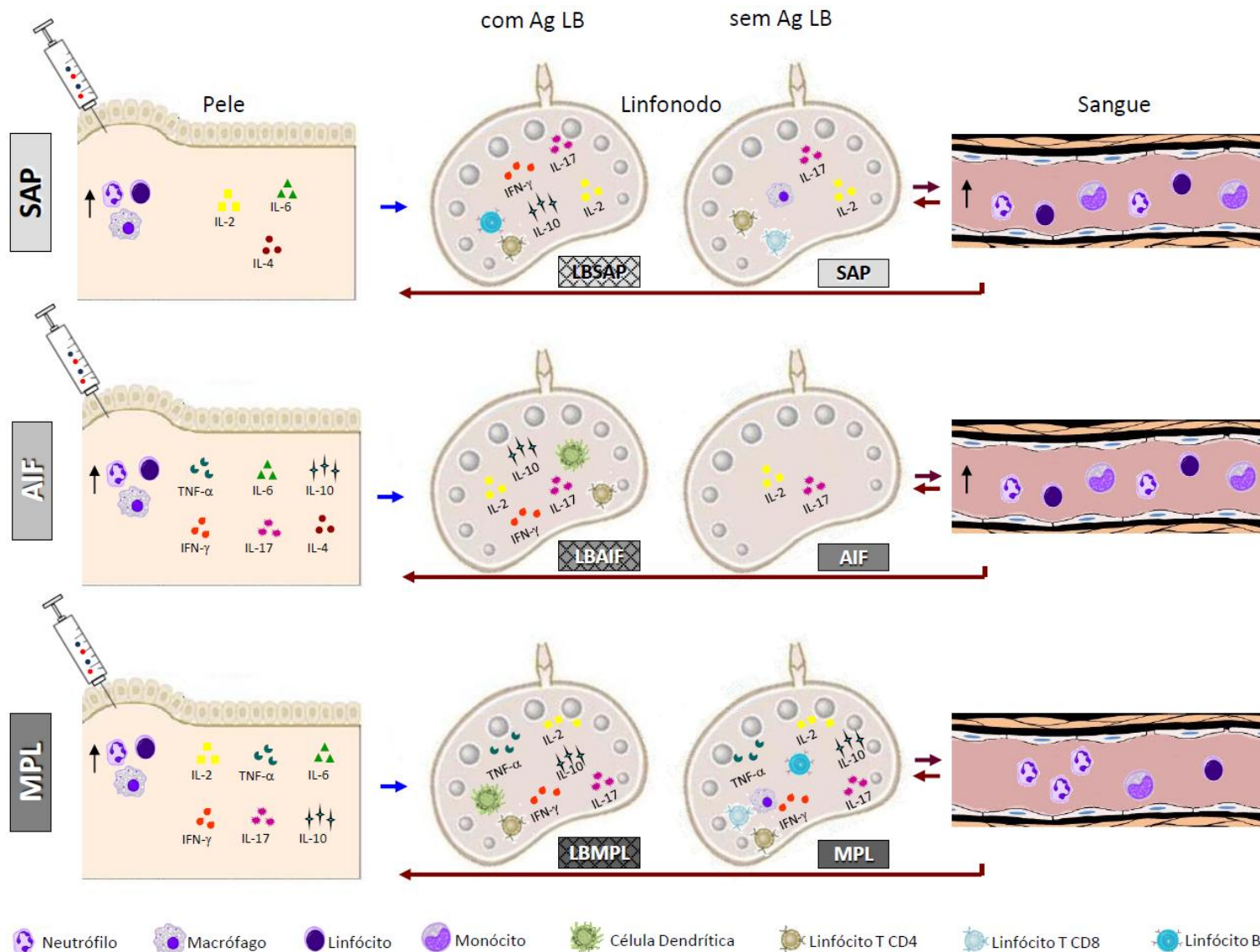


Figura 19: Esquema dos principais resultados obtidos após a sensibilização com os adjuvantes Saponina (SAP), Adjuvante Incompleto de Freund (AIF) e Monofosforil Lipídio A (MPL), bem como suas respectivas composições vacinais.

De modo geral, nossos resultados mostraram que os adjuvantes SAP, AIF e MPL induziram recrutamento celular na pele com produção de distintas citocinas pró e anti-inflamatórias, com destaque para o maior recrutamento e produção de citocinas induzidos por MPL.

Nos linfonodos drenantes pode-se observar ativação celular e produção de citocinas em todas as composições vacinais. Contudo, quando animais foram sensibilizados apenas com o adjuvante, não se observou ativação celular no grupo AIF.

No sangue, as principais alterações leucocitárias foram visualizadas após a sensibilização com os adjuvantes SAP e AIF.





A partir da realização deste trabalho foi possível obter importantes conclusões no contexto da imunogenicidade e segurança dos adjuvantes vacinais no local da imunização, bem como, na corrente sanguínea e linfonodos drenantes. Além disso, com os resultados obtidos em nosso estudo foi possível agregar novas perspectivas que contribuirão para ampliar o conhecimento do papel de adjuvantes em vacinas contra leishmanioses. Além disso, nosso grupo de pesquisa está avaliando outros adjuvantes, bem como possíveis associações entre adjuvantes vacinais no contexto pré-clínico em vacinas anti-*Leishmania*. Neste sentido, a continuidade desse trabalho tem como principais objetivos, avaliar:

- Papel de neutrófilos na resposta imune inata e adquirida através da expressão de moléculas co-estimuladoras e da sua capacidade de migração para os linfonodos.
- Expressão de mRNA de receptores tipo *Toll* (TLR2 e 4) na pele por *Real Time PCR* e de quimiocinas murinas (MCP-1/CCL2, MIP-1 $\alpha$ /CCL3 e RANTES/CCL5) em sobrenadante de macerado de pele por citometria de fluxo;
- Tráfego celular *in vivo* através da técnica microscopia intravital na pele a fim de verificar os eventos de recrutamento (rolamento e adesão) celular promovidos pelos adjuvantes em alguns pontos pré-determinados da cinética.



- Abbas, A., Lichtman, A.H. (2008) *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro Elsevier Editora Ltda 6 ed.
- Ahmed, R., Gray, D. (1996) Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science (New York, NY 272(5258): 54-60*.
- Akira, S. (2011) Innate immunity and adjuvants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London 366(1579): 2748-2755*.
- Alencar, J.E. (1959) *Calazar canino: Contribuição para o estudo da epidemiologia do calazar no Brasil*. Fortaleza, Imprensa Oficial. (Tese da Universidade Federal do Ceará).
- Alvar, J., Molina, R., San Andrés, M., Tesouro, M., Nieto, J., Vitutia, M., Gonzales, F., San Andrés, M.D., Boggio, J., Rodriguez, F., Saniz, A., Escacena, C. (1994) Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 88(4): 371-378.
- Ali, H., Haribabu, B., Richardson, R.M., Snyderman, R. (1997) Mechanisms of inflammation and leukocyte activation. *The Medical clinics of North America* 81(1): 1-28.
- Allgower, M., Schoenenberger, G.A., Sparkes, B.G. (1995) Burning the largest immune organ. *Burns*. pp. S7-47.
- Alving, C.R., Glass, M., Detrick, B. (1992) Summary: Adjuvants/Clinical Trials Working Group. *AIDS research and human retroviruses* 8(8): 1427-1430.
- Appelberg, R. (2007) Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in microbiology* 15(2): 87-92.
- Bailey, P.J. (1988) Sponge implants as model. *Methods in Enzimology*, 162: 327-334.
- Baldridge, J., Myers, K., Johnson, D., Persing, D., Cluff, C., Hershberg, R. (2005) IN Monophosphoryl Lipid A and Synthetic Lipid A Mimetics As TLR4-Based Adjuvants and Immunomodulators. IN *Vaccine Adjuvants: Immunological and clinical principles ED Humana*.
- Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392(6673): 245-252.
- Barton, G.M., Medzhitov, R. (2002) Toll-like receptors and their ligands. *Current topics in microbiology and immunology* 270: 81-92.
- Becker, P.F.L. (1997) *Inflamação*. In: *Patologia Geral, Brasil: Sarvier*, 140-193.
- Behboudi, S., Morein, B., Villacres-Eriksson, M.C. (1999) *Quillaja saponin* formulations that stimulate proinflammatory cytokines elicit a potent acquired cell-mediated immunity. *Scandinavian journal of immunology* 50(4): 371-377.

- Bennouna, S., Bliss, S.K., Curiel, T.J., Denkers, E.Y. (2003) Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J Immunol* 171: 6052–6058.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B. *et al.* (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441(7090): 235-238.
- Borregaard, N. (2010) Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33(5): 657-670.
- Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G. (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *Journal Investigative of Dermatology*. v. 78, p. 206-209.
- Brewer, J.M., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H., Alexander, J. (1996) 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. *European journal of immunology* 26(9): 2062-2066.
- Brodskyn, C., de Oliveira, C.I., Barral, A., Barral-Netto, M. (2003) Vaccines in leishmaniasis: advances in the last five years. *Expert review of vaccines* 2(5): 705-717.
- Calabro, S., Tortoli, M., Baudner, B.C., Pacitto, A., Cortese, M. *et al.* (2011) Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine* 29(9): 1812-1823.
- Castro, A.P., Aguas, A.P., Silva, M.T. (1993) Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of mycobacteria-susceptible BALB/c mice. *Clinical and experimental immunology* 92(3): 466-472.
- Champion, R.H., Burton, L., Burns, D.A., Breathnach, S.M. (1998) *Textbook of dermatology*. New York: Blackwell Science. 6th ed.
- Chan, L.S. (2004) *Animal model of human inflammatory skin diseases*. . Boca Raton: CRC Press.
- Coffmann, R.L., Sher, A., Seder, R.A. (2010) Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 33: 492–503.
- Coler, R.N., Bertholet, S., Moutaftsi, M., Guderian, J.A., Windish, H.P. *et al.* (2011) Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PloSone* 6(1): e16333.
- Convit, J., Castellanos, P.L., Rondon, A., Pinardi, M.E., Ulrich, M. *et al.* (1987) Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1(8530): 401-405.

- Cox, J.C. & Coulter, A.R. (1997) Adjuvants - a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 15(3): 248-256.
- CPMP (1997) European Medicines Agency: Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines Report no.: CPMP/SWP/465/95.
- Dahl, M.V. (1996) *Clinical immunodermatology*. New York: Mosby 3rd ed.
- Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F. *et al.* (2007) Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nature medicine* 13(7): 843-850.
- de Heusch, M., Oldenhove, G., Urbain, J., Thielemans, K., Maliszewski, C. *et al.* (2004) Depending on their maturation state, splenic dendritic cells induce the differentiation of CD4<sup>(+)</sup> T lymphocytes into memory and/or effector cells in vivo. *European journal of immunology* 34(7): 1861-1869.
- Debenedictis, C., Joubeh, S., Zhang, G., Barria, M., Ghohestani, R.F. (2001) Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology* 19(5): 573-585.
- Decher, M.D., Edwards, K.M., Bogaerts, H.H. (2004) Combination vaccines. In vaccines. PLOTKIN, WA, ED, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA: 825-861.
- Desjeux, P. (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305-318.
- Didierlaurent, A.M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S.L., Bisteau, M. *et al.* (2009) AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. *J Immunol* 183(10): 6186-6197.
- Duewell, P., Kisser, U., Heckelsmiller, K., Hoves, S., Stoitzner, P. *et al.* (2011) ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 187(1): 55-63.
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A. *et al.* (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461(7261): 282-286.
- Faure, E., Thomas, L., Xu, H., Medvedev, A., Equils, O. *et al.* (2001) Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol* 166(3): 2018-2024.
- FDA (1997) Food and Drug Administration (FDA): Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Guidance for Industry for the Evaluation of Combination Vaccines for Preventable Diseases: Production, Testing and Clinical Studies.

- Firestein, G.S. (2004) Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L. and ANSIELLO, D. Textbook of Medicine 22 ed.: 227 p.
- Fogg, C.N., Americo, J.L., Lustig, S., Huggins, J.W., Smith, S.K. *et al.* (2007) Adjuvant-enhanced antibody responses to recombinant proteins correlates with protection of mice and monkeys to orthopoxvirus challenges. *Vaccine* 25(15): 2787-2799.
- Freinkeil, R.K., W., Woodley, D.T. (2000) The Biology of the Skin. New York: The Parthenon Publishing Group 1 ed: 15-17.
- Freund, J., Hosmer, E.P. (1937) Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 37: 509-513.
- Freund, J. (1947) Some aspects of active immunization. *Annu Rev Microbiol* 1: 291-308.
- Freund, J. (1956) The mode of action of immunologic adjuvants. *Bibliotheca tuberculosea* (10): 130-148.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G. *et al.* (2009) Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* 16(3): 183-194.
- Fujiwara, R.T. (2003) Aspectos da imunidade celular e humoral da vacinação experimental na leishmaniose visceral canina (Tese de Doutorado em Parasitologia). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais: 201p.
- Fujiwara, R.T., Vale, A.M., Franca da Silva, J.C., da Costa, R.T., Quetz Jda, S. *et al.* (2005) Immunogenicity in dogs of three recombinant antigens (TSA, LeIF and LmST11) potential vaccine candidates for canine visceral leishmaniasis. *Veterinary research* 36(5-6): 827-838.
- Gamvrellis, A., Leong, D., Hanley, J.C., Xiang, S.D., Mottram P *et al.* (2004) Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunology and cell biology* 82(5): 506-516.
- Garçon, N. & Leo, O. (2010) Innate Immunity and Vaccine Adjuvants: From Concepts to the Development of a Unique Adjuvant System AS04 Used for the Formulation of a Human Papillomavirus (HPV) Vaccine. *Current Cancer Therapy Reviews* 6: 126-137.
- Genaro, O., de Toledo, V.P., da Costa, C.A., Hermeto, M.V., Afonso, L.C. *et al.* (1996) Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. *Clinics in dermatology* 14(5): 503-512.
- Gerds, V. (2011) Does adjuvanticity depend on the ability to recruit specific immune cells? *Expert review of vaccines* 10(4): 433-435.

- Giunchetti, R.C., Correa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Roatt, B.M. *et al.* (2007) Immunogenicity of a killed *Leishmania* vaccine with saponin adjuvant in dogs. *Vaccine* 25(44): 7674-7686.
- Giunchetti, R.C., Reis, A.B., da Silveira-Lemos, D., Martins-Filho, O.A., Correa-Oliveira, R. *et al.* (2008) Antigenicity of a whole parasite vaccine as promising candidate against canine leishmaniasis. *Research in veterinary science* 85(1): 106-112.
- Glenny, A., Pope, C., Waddington, H., Wallace, U. (1926) The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 29: 38-45.
- Goldenthal, K.L., Hedman, K., Chen, J.W., August, J.T., Willingham, M.C. (1985) Postfixation detergent treatment for immunofluorescence suppresses localization of some integral membrane proteins. *J Histochem Cytochem* 33(8): 813-820.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., Amigorena, S. (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* 20: 621-667.
- Gupta, R.K., Siber, G.R. (1995) Adjuvants for human vaccines - current status, problems and future prospects. *Vaccine* 13(14): 1263-1276.
- Guy, B. (2007) The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature reviews* 5(7): 505-517.
- Haake, A., Scott, G.A., Holbrook, K.A. (2000) Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL, R.K.; WOODLEY, D.T In: *the Biology of the Skin*. The Parthenon Publishing Group 1 ed: 15-17, New York.
- Harmsen, A.G., Muggenburg, B.A., Snipes, M.B., Bice, D.E. (1985) The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science (New York, NY)* 230(4731): 1277-1280.
- Hay, J.B., Cahill, R.N., Trnka, Z. (1974) The kinetics of antigen-reactive cells during lymphocyte recruitment. *Cellular immunology* 10(1): 145-153.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S. *et al.* (2000) A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813): 740-745.
- Holmgren, J., Czerkinsky, C., Lycke, N., Svennerholm, A.M. (1994) Strategies for the induction of immune responses at mucosal surfaces making use of cholera toxin B subunit as immunogen, carrier, and adjuvant. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50(5 Suppl): 42-54.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E.O., Kono H *et al.* (2008) Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature immunology* 9(8): 847-856.

- Inohara, N., Nunez, G. (2003) NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* 3(5): 371-382.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology* 5(10): 987-995.
- Janeway, C.A. Jr. (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1: 1-13.
- Janeway, C.A. Jr. (2001) How the immune system protects the host from infection. *Microbes and infection. Institut Pasteur* 3(13): 1167-1171.
- Jankovic, D., Liu, Z., Gause, W.C. (2001) Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends in immunology* 22(8): 450-457.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., Ahmed, R. (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2(4): 251-262.
- Kenney, R.T., Regina, R.N., Pichyangkul, S., Price, V.L., & Engers, H. D. (2002) 2nd meeting on novel adjuvants currently in close to human clinical testing. World Health Organization-Organization Mondiale de la Sante Fondation Merieux, Annecy, France, 5-7 June 2000. *Vaccine* 20: 2155-2163.
- Kensil, C.R., Wu, J.Y., Anderson, C.A., Wheeler, D.A., Amsden, J. (1998) QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. *Developments in biological standardization* 92: 41-47.
- Kensil, C.R., Mo, A.X., Truneh, A. (2004) Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. *Front Biosci* 9: 2972-2988.
- Kim, J.J., Bagarazzi, M.L., Trivedi, N., Hu, Y., Kazahaya, K. *et al.* (1997) Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes. *Nature biotechnology* 15(7): 641-646.
- Klinman, D.M., Sechler, J.M., Conover, J., Gu, M., Rosenberg, A.S. (1998) Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol* 160(5): 2388-2392.
- Korsholm, K.S., Petersen, R.V., Agger, E.M., Andersen, P. (2009) T-helper 1 and T-helper 2 adjuvants induce distinct differences in the magnitude, quality and kinetics of the early inflammatory response at the site of injection. *Immunology* 129(1): 75-86.
- Koster, M.I., Roop, D.R. (2004) Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. *European journal of cell biology* 83(11-12): 625-629.



- Kupper, T.S., Fuhlbrigge, R.C. (2004) Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 4(3): 211-222.
- Lainson, R., Shaw J.J. (1987) Evolution, classification and geographical distribution. *The Leishmaniasis*. London: Academic Press, 1–120.
- Lascelles, A.K., Eagleson, G., Beh, K.J., Watson, D.L. (1989) Significance of Freund's adjuvant/antigen injection granuloma in the maintenance of serum antibody response. *Veterinary immunology and immunopathology* 22(1): 15-27.
- Laudanna, C., Kim, J.Y., Constantin, G., Butcher, E. (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunological reviews* 186: 37-46.
- Lehner, T. (2003) Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. *Vaccine* 21 Suppl 2: S68-76.
- Ley, K. (2001) *The Microcirculation in Inflammation*. New York: Oxford University Press Chapter 9.
- Liang, Y., Zhou, Y., Shen, P. (2004) NF-kappaB and its regulation on the immune system. *Cellular & molecular immunology* 1(5): 343-350.
- Liu, G., Anderson, C., Scaltreto, H., Barbon, J., Kensil, C.R. (2002) QS-21 structure/function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine* 20(21-22): 2808-2815.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193(1): 265-275.
- Lycke, N. (2005) Targeted vaccine adjuvants based on modified cholera toxin. *Current molecular medicine* 5(6): 591-597.
- Magalhaes, P.A., Mayrink, W., Da Costa, C.A., Melo, M.N., Dias, M., Batista, S.M., Michalick, M.S., Williams, P. (1980) Kala-azar in the Rio Doce, Minas Gerais. Results of prophylactic measures. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 22, 197-202.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C. *et al.* (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441(7090): 231-234.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 11(8): 519-531.
- Marciani, D.J. (2003) Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug discovery today* 8(20): 934-943.

- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M *et al.* (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature immunology* 5(12): 1260-1265.
- Masina, S., M. Gicheru, G., Demotz, S.O., Fasel, N.J. (2003) Protection against cutaneous leishmaniasis in outbred vervet monkeys using a recombinant histone H1 antigen. *The Journal of infectious diseases* 188(8): 1250-1257.
- Mauel, J. (2002) Vaccination against *Leishmania* infections. *Current drug targets* 2(3): 201-226.
- Mayrink, W., da Costa, C.A., Magalhães, P.A., Melo, M.N., Dias, M. *et al.* (1979) A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73(4): 385-387.
- Mayrink, W., Genaro, O., Silva, J.C., da Costa, R.T., Tafuri, W.L. *et al.* (1996) Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91(6): 695-697.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A. Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Current opinion in immunology* 9(1): 4-9.
- Miller, M.J., Wei, S.H., Cahalan, M.D., Parker, I. (2003) Autonomous T cell trafficking examined in vivo with intravital twophoton microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 2604-2609.
- Moreira, N.D. (2008) Cinética da migração celular intradérmica em hamsters sensibilizados com diferentes constituintes antigênicos de duas vacinas contra Leishmaniose Visceral Canina. (Tese de mestrado). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- Moreira, N.D., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Vitoriano-Souza, J., Roatt, B.M. *et al.* (2009) Histological study of cell migration in the dermis of hamsters after immunisation with two different vaccines against visceral leishmaniasis. *Veterinary immunology and immunopathology* 128(4): 418-424.
- Morel, S., Didierlaurent, A., Bourguignon, P., Delhaye, S., Baras, B. *et al.* (2011) Adjuvant System AS03 containing alpha-tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* 29(13): 2461-2473.
- Mosca, F., Tritto, E., Muzzi, A., Monaci, E., Bagnoli, F. *et al.* (2008) Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30): 10501-10506.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* 7: 145-173.
- Mosmann, T.R., Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today* 17(3): 138-146.

- Mosmann, T.R., Li, L., Hengartner, H., Kagi, D., Fu, W. *et al.* (1997) Differentiation and functions of T cell subsets. Ciba Foundation symposium 204: 148-154; discussion 154-148.
- Muller, W.A. (2003) Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology* 24(6): 327-334.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2008) Janeway's Immunobiology seventh edition.
- Murtaugh, M.P., Foss, D.L. (2002) Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Veterinary immunology and immunopathology* 87(3-4): 109-121.
- Mussener, A., Klareskog, L., Lorentzen, J.C., Kleinau, S. (1995) TNF-alpha dominates cytokine mRNA expression in lymphoid tissues of rats developing collagen- and oil-induced arthritis. *Scandinavian journal of immunology* 42(1): 128-134.
- Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A. *et al.* (2000) Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 164(11): 5998-6004.
- Norris, D.A. (2004) Structure and function of the skin. GOLDMAN, L. and ANSIELLO, D. *Textbook of Medicine*, 22 ed.: 2444-2446.
- O'Neil, L.A. (2002) Toll-like receptor signal transduction and the tailoring of innate immunity: A role for Mal. *Trends Immunol* 23 (6): 296-300.
- O'Hagan, D.T. (2000) Vaccines adjuvants: preparation methods and research protocols. Human Press Inc.
- O'Hagan, D.T. & Valiante, N.M. (2003) Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug discov.* 2: 727-735.
- O'Hagan, D.T., De Gregorio, E. (2009) The path to a successful vaccine adjuvant - 'the long and winding road'. *Drug discovery today* 14(11-12): 541-551.
- Pink, J.R., Kieny, M.P. (2004) 4th meeting on Novel Adjuvants Currently in close to Human Clinical Testing World Health Organization - organisation Mondiale de la Sante Fondation Merieux, Annecy, France, 23-25, June 2003. *Vaccine* 22(17-18): 2097-2102.
- Podda, A., Del Giudice, G. (2003) MF59-adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile. *Expert review of vaccines* 2(2): 197-203.
- Rafati S., Nakhaee, A., Taheri, T., Taslimi, Y., Darabi, H. *et al.* (2005) Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a

- combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23(28): 3716-3725.
- Rajcani, J., Mosko, T., Rezuchova, I. (2005) Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? *Reviews in medical virology* 15(5): 303-325.
- Rajput, Z.I., Hu, S.H., Xiao, C.W., Arijo, A.G. (2007) Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University Science* 8(3): 153-161.
- Ramon, G. (1926) Procèdes pour accroître la production des antitoxines. *Ann Inst Pauster* 40: 1-10.
- Ravindran, R., Ali, N. (2004) Progress in vaccine research and possible effector mechanisms in visceral leishmaniasis. *Current molecular medicine* 4(6): 697-709.
- Romani, L., Bistoni, F., Puccetti, P. (1997) Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils. *Chemical immunology* 68: 110-135.
- Rosen, H., Gordon, S. (1990) Adoptive transfer of fluorescence-labeled cells shows that resident peritoneal macrophages are able to migrate into specialized lymphoid organs and inflammatory sites in the mouse. *European journal of immunology* 20(6): 1251-1258.
- Ryan, T. (2004) The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. *The International Research and Review Journal for Microscopy* 35: 161-171.
- Sancho, D., Gomez, M., Sanchez-Madrid, F. (2005) CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology* 26(3): 136-140.
- Saraiva, N.G., Valderrama, L., Labrada, M., Holguin A.F., Navas, C., Palma, G., Weigle, K.A. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World leishmaniasis. *J. Infect. Dis.*, v. 159, p. 725-735, 1989.
- Schijns, V.E. (2000) Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Current opinion in immunology* 12(4): 456-463.
- Schijns, V.E. (2003) Mechanisms of vaccine adjuvant activity: initiation and regulation of immune responses by vaccine adjuvants. *Vaccine* 21(9-10): 829-831.
- Schiller, J.T., Castellsague, X., Villa, L.L., Hildesheim, A. (2008) An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26 Suppl 10: K53-61.
- Schultze, V., D'Agosto, V., Wack, A., Novicki, D., Zorn, J. *et al.* (2008) Safety of MF59 adjuvant. *Vaccine* 26(26): 3209-3222.

- Sesardic, D., Dobbelaer, R. (2004) European union regulatory developments for new vaccine adjuvants and delivery systems. *Vaccine* 22(19): 2452-2456.
- Shen, S.S., Yang, Y.W. (2012) Antigen delivery for cross priming via the emulsion vaccine adjuvants. *Vaccine* 30(9): 1560-1571.
- Singh, M., O'Hagan, D. (1999) Advances in vaccine adjuvants. *Nature biotechnology* 17(11): 1075-1081.
- Singh M, O'Hagan DT (2002) Recent advances in vaccine adjuvants. *Pharmaceutical research* 19(6): 715-728.
- Singh, M., O'Hagan, D.T. (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International journal for parasitology* 33(5-6): 469-478.
- Singh, M. (2007) *Vaccine adjuvants and delivery systems*. John Wiley & Sons, Inc.
- Smith, R.E., Donachie, A.M., McLaren, F.H., Mowat, A.M. (1998) Preservation of mucosal and systemic adjuvant properties of ISCOMS in the absence of functional interleukin-4 or interferon-gamma. *Immunology* 93(4): 556-562.
- Smith, R.E., Donachie, A.M., Grdic, D., Lycke, N., Mowat, A.M. (1999) Immune-stimulating complexes induce an IL-12-dependent cascade of innate immune responses. *J Immunol* 162(9): 5536-5546.
- Steinman, R.M., Bonifaz, L., Fujii, S., Liu, K., Bonnyay, D, *et al.* (2005) The innate functions of dendritic cells in peripheral lymphoid tissues. *Advances in experimental medicine and biology* 560: 83-97.
- Stewart, R.J., Holloway, L.J., Isbister, W.H. (1984) Peritoneal neutrophilia: a potential indicator of the surgical acute abdomen. *The Australian and New Zealand journal of surgery* 54(6): 565-568.
- Stills, H.F. Jr. (2005) Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 46(3): 280-293.
- Strober, W., Murray, P.J., Kitani, A., Watanabe, T. (2006) Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 6(1): 9-20.
- Teixeira, C.R., Teixeira, M.J., Gomes, R.B., Santos, C.S., Andrade, B.B. *et al.* (2005) Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. *J Immunol* 175(12): 8346-8353.
- Toledo, V.P., Mayrink, W., Gollob, K.J., Oliveira, M.A., Costa, C.A. *et al.* (2001) Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96(1): 89-98.

- Tong, N.K., Beran, J., Kee, S.A., Miguel, J.L., Sanchez, C. *et al.* (2005) Immunogenicity and safety of an adjuvanted hepatitis B vaccine in pre-hemodialysis and hemodialysis patients. *Kidney international* 68(5): 2298-2303.
- Tritto, E., Mosca, F., De Gregorio, E. (2009) Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 27(25-26): 3331-3334.
- Uchi, H., Terao, H., Koga, T., Furue, M. (2000) Cytokines and chemokines in the epidermis. *Journal of dermatological science* 24 Suppl 1: S29-38.
- Uddowla, S., Freytag, L.C., Clements, J.D. (2007) Effect of adjuvants and route of immunizations on the immune response to recombinant plague antigens. *Vaccine* 25(47): 7984-7993.
- Underhill, D.M., Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current opinion in immunology* 14(1): 103-110.
- van Gisbergen, K.P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., van Kooyk, Y. (2005) Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 201: 1281-1292.
- van Kooyk, Y., Engering, A., Lekkerkerker, A.N., Ludwig, I.S., Geijtenbeek, T.B. (2004) Pathogens use carbohydrates to escape immunity induced by dendritic cells. *Current opinion in immunology* 16(4): 488-493.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., Stockinger, B. (2006) TGF-beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24(2): 179-189.
- Vitoriano-Souza, J., Reis, A.B., Moreira, N.D., Giunchetti, R.C., Correa-Oliveira, R. *et al.* (2008) Kinetics of cell migration to the dermis and hypodermis in dogs vaccinated with antigenic compounds of *Leishmania braziliensis* plus saponin. *Vaccine* 26(31): 3922-3931.
- Vitoriano-Souza, J. (2008) Cinética de migração celular e expressão da enzima iNOS na pele de cães imunizados com componentes antigênicos de uma nova vacina contra LVC. (Dissertação de Mestrado). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas UFOP, 2008.
- Vogel, F.R. (1995) Immunologic adjuvants for modern vaccine formulations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 754: 153-160.
- Volk, V. (1942) Diphtheria immunization with fluid toxoid and alum precipitated toxoid. *AmJ Public Health* 32: 690.
- WHO (2003) World Health Organisation. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines.

- Williams, I.R., Kupper, T.S. (1996) Immunity at the surface: homeostatic mechanisms of the skin immune system. *Life sciences* 58(18): 1485-1507.
- Yang, C.W., Strong, B.S., Miller, M.J., Unanue ER Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J Immunol* 185(5): 2927-2934.







MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29  
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil  
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370  
Email: [propp@ufop.br](mailto:propp@ufop.br)



OFÍCIO CEP Nº. 008/2009, de 13 de abril de 2009.

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Alexandre Barbosa Reis

DECBI/UFOP

Prezado Professor,

A Câmara de Experimentação Animal do Comitê de Ética da UFOP, em sua 8ª Reunião realizada em 3 de março de 2009, foi favorável à **aprovação** do seu projeto nº. 2009/01 – “*Envolvimento de elementos da resposta imune inata e adquirida na migração celular em camundongos imunizados com potenciais antígenos e adjuvantes vacinais anti-Leishmania*”, por um período de três anos, a partir da data deste ofício.

Atenciosamente,

Profª. Drª. Maria Lúcia Pedrosa

Coordenadora da Câmara de Experimentação Animal  
do Comitê de Ética em Pesquisa/UFOP

